

Doktori értekezés

Hippokampális gátló kapcsolatok amiloidózis során és
egészséges kolinerg rostokban

Sós Katalin Eszter

Semmelweis Egyetem
Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Nyiri Gábor Ph.D., csoport vezető kutató

Hivatalos bírálók: Dr. Wittner Lucia, Ph.D., tudományos főmunkatárs
Dr. Zelles Tibor Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Csillag András, D.Sc., egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Rácz Bence, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Alpár Alán, Ph.D., egyetemi adjunktus

Budapest
2021

“Mire megtanulsz
énekelni, dalod már
rég nem arról szól.”

Fodor Ákos

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	3
I. BEVEZETÉS	5
I.1. Az Alzheimer-kór.....	5
I.1.1. A betegség klinikai tünetei, kórlefolyása.....	5
I.1.2. Az Alzheimer-kór kialakulásának néhány fontosabb hipotézise	6
I.1.3. Az Alzheimer-kór kialakulásának főbb típusai, kiváltó okok	10
I.1.4. Az Alzheimer-kór vizsgálatára használt egér modellek rövid jellemzése	11
I.2. Az egér hippocampusz funkcionális anatómiájának összefoglalása.....	12
I.2.1. A hippocampális formáció anatómiája, kapcsolatrendszere, felépítése	12
I.2.2. A hippocampuszon belüli gátlás, a hippocampális interneuronok	14
I.2.3. Interneuronok működési zavarai Alzheimer-kórban	18
I.3 A mediális szeptum funkcionális anatómiájának rövid összefoglalása	19
I.3.1. A mediális szeptum jelentősebb sejtpopulációi és azok vetítése	19
I.3.2 A szepto-hippocampális kolinerg rendszer és az Alzheimer-kór	21
II. CÉLKITŰZÉS	23
III. MÓDSZEREK.....	25
III.1. Etikai állásfoglalás.....	25
III.2. Felhasznált kísérleti állatok	25
III.3. Sztereotaxiás műtétek.....	26
III.4. Állatok kezelése, szövetek előkészítése a kísérletekhez	27
III.5. Használt antitestek jellemzése	28
III.6 Fluoreszcens immunhisztokémia és konfokális lézer-pásztázó mikroszkópia.....	28
III.7. Beágyazás előtti egyszeres és kétszeres immunhisztokémia.....	30
III.8. A beágyazás előtti és utáni immunhisztokémia kombinációja	32
III.9. Az axon szegmensek 3D rekonstrukciója.....	32
III.10. Sejtsűrűség becslése APP ^{NLF} egerekben.....	33
III.11. 3D blokk-felszíni sorozatmetszet pásztázó elektronmikroszkópia (BF-SEM) ...	33
III.12. BF-SEM képalkotás.....	34
III.13 BF-SEM Képelemzés	35
III.14. Alkalmazott statisztika	35

IV. EREDMÉNYEK	36
IV. 1. Az amiloidózis következtében kialakult neuroinflammációs elváltozások és a disztrófiás neuritek neurokémiai azonosítása	36
IV. 2. A hippocampális PV+ és a SOM+ interneuronok számának és anatómiai megjelenésének jellemzői.....	40
IV.3 A különböző típusú hippocampális gátló szinapszisok jellemzése.....	42
IV.4. A hippocampális kolinerg rostok kapcsolatainak vizsgálata	49
IV.5. A szepto-hippocampális kolinerg axonok GABAerg tulajdonságának anatómiai vizsgálata	52
IV.6 A szepto-hippocampális kolinerg axonok anatómiai vizsgálata idős APP ^{NL-F} egerekben.....	54
VI. MEGBESZÉLÉS.....	57
VII. KÖVETKEZTETÉSEK.....	62
VIII. ÖSSZEFOGLALÁS	64
IX. SUMMARY	65
X.IRODALOMJEGYZÉK.....	69
XI. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE.....	88
XII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	90

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AAS - axo-axonikus vagy kandeláber sejtek

A β - amiloid- β

ACh - acetilkolin

AchE – acetilkolin-észteráz

AICD - APP intracelluláris doménje

AISZ - axon iniciális szegmentum

AK – Alzheimer-kór

APP - amiloid prekursor fehérje

BACE 1-2 - 1-es és 2-es típusú β szekretáz

BF - bazális előagy

BF-SEM - blokk-felszíni sorozatmetszet pásztázó elektronmikroszkóp

BSA-c/TBS – TBS-ben oldott Aurion BSA-c oldat

CA1,2,3 – cornu ammonis (ammonszarv) 1,2,3-mas régió

CCK – kolecisztokinin

CB1 - 1-es típusú kannabinoid receptor

ChAT – kolin-acetiltransferáz

CTF - α -szekretáz C-terminális fragmense

DAB – 3,3'-diaminobenzidin

DG – gyrus dentatus

DN – disztrófiás neurit

DV - desztillált víz

EC – entorhinális kéreg

eGFP - zöld fluoreszcens fehérje

EOAD – early onset -korai kezdetű

FAD - családi öröklődésű, familiáris Alzheimer-kór

GA – glutáraldehid

GABA – gamma-amino-vajsav

GABA_A– A-típusú GABA receptor

GFAP – glia fibrilláris savas protein

gcl – stratum granulosum

HIPP – hippocampus

HDR – homológ rekombináció
HIL - hilus
HSA - humán szérum albumin
Iba1 - ionizált kalcium-kötő adapter fehérje
IN - interneuron
LOAD – late onset késői kezdetű
KI - knock-in, meghatározott gének beillesztése
KO – knock-out, meghatározott gének kiütése
MS – mediális szeptum
ml – stratum moleculare
NL2 – neuroligin 2
OLM – oriens-lacunosum moleculare sejt
PB – foszfátpuffer
pcl – stratum pyramidale
PNN – perineuronális hálózat
PV /PV+ - parvalbumin, parvalbumin immunjelölésre pozitív
SAD - szórványos megjelenésű Alzheimer-kór
se – szeptum
sl – stratum lucidum
sl-m – stratum lacunosum-moleculare
so – stratum oriens
SOM - szomatosztatin
sr – stratum radiatum
sp – stratum pyramidale
TB – tris puffer
TBS – tris pufferelt fiziológias sóoldat
vAChT - vezikuláris acetilkolin transzporter
VGAT - Vezikuláris GABA transzporter
VIP - vazoaktív intestinális peptid
vGluT1,2,3 – 1-es, 2-es, vagy 3-mas típusú vezikuláris glutamát transzporter
VT – vad típusú egér

I. BEVEZETÉS

I.1. Az Alzheimer-kór

I.1.1. A betegség klinikai tünetei, kórlefordása

Az Alzheimer-kórt (AK) először, 1907-ben Alois Alzheimer, német orvos írta le (Stelzmann és mtsai és mtsai, 1995). Ez a demencia leggyakoribb formája, amely az egész világon súlyos közegészségügyi kérdés. Az AK lehetséges tünetei: a rövid- és hosszútávú emlékezet zavara, az izmok feletti kontroll elvesztése, így a rutinmozdulatok elvégzésének nehézkessé válása, az absztrakt gondolkodás és az ítézőképesség romlása, hangulatváltozás, zavartság, ingerlékenység, esetleg erőszakossá válnak a betegek. A súlyos állapotú AK-os beteg önellátásra nem képes, mindemellett nem tud gondolkodni és beszélni sem. A betegség tulajdonképpen az értelem és a személyiség lassú szétesése.

Az AK kialakulása soktényezős folyamat, még nem sikerült olyan módszert találni, amely önmagában elegendő lenne a pontos diagnózis felállításához, vagy annak kiszűréséhez. Több lépcsős vizsgálati folyamat után, 90%-os valószínűséggel megállapítható a már kialakult AK, de ehhez szükséges a beteg részletes kikérdezése, olyan laboratóriumi vizsgálatok elvégzése, amelyek kizárják az egyéb, szellemi leépüléssel járó belgyógyászati betegségeket, szükséges a memória és problémamegoldó készségek tesztelése, valamint az agy, képalkotó módszerekkel (CT, MRI, amiloid és tau PET vizsgálat) való feltérképezése. Jelenleg is, teljes bizonyossággal csak az agyszövet boncolásával lehet azt kimondani, hogy valaki életében AK volt.

Speciális körülmények között (mint például a gyorsan kialakuló vagy az atipikus jellemzőkkel rendelkező demencia, illetve a korai kezdetű demencia) más tesztek is alkalmazhatóak, ilyenek például a cerebrospinális folyadékban fellépő kóros amiloid-béta (A β) és tau mérése. Az amiloid-béta jelenléte, önmagában nem jelenti teljes bizonyossággal az AK meglétét, hiszen számos vizsgálat kimutatta, hogy az A β jelenléte önmagában nem mindig okoz AK-t (Breijyeh és mtsai és mtsai, 2021). A mai napig nem egyértelmű a kezdeti stádiumban az AK kimutatása, de a kialakulásához vezető okok sem, így számos hipotézis született a különböző megközelítések alapján. A következőkben ezt szeretném bemutatni.

I.1.2. Az Alzheimer-kór kialakulásának néhány fontosabb hipotézise

Az Alzheimer-kór kialakulásának hipotéziseit több összefoglaló cikkben is részlezik, a disszertációmban felsoroltakat Du és munkatársai 2018-ban megjelent munkája alapján mutatom be (Du és mtsaiés mtsai, 2018).

I.1.2. 1.Kolinerg hipotézis

A kolinerg diszfunkción alapuló AK hipotézis a legrégebbi (Contestabile, 2011). Már a 80-as évek elejétől több tanulmányban leírták, hogy AK-betegek biopsziás (Francis és mtsaiés mtsai, 1993) és posztmortem agyszövetének biokémiai vizsgálatai során csökkent kolin-acetil-transzferáz aktivitás (Wilcock és mtsaiés mtsai, 1982), acetilkolin szintézis (Sims és mtsaiés mtsai, 1983), kolinfelvétel (Rylett és mtsaiés mtsai, 1983) és acetilkolin felszabadulás (Nilsson és mtsaiés mtsai, 1986) volt megfigyelhető. Ezek a megfigyelések azt jelentették, hogy a kolinerg idegsejtek degenerációja és az ezzel járó kolinerg neurotranszmisszió elvesztése az agykéregben és más területeken (striatum, hippocampus, nucleus basalis) jelentősen hozzájárult a kognitív funkciók romlásához (Bartus és mtsaiés mtsai, 1982; Perez és mtsaiés mtsai, 2007). Az acetilkolin (ACh) a kolinerg idegsejtek által használt neurotranszmitter, amely számos élettani folyamatban részt vesz, így például a figyelem, a tanulás, a memória, a stresszválasz, az ébrenlét és alvás, valamint a szenzoros információk feldolgozásában (Haam and Yakel, 2017; Miranda and Bermúdez-Rattoni, 1999; Sarter and Bruno, 1997). Kimutatható, hogy a preszinaptikus kolinerg terminálisokban található nikotinos- és muskarinos acetil-kolin-receptorok számának csökkenése csökkenti a kognitív funkciót (Nordberg, 1992; Whitehouse és mtsaiés mtsai, 1988). *In vitro* vizsgálatok azt is bizonyították, hogy az A β gátolja a kolinerg neurotranszmissziót (Auld és mtsaiés mtsai, 1998; Kar és mtsaiés mtsai, 2002).

A jelenleg rendelkezésre álló gyógyszeres kezelések egy része a kolinerg hipotézisen alapulnak (Vaz and Silvestre, 2020). A kolinészteráz inhibitorok az AK gyógyszeres kezelésének alappillérei, gátolják a kolinészterázt, amely az ACh lebontásáért felel ezzel emelik a neurotranszmitter szintjét és a tünetek módosulását eredményezik (Burns and Iliffe, 2009; Sharma, 2019). A kolin (acetilkolin neurotranszmitter prekursora) fontos szerepet tölt be különböző sejtfunciókban, metil - donorként szolgál és a sejtmembránok előállításának előfutára. A kolin aktiválja az

$\alpha 7nACh$ receptort, és a Sigma -1 receptor ($\sigma 1R$) agonistájaként is működik. Ezek a receptorok szabályozzák a központi idegrendszer immunválaszát, és diszregulációjuk hozzájárul az AK patogeneziséhez (Velazquez és mtsaiés mtsai, 2019, 2020). A hippocampusban található kolinerg rostok a mediális szeptumból kolinerg sejteiből erednek.

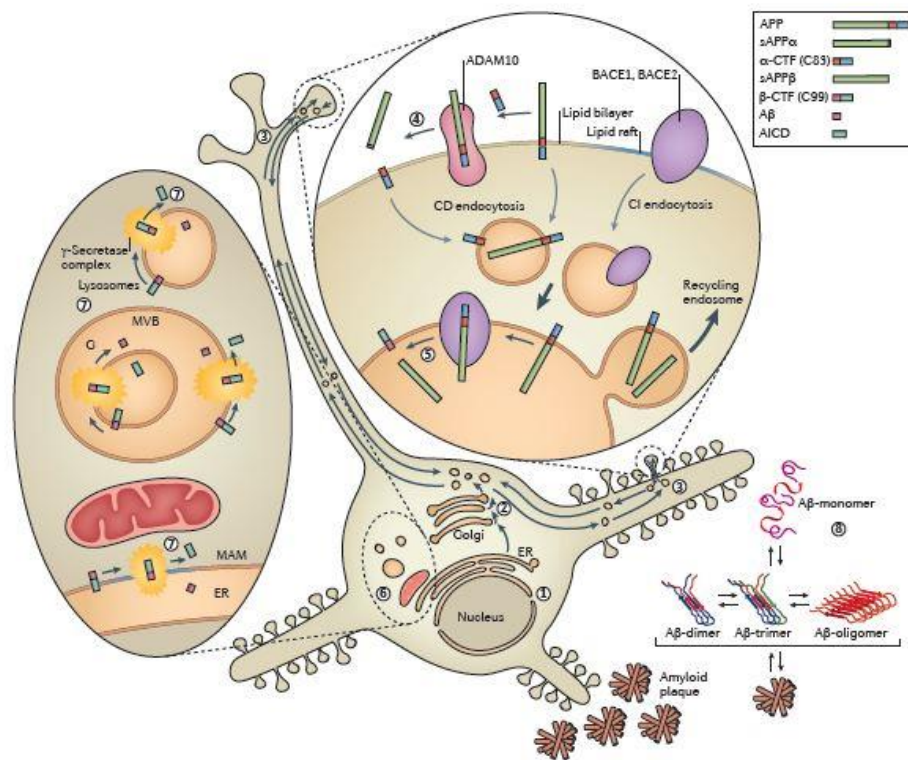
Az előbbi eredmények jól mutatják a kolinerg rendszer jelentőségét az AK patogenezisében, ezért is választottam dolgozatom egyik témájának a mediális szeptum (MS) kolinerg rostjainak vizsgálatát mind egészséges, mind pedig AK egér modelben.

I.1.2.2. A β kaszkád hipotézis

Az A β 36-43 aminosavból álló peptideket jelöl, amelyek az amiloid plakkok fő alkotóelemei. Az A β normál funkcióját nem ismerjük jól, de számos lehetséges aktivitást fedeztek fel, beleértve a kináz enzimek aktiválását, szerepet játszik az oxidatív stressz elleni védekezésben, a koleszterintranszport szabályozásában, transzkripció faktoroként, és antimikrobiális aktivitásban (Baruch-Suchodolsky and Fischer, 2009; Igbavboa, 2009; Yao and Papadopoulos, 2002).

Az A β fehérje extracelluláris lerakódásai, mint a szenilis plakkok, az intraneuronális neurofibrilláris kötegek és a nagymértékű neuronális veszteség az AK legfontosabb patológiás tulajdonságai. Így az A β peptideket már régóta az AK potenciális célpontjának tekintik és az elmúlt húsz évben az új gyógyszerek kutatása is erre irányult (Cummings és mtsaiés mtsai, 2016). Az anti-A β terápiában a legközvetlenebb stratégia az A β termelésének csökkentése a β - és γ -szekretáz célzásával (Vassar and Citron, 2000). Meg kell jegyezni azonban, hogy egyes esetekben az AK betegeknél nem feltétlenül jellemző a túltermelő amiloid prekursor fehérje (APP), ezen túlmenően, a különböző A β izoformák endogén pozitív regulátorokként is szolgálhatnak a hippocampus szinapszisainak neurotranszmitter felszabadulásához (Abramov és mtsaiés mtsai, 2009).

Az anti-amiloid terápiának három megközelítése létezik: az A β -termelés csökkentése, az A β aggregáció megelőzése és az A β eltüntetésének (clearance) elősegítése, eddig egyik stratégia sem hozta a várt sikert (Vaz and Silvestre, 2020).



1.ábra. Az amiloid prekursor fehérje (APP) feldolgozásának útjai és az amiloid- β ($A\beta$) formák kialakulása módosítva (Polanco és mtsai és mtsai, 2018).

I.1.2.3. Az amiloid prekursor fehérje feldolgozásának útjai és az amiloid- β formák kialakulása

Számos APP izoforma létezik: az elsődleges neuronális formája az APP695, míg az asztrociták és a mikroglia az APP751-et és APP770-et is kifejezik (Del Turco és mtsai és mtsai, 2016). Az APP feldolgozása számos idegsejt kompartmentben megy végbe - ideértve az axonokat, az idegvégződéseket és a dendriteket - ami számos biológiailag aktív molekula részletet eredményez (1.ábra). A szinaptikus aktivitás által stimulált, nem-amiloidogén (vagyis nem $A\beta$ -formáló) APP-feldolgozási útvonalban, a felszíni APP-t elsősorban az α -szekretáz dezintegrin és a metalloproteáz-domént tartalmazó 10-es protein hasítja (ADAM10) (Hoey és mtsai és mtsai, 2009; Prox és mtsai és mtsai, 2013). Amikor a szolubilis APP α felszabadul az extracelluláris környezetbe, akkor az APP egy rövid darabja, az α -szekretáz C-terminális fragmense (α -CTF) a membránba beillesztve marad. Ezt a fragmenst ismeri fel a γ -szekretáz komplex, amely endopeptidáz-szerű ϵ -hasítással az APP intracelluláris doménjének (AICD) intracelluláris felszabadulásához vezet és létrejön a p3 fragmens karboxipeptidáz-szerű γ -hasítással (Vassar, 2013). Mivel

a kezdeti α -hasítás az $A\beta$ régió belül zajlik, az $A\beta$ képződése kizárt. Az amiloidogén út (ami $A\beta$ képződéshez vezet) azt feltételezi, hogy az a felszíni APP, amely nem ment át α hasításon, internalizálódik az endoszómákba, ahol az 1-es és 2-es típusú β szekretázok (BACE1 és BACE2) egy olyan helyen hasítják, amelyen az $A\beta$ aminoterminálisává válik. A hosszú β -szekretáz C-terminális fragmentuma (β -CTF) a membránhoz rögzítve marad, míg az oldható APP β (sAPP β) felszabadul. A γ -szekretáz komplex kezdetben endoproteolitikus ϵ -vágásokkal hasítja a β -CTF-et, létrehozva az AICD-jét, valamint az $A\beta_{48}$ és $A\beta_{49}$ két formáját. Ez két peptid tovább hasítódik a γ -szekretáz által, amely exoproteolitikus γ -vágásokat hajt végre 3-4 alkalommal a hidrofób szekvencián belül, rövidebb peptideket képezve: az $A\beta_{48}$ az $A\beta_{45}$, az $A\beta_{42}$ és az $A\beta_{38}$, míg az $A\beta_{49}$ az $A\beta_{46}$, $A\beta_{43}$ és $A\beta_{40}$ kialakulását eredményezi (Takami és mtsaiés mtsai, 2009). Ha túl nagy mennyiségű $A\beta$ szintetizálódik, egy kritikus koncentrációt meghaladva, toxikus aggregátumok keletkeznek, ezek a sejtek között kicsapódva plakkokat hoznak létre. Az amiloid hipotézis szerint, a neuronokat az extracellulárisan jelenlévő $A\beta$ szignalizációs hatásai károsítják, Ca^{2+} áramlik be a sejtekbe, felborul a fehérjék foszforilációs egyensúlya, és a sejteken belül sejtkárosító fehérjék csapódnak ki.

Az APP feldolgozása szigorúan szabályozott és a dendritek és axonok mentén a szekretázokkal együtt - a szekréción út vonalon keresztül - a preszinaptikus boutonokba továbbítódik (Born és mtsaiés mtsai, 2014), itt zajlik a BACE1 és az APP közötti kölcsönhatás. Noha az $A\beta$ szekretálódhat mind preszinaptikusan, mind posztzinaptikusan (DeBoer és mtsaiés mtsai, 2014), az axonálisan szekretált fragmentumok többsége endocitózis által a szómába kerül, feldolgozódik és a terminálisba szállítódik (Niederst és mtsaiés mtsai, 2015).

I.1.2.4. Gyulladásos hipotézis

Az AK jellemző kísérői a reaktív gliózis és a neuroinflammáció. Egyre több bizonyíték igazolja, hogy a mikroglia az AK központi szereplői, miután a reaktív mikroglia és az asztrociták körülveszik az amiloid plakkokat és számos gyulladáscsökkentő citokint választanak ki. Ezek az események az AK kialakulásának korai, legfontosabb mozgatórugóinak tekinthetők. A mikrogliaakkal kapcsolatos útvonalakat központi kérdésnek tekintették a betegség kockázata és a patogenezis során,

így genetikai és transzkriptomikai vizsgálatokkal is alátámasztották (Bolós és mtsaiés mtsai, 2017; Dong és mtsaiés mtsai, 2017).

I.1.3. Az Alzheimer-kór kialakulásának főbb típusai, kiváltó okok

Az AK két típusba sorolható attól függően hogy az mikor jelenik meg a beteg élete során, így az felosztható korai (<60 év, EOAD – early onset) és a késői (> 60 év, LOAD – late onset) betegség típusra (Bertram és mtsaiés mtsai, 2010; Blennow és mtsaiés mtsai, 2006). A két megjelenési formánál mások a kiváltó okok. Humán genetikai szempontból szintén két forma különböztethető meg, az egyik örökletes, családi AK (FAD), amely megfelelt az EOAD-nak; a másik pedig szórványos megjelenésű AK (SAD), amely a fenti LOAD csoportnak felel meg (Bertram és mtsaiés mtsai, 2010; Ling és mtsaiés mtsai, 2003). Az összes Alzheimer-kóros betegnek csupán 4–8% -a szenved családi öröklődésű megbetegedésben.

Emberekben a FAD-t autoszomális domináns mutációk okozzák az APP (Goate and Hardy, 2012), PSEN1 és PSEN2 génekben (Campion és mtsaiés mtsai, 1995; Cruts és mtsaiés mtsai, 1995), ezek a gének számítanak az AK egyik fő genetikai kockázati tényezőjének. A szórványos AK a gyakoribb forma, az összes megbetegedés több mint 90% -át teszi ki (Goedert and Spillantini, 2006). Felvetődött, hogy a genetikai és környezeti tényezők szinergikus hatása lehet felelős a FAD és az SAD formákért (Huang, Yadong; Mucke, 2012). Több típusú kockázati tényezőt is leírtak, ilyenek például a női nem (Mielke és mtsaiés mtsai, 2014), az életkor, az alacsony iskolázottsági fok (Grünblatt és mtsaiés mtsai, 2009), a dohányzás (Catado és mtsaiés mtsai, 2010); az elhízás (Beydoun és mtsaiés mtsai, 2008; Kivipelto és mtsaiés mtsai, 2005) és a diabetes mellitus (Arvanitakis és mtsaiés mtsai, 2004). A klinikai és a neuropatológiai elemzések azt mutatják, hogy a FAD spasztikus bénulással, amiloid angiopátiával, és nem-neuritikus, gyapjúszerű plakkokkal, neurofibrilláris kötegekkel járhat (Crook és mtsai, 1998; E. Hellstrom-Lindahl et al, 2009; Lleo et al, 2006).

I.1.3.1. Az Alzheimer-kór népegészségügyi jelentősége

2007 és 2017 között Európában, a neurológiai rendellenességek közül a legnagyobb növekedés az Alzheimer-kór és más demenciák okozta halálesetek körében történt (46,2%), 2017-ben az 1,72 millió haláleset 2,51 millióra emelkedett (Nichols és

mtsai és mtsai, 2019). Az Alzheimer-kór előfordulása Európában 1000 emberre vonatkoztatva 11,08 beteg volt; nemek szerint lebontva, ez a férfiakban 7,02, a nőkben 13,25 beteget jelent; ezek az arányok az életkor emelkedésével egyre inkább növekedést mutatnak (Niu, 2017).

I.1.4. Az Alzheimer-kór vizsgálatára használt egér modellek rövid jellemzése

Az AK-ban előforduló génmutációkat hordozó transzgenikus egér modellek előállítására nagymértékben hozzájárul a betegség hátterének és megértésének kutatásához. A jelenleg elérhető transzgenikus egérmodellek teljesebb körű rendszerezése, amely közel 210 állattörzset foglal magában a <http://www.alzforum.org/res/com/tra/> honlapon található. A homológ rekombinációs technikán alapú AK modellek közé tartoznak azok az egértörzsek, amelyekben az AK-hoz kapcsolódó géneket vagy kiütik (knockout (KO)) vagy beillesztik (knock-in (KI)) egy adott szakaszra.

Kísérleteinkben egy új KI törzset használtunk, az APP^{NL-F} egereket, amelyeket Saito és munkatársai mutattak be (Saito és mtsai és mtsai, 2016). Az APP^{NL-F} modell kiküszöböli az APP túlzott mértékű expressziója által okozott és a betegségre nem jellemző műtermékeket azáltal, hogy az állatokban kifejeződő APP promotere nem mesterséges, hanem az egér saját APP promotere. Itt az APP KI konstrukció tartalmaz egy humanizált A β régiót, azaz az egér génjét kicserélték az emberi génre úgy, hogy az két patogén mutációt tartalmaz, ezek a svéd „NL” és az ibériai „F” mutációk. Az endogén egér APP promóterének használata miatt a konstrukció a megfelelő sejt típusú és időbeli specificitással rendelkező sejtekben expresszálódik. Ezekben az állatokban az A β felhalmozódása hat hónap körül alakul ki. Az A β 42 kifejezett emelkedése jellemző a svéd és az ibériai mutációk APP proteolízisére gyakorolt együttes hatása miatt, amelyek növelik a teljes A β és A β 42 mennyiségét. Az APP^{NL-F} egerek számos AK-ral társuló patológiát mutatnak, ideértve az amiloid plakkokat a kéregben és a hippocampusban, a szinaptikus veszteséget, valamint a mikrogliózist és az asztrocitózist, különösen a plakkok közelében. Neurofibrilláris kötegeket nem észleltek, bár a plakkok körül kialakuló disztrófikus neuritokban megnövekedett foszforilált tau-szint figyelhető meg. Nagyon előrehaladott korban, legalább 24 hónapos korban a tau patológiára utaló néhány jelet észlelnek a hippocampusban, ám ezek sztochasztikus jellegűek és esetleg műtermékek lehetnek (Takaomi Saido megfigyelés). Az APP^{NL-F} egerek kognitív károsodás jeleit mutatják 18 hónaposan, különösen a memória romlását, az Y

labirintusban mérve. A Morris vízlabirintusban végzett viselkedésvizsgálatok eredményeiben nem volt szignifikáns eltérés (Nilsson és mtsai, 2014).

I.2. Az egér hippocampusz funkcionális anatómiájának összefoglalása

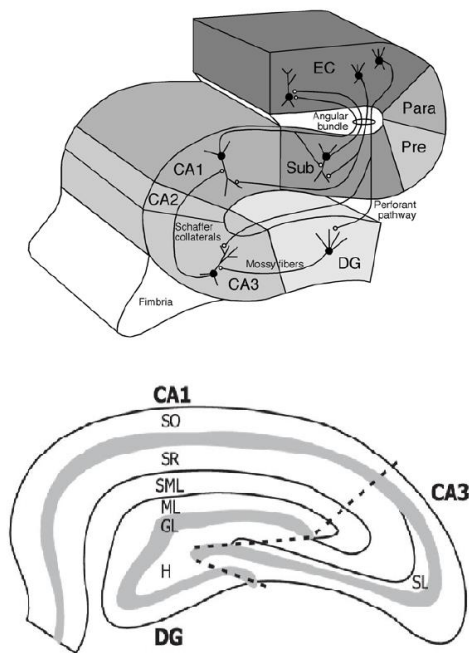
I.2.1. A hippocampusz formáció anatómiája, kapcsolatrendszere, felépítése

A több mint egy évszázados neuroanatómiai kutatások és a szó szerint több tízezer tudományos cikk ellenére sem született egyetértés a hippocampusz nevezékének egyes szempontjairól. A dolgozatomban Andersen és munkatársainak (Andersen és mtsai, 2009) szakkönyve alapján foglalom össze vázlatosan a hippocampusz formáció anatómiájához kapcsolódó legfontosabb tudnivalókat. A könyvben elfogadott vélemény szerint a hippocampusz formációt a hippocampusz ammonsarvai (CA1-3, a CA rövidítés a cornu ammonisból származik) és a hozzá kapcsolódó agyi területek (az entorhinális kéreg, a gyrus dentatus, a presubiculum, a parasubiculum és a subiculum) együttese határozza meg, amelyek funkcionális rendszert alkotnak. Általánosságban hippocampusznak a gyrus dentatus és a CA1-3 régiók együttesét szokták nevezni, a disszertáció további részében ezt követem.

A hippocampusz formáció ősi agyi struktúra, az archikortex része; rágsálókban hosszúságú alakú, az agy középvonalától a hossz tengelye mentén elnyújtottan, c-alakban helyezkedik el, rostroróriszálisan a szeptális magok közelében, a thalamus felett és a temporális kéreg kezdeti részétől caudoventrálisán. A subiculum a szeptotemporalis tengely egyharmadánál található; az entorhinális kéreg ennél még kaudálisabban helyezkedik el, közöttük van az anguláris köteg, amely az entorhinális kéreg és a hippocampusz formáció többi részének információcseréjét közvetítő axonokat gyűjti össze. A fimbria nevű axonköteg a szeptális pólus előtt található és köti össze a hippocampusz formációt a többi agyterülettel, majd a fornixban folytatódik. A kommisszurális rostok kötik össze kétoldali hippocampuszokat (Andersen és mtsai, 2009).

A hippocampusz formáció különböző típusú glutamaterg sejtjei egymással jellemzően egyirányú kapcsolatrendszert alkotnak, amely a gyrus dentatus felől a CA1 felé halad és kiindulási pontja az entorhinális kéreg. Ez a terület begyűjti a többi kérgi struktúrából származó szenzoros információkat, majd a II. rétegében található

piramis sejtek a perforáns pályán keresztül a gyrus dentatus szemcsesejtjeihez és CA3-ba küldik axonjaikat, míg a III. rétegében található piramis sejtek a CA1-be és a subiculumba küldik rostjaikat a perforáns és alveoláris pályán keresztül. A gyrus dentatus szemcsesejtjei a moharostokon keresztül érik el a CA3 piramis sejtjeit, amely utóbbiak végül axonjaikkal, a Schaffer-kollaterálisokkal küldenek információt a CA1-es piramis sejt dendritjeire. A CA1-ben található piramis sejt a subiculumba, valamint az entorhinális kéreg mély, V. rétegébe vetítenek. A subiculumból származó információ szintén eléri az entorhinális kéreg V. rétegének sejtjeit; melyek a többi kérgi struktúra felé közvetítik a hippocampusban már feldolgozott információt. A korai szakirodalom kihangsúlyozta az első három kapcsolatot (EC → DG (1. szinapszis), DG → CA3 (2. szinapszis), CA3 → CA1 (3. szinapszis)) a hippocampális összeköttetések közül, amelyeket a „tri-szinaptikus hurok” kifejezés alkalmazásával kiemelték a többi pálya együttese közül (Andersen és mtsai, 1971).



2. ábra. A hippocampális formáció rétegeinek sematikus képe. Módosítva..
Forrás: (Andersen P., 2007).

A hippocampus rétegeinek bemutatásánál (2.ábra) a gyrus dentatus és CA1-3 régiók felépítésére térek ki vázlatosan, mivel a dolgozatomban ezek a területek szerepelnek. Keresztmetszetben ezek a területek két egymásba forduló U-alakot formáznak és jellegzetes lamináris szerkezetet mutatnak. A gyrus dentatus principális sejtjei, a szemcsesejt egy rétegbe, a stratum granulosumba rendeződnek, és az egyik U-alakot formázzák: a felső, CA1 és CA3 között elhelyezkedő egyenes része a szuprapiramidális él, a CA3 alatti egyenes az infrapiramidális él. Dendritjeik a molekuláris rétegben (stratum moleculare) ágaznak szét. A stratum granulosumba rendeződött szemcsesejt élei között található a polimorf réteg, mely interneuronokat, mohasejtet és a szemcsesejt moharostjait tartalmazza. A CA1-

3 régiók piramisneuronjai szintén egy rétegben lokalizálódnak, a stratum pyramidaleban; a régiók közötti határokat a piramisneuronok morfológiája alapján lehet elkülöníteni. A CA1 piramisneuronjai kisebb méretűek, a CA3 és CA2-es piramisneuronok nagyobbak, és csak a CA3 piramisneuronjai kapnak bemenetet a szemcsesemleges neuronok moharostjaitól a stratum lucidum rétegben. A piramisneuronok basális dendritjei a str. oriensben ágaznak el, az apikális dendritjeik és elágazásait a stratum radiatum tartalmazza; a legvékonyabb ágait a stratum lacunosum-moleculare, amely a hippocampus hasadékához legközelebb helyezkedik el.

I.2.2. A hippocampuson belüli gátlás, a hippocampusális interneuronok

A hippocampusban található GABAerg, gátló interneuronokat (IN) leggyakrabban az alapján különböztetik el, hogy axonfajuk a serkentő piramisneuronok felszínének mely részén végződnek. Ez azért meghatározó szempont, mert az idegsejtek a dendritjeikre érkező szinaptikus bemenetek által kiváltott jeleket szómájukon összegzik, majd a kimenő jel a sejttestről eredő axon iniciális szegmentumokban (AISZ) keletkezik, és innen terjed végig az axonágakon. Tehát minél közelebb helyezkedik el egy gátló szinapszis az AISZ-hez, vagyis az akciós potenciál keletkezési helyéhez, annál hatékonyabban képes befolyásolni a sejt tüzelését vagy annak tüzelési ritmusát, míg, ha a gátlás a dendritekre érkezik akkor az a sejt ingerelhetőségét és plasztikus tanulási folyamatokban betöltött szerepét lesz képes befolyásolni térben és időben.

A hippocampusban található interneuronok

A hippocampusban a lokális, GABAerg gátló IN-ok a teljes neuronális sejtpopuláció ~ 10–15% -át teszik ki, amelyek jelenlegi tudásunk szerint legalább 21 altípusba sorolhatóak és erről több részletes összefoglaló is készült (Bezaire, 2013; Freund, Tamás F., Buzsáki, 1996; Klausberger and Somogyi, 2008; Pelkey és mtsai és mtsai, 2017). Az interneuronokat a piramisneuronokhoz viszonyított kapcsolatuk alapján, periszomatikus régiót célzó és dendriteket célzó csoportra oszthatjuk, valamint megkülönböztetünk helyi, interneuron specifikus és vetítő interneuronokat (3.ábra).

a. A piramisneuronok periszomatikus régióját célzó interneuronok:

A periszomatikus régiót célzó neuronok egyik típusa a kosárneuronok, amelyek a piramisneuronok sejttestjét és proximális dendritjeit idegzik be. Szómájuk többnyire a

stratum pyramidale (s.p.) szomszédságában helyezkedik el; dendritjeik minden rétegben megtalálhatók, axonjaik a stratum pyramidale-t célozzák, ahol kosárszerűen terminálisokkal veszik körbe a piramisjeiteket. A kosárjeiteknél két típusát különböztetjük meg neurokémiai tulajdonságaik alapján. Az egyik típusuk a parvalbumin pozitív (PV+) kosárjeitek, amelyek egyenként kb. 2500 piramisjeitet idegeznek be és mindegyikre átlagosan 6 szinapszist adnak (Bezaire, 2013; Freund and Buzsáki, 1996; Lee és mtsai és mtsai, 2010). A PV+ kosárjeitek adják a CA1 régió belül a PV tartalmú sejtek ~60%-át (Baude és mtsai és mtsai, 2007) és a piramisjeiteken kívül kölcsönösen egymást is gátolják, periszomatikus beidegzés révén, ugyanakkor egymás aktivitás mintázatát össze is hangolják (Hu és mtsai és mtsai, 2014a). Ennek megfelelően PV kosárjeitek szabályozzák a principális idegsejtek aktivitását és hálózatuk meghatározó szerepet játszik a környező sejtszövetek működésének szabályozásában, környező idegsejtek összehangolt aktivitásának kialakulásában és ezáltal az oszcillációs mintázatok kialakulásában (Fuchs és mtsai és mtsai, 2007; Hu és mtsai és mtsai, 2014b).

A kosárjeitek másik típusa, a kolecisztoxin pozitív (CCK+) IN-ok, amelyek plazmatikus finomhangoló szabályozóként működnek, sejtszövetek szinkron működését modulálják a szubkortikális bemenetek függvényében, amelyek információt hordoznak a motivációról, az érzelmekről és az állat autonóm állapotáról (Freund and Buzsáki, 1996; Freund and Katona, 2007; Freund és mtsai és mtsai, 2003). Ezek az interneuronok 3-as típusú vezikuláris glutamát transzportert (vGluT 3) is kifejeznek szómájukban és terminálisaikban (Somogyi és mtsai és mtsai, 2004), valamint preszinaptikusan 1-es típusú kannabinoid receptorokat (CB1) (Katona és mtsai és mtsai, 1999).

A kosárjeiteken kívül, a periszomatikus régiót célzó IN-ok másik típusa a kandeláber- vagy axo-axonikus sejtek (AAS), amelyek a piramisjeitek axonjának kezdeti szakaszára (axon iniciális szegmentjére) adnak gátló szinapsziseket. Az AAS becslések szerint a CA1 hippokampális IN-ok ~4% -át (~1500 sejt) teszik ki, tehát az összes CA1 neuron 0,04% -át képviselik (Bezaire & Soltesz 2013). Axonjaik akár 1200 piramisjeitet is beidegezhettek, valamint egyetlen piramisjeit AIS-en átlagosan 2–15 boutonnal létesítenek szinapszist (Buhl és mtsai és mtsai, 1994; Freund és mtsai és mtsai, 1983; Pelkey és mtsai és mtsai, 2017).

b. Dendritikus interneuronok

Dendritikus IN-oknak a piramis sejtek dendritjeit célzó gátló idegsejteket nevezzük, amelyeknek legalább nyolc típusát különböztetjük meg (Klausberger and Somogyi, 2008). Elhelyezkedésüket tekintve, sejttestjeik a HC bármely rétegében megtalálhatóak, dendritjeik a hippokampusz különböző rétegeiben lokalizálódnak, axonjaikkal a piramis sejtek különböző dendritszakaszait célozzák meg (Pelkey és mtsai és mtsai, 2017; Vida és mtsai és mtsai, 1998), valamint több neurokémiai markert is azonosítottak ezekben a sejtekben. Egyik ilyen, meghatározó neuropeptid a szomatosztatin (SOM), amely több IN típusban is megtalálható, így az oriens-lacunosum moleculare IN-okban (OLM), a kétrétegű axonarborizációval rendelkező (bisztrifikált) sejtekben a CA1-3 régiókban, valamint a HIPP és HIL sejtek a gyrus dentatusban. Az OLM sejtek sejttestje és dendritjei a stratum oriensben találhatóak, axonjaikkal a stratum lacunosum-moleculareban a piramis sejtek legtávolabbi dendritjeit idegzik be. Meghatározó szerepük van a hippokampális piramis sejtek aktivitásának szabályozásában, mert fő serkentő bemenetüket a piramis sejtek kollaterálisai adják és rajtuk keresztül jön létre egy negatív visszacsatoló gátló kör a piramis sejteken (Blasco-Ibáñez and Freund, 1997; Klausberger és mtsai és mtsai, 2004).

A CCK+ dendritikus gátló IN-ok között vannak olyanok, amelyek a piramis sejtek apikális dendritjét beidegzik be, mások a piramis sejtek apikális és bazális dendritjeire érkező Schaffer-kollaterálisokkal és a commissurális pályával asszociáló axonarborizációval rendelkeznek (Buhl és mtsai és mtsai, 1994; Gulyás és mtsai és mtsai, 1993). A dendritikus IN-okban egyéb sejt-specifikus markert is azonosítottak, mint a vGluT 3-at, a neuronális nitrogénmonoxid-szintáz (MOP sejtek), a calbindint, a calretinint, valamint a neuropeptid Y-t (neurogliaform) (Freund és Buzsáki, 1996; Pelkey és mtsai, 2017).

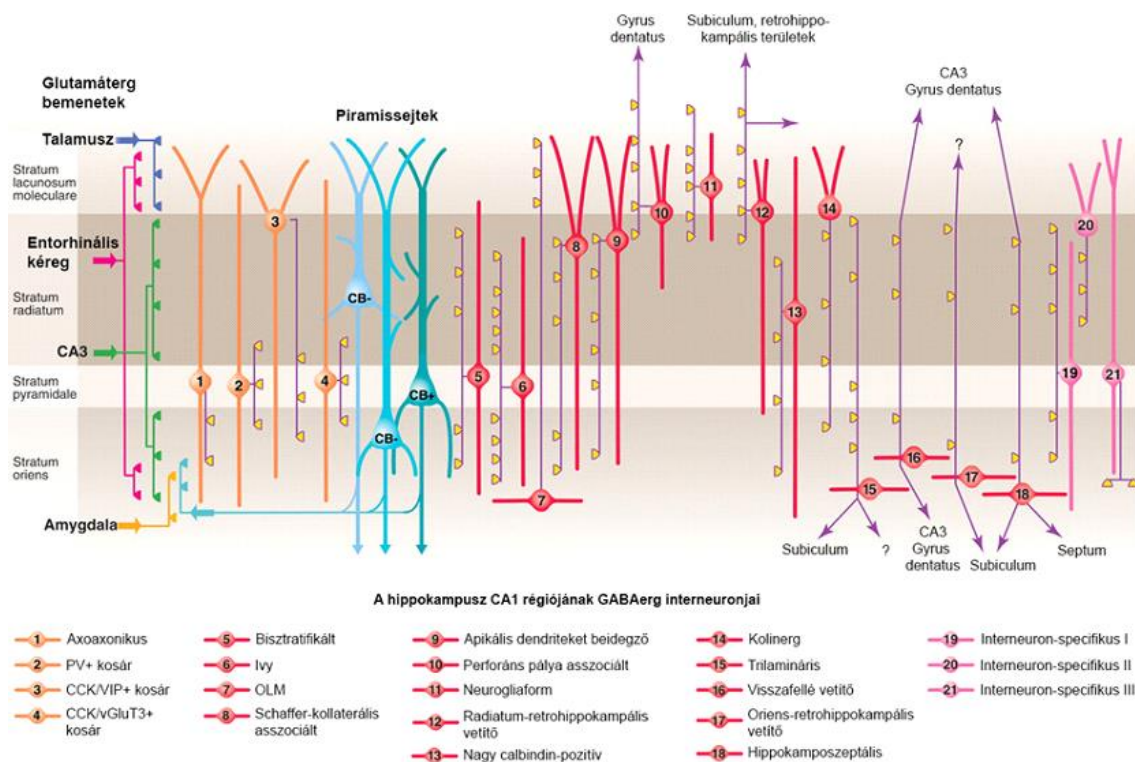
c. Interneuron-specifikus interneuronok

Az IN-specifikus IN-ok sejttestje és dendritjei a stratum pyramidale, illetve radiatum rétegekben helyezkednek el és célzottan meghatározott IN-okkal létesítenek szinaptikus kapcsolatokat. Három különböző típust különböztetünk meg, amelyek az 1-es típusú calretinint expresszáló multipoláris sejtek, a 2-es típusú vezikuláris vazoaktív intestinalis peptid (VIP)-et kifejező sejtek, végül a 3-as típusú, mindkét markert tartalmazó sejtek,

amelyek jelentős bemenetet kapnak szubkortikális magokból (Acsády és mtsai, 1998; Gulyás and Freund, 1996; Papp és mtsai, 1999).

d. Vetítő interneuronok

A vetítő sejteknek legalább öt különböző típusát különböztetjük meg (Klausberger és Somogyi, 2008), sejttestjeik jellemzőn a stratum oriensben találhatóak, dendritjeik minden rétegben áthaladnak (Gulyás és mtsai és mtsai, 2003; Jinno és mtsai és mtsai, 2007; Takács és mtsai és mtsai, 2008; Tukker és mtsai és mtsai, 2007). Neuronális markereik jellemzően a COUP-TF-II. transzkripciós faktor, a szomatosztatin (SOM) vagy a muszkarinos acetilkolinreceptor 2-es típusa (M2) (Hájos and Freund, 2002; Hájos és mtsai és mtsai, 1996; Jinno and Kosaka, 2006; Katona és mtsai és mtsai, 2017); axonjaikkal a MS-ba, a szubikulumba és az entorhinális kéregbe, valamint a CA3 vagy a gyrus dentatusba vetítenek és szerepet játszanak az információfeldolgozás és a hálózati aktivitás szabályozásában (Gulyás és mtsai, 2003; Jinno és mtsai, 2007; Katona és mtsai, 2017; Mattis és mtsai, 2014; Melzer és mtsai, 2012; Takács és mtsai, 2008; Tukker és mtsai, 2007).



3.ábra: A hippocampusz CA1-es régiójában található piramissejteket (kék) legalább 21 különböző típusú interneuron idegzi be. A piramissejtek szomatikus régióját beidegző

interneuronok: axonaxonikus IN, PV+ kosársejt, CCK/VIP+ kosársejt, CCK/ vGluT 3+ kosársejtek (sorrendben 1-4, narancssárga). Dendritikus gátlósejteket, melyek egy része távoli projekciókat is ad, pirossal, az interneuronokat beidegző interneuronokat rózsaszínnel jelöltük. A lila nyilak jelzik a projekciós axonok célpontját. A kép forrása: Neuronal Diversity and Temporal Dynamics: The Unity of Hippocampal Circuit Operations, Klausberger és Somogyi 2008. Engedéllyel módosítva és felhasználva.

I.2.3. Interneuronok működési zavarai Alzheimer-kórban

A hippocampusban a kalciumkötő-fehérjét, PV-t expresszáló IN-ok a GABAerg gátló neuronok változatos populációját képviselik, amelyek a piramissejteket elsősorban a szómán, az axon kezdeti szegmensén és a stratum radiatum, oriens vagy lacunosum-moleculare rétegekben található dendriteken idegzik be (Freund, Tamas F., Buzsáki, 1996; Jinno and Kosaka, 2000; Klausberger és mtsai, 2004; Somogyi and Klausberger, 2005; Tukker és mtsai, 2007). A legnagyobb interneuron populációt képviselik, amelyek a GABA_A receptorokon keresztül szerepet játszanak a jellegzetes állapot függő oscillációk kialakulásában (Ferando and Mody, 2015; Klausberger és mtsai, 2003; Kohus és mtsai, 2016).

A MS PV+ neuronjai szelektíven beidegzik a hippocampusban a GABAerg IN-okat (Freund és Antal, 1988) miközben a theta oszcilláció során a MS PV+ pacemaker sejtjei ritmikus aktivitást közvetítenek a hippocampusba a hippocampális interneuronok szinkronizálásán keresztül (Borhegyi és mtsai, 2004a; Hangya és mtsai, 2009). Emberekben a hippocampális PV+ idegsejtek megváltozása összekapcsolódhat a hiperexcitabilitással és az epilepsziával (DeFelipe, 1999; Karlócai és mtsai, 2014; Wittner and Maglóczky, 2017).

A korábbi irodalomban ellentmondásos változásokat figyeltek meg a Svéd mutációt tartalmazó egerek kalciumkötő-fehérjét (beleértve a PV-t is) expresszáló idegsejtjeinek számában és regionális érzékenységében mind a hippocampusban, mind pedig a MS-ban; valamint emberben is. APP^{swe}/PS1^{dE9} transzgenikus egereknél észlelhető mértékben növekedett a PV pozitív immunoreaktív sejtek száma (Verdaguer és mtsai, 2015). 14 hónapos APP/PS1 egerekben bemutatták, hogy a calbindin pozitív neuronok jobban érintettek a betegségben, mint a PV, valamint al régió és réteg-specifikus változások voltak felfedezhetőek, a PV és calretinin pozitív neuronok számában (Popovi

és mtsai, 2008). A PV idegsejtek szignifikáns csökkenése volt jellemző APP/PS1 egerek hippocampusának CA1-2 és DG régióira, és posztmortem humán agyban is (Brady and Mufson, 1997; Takahashi és mtsai, 2010). Emberben az entorhinális kéreg kaudolaterális részében, a II.-III. rétegi PV+ sejtek egyértelmű atrófiát mutattak (Mikkonen és mtsai, 1999). 18 hónapos TauPS2APP egerekben a septo-hippokampális projekciók és cél neuronjaik vizsgálata során szignifikáns neurodegenerációt fedeztek fel a MS hippocampusba vetítő PV+ GABAerg sejteiben, valamint a hippocampusban található célsejtjeikben egyaránt, miközben al régiótól és altípustól függően a kolinerg rostok változatlan maradtak (Loreth és mtsai, 2012).

A SOM összekapcsolódott az AK etiológiájával. A SOM az amiloid-béta legfontosabb bontóenzimének, a neprilizinnek az expresszióját és szinaptikus lokalizációját szabályozza (Hama and Saido, 2005; Saito és mtsai, 2005; Saiz-Sanchez és mtsai, 2015; Solarski és mtsai, 2018) alapvetően meghatározó AK-ban. Az emberi posztmortem agykból származó morfológiai vizsgálatok azt mutatták, hogy az amiloid plakkok többsége SOM+, duzzadt profilokat tartalmazott (Morrison és mtsai, 1985) és kimutatták a SOM jelenlétét disztrófiás neurit plakkokban (D.M. Amstrong, 1989).

A SOM+ idegsejtek neurodegenerációja szerepet játszhat a szinaptikus plaszticitás gyengülésében, és a félelmi memória és a tanulási folyamat hiányosságaihoz vezethet (Lovett-Baron, 2014). Ezenkívül számos tanulmány korábban bemutatta, hogy a SOM+ IN-ok száma a különféle AK modell egerek hippocampusában jelentősen csökkent (Ramos és mtsai, 2006; Silva Albuquerque és mtsai, 2015; Stanley és mtsai, 2012). Mivel a neprilizin bontóenzim expresszióját a SOM jelenléte befolyásolja, az életkorral csökkenő számú SOM IN hatásának szintén szerepe lehet az amiloid-béta felhalmozódásában (Saito és mtsai, 2005).

I.3 A mediális szeptum funkcionális anatómiájának rövid összefoglalása

I.3.1. A mediális szeptum jelentősebb sejtpopulációi és azok vetítése

A mediális szeptum – Broca-féle diagonális köteg (MS-DBB) a harmadik kamra előtt elhelyezkedő, középvonali agyterület, amely a lamina terminalis és a septum pellucidum területén helyezkedik el; rostrálisan és dorzálisan a corpus callosum, laterálisan az agykamrák és a nucleus accumbens, kaudálisan a fornix határolja (Paxinos, G and

Franklin, 2012). A MS-ban számos különböző neurokémiai tulajdonságú sejtsoprot különböztetünk meg.

a. Acetilcolin tartalmú sejtek:

Az egyik legnagyobb és egyik fő projekciós sejt populáció (Frotscher és mtsai, 1986), amely kolin-acetiltransferáz (ChAT) immunreakció alapján különíthető el a többi sejtől, lassú tüzelési aktivitás jellemző rájuk (Sotty és mtsai, 2003; Vandecasteele és mtsai, 2014). Vékony rostjaikkal a hippocampusban IN-okat és piramissejteket is megcéloznak (Kiss és mtsai 1990; Nyakas és mtsai 1987; Freund és Antal, 1988), neuroligin-2 (NL2)-tartalmú szinapszisokat hoznak létre (Aznavour és mtsai, 2005; Takács és mtsai, 2013; Umbriaco és mtsai, 1995). Kimutatták, hogy a bazális előagyi kolinerg sejtek egy része GABA ürítésére is képesek az agykéregben (Takács és mtsai, 2018)

b. GABA tartalmú sejtek:

A GABA tartalmú sejtek egyik típusa a PV+ sejtek, melyek projekciós neuronok (Freund és mtsai, 1989), és vagy gyorsan vagy csomagokban tüzelnek (Manseau és mtsai, 2008; Sotty és mtsai, 2003), hippocampális IN-okat idegeznek be (Borhegyi és mtsai, 2004b; Hangya és mtsai, 2009). Elhelyezkedésüket tekintve a PV+ sejtek többnyire a belső, míg a kolinerg sejtek a PV-osak körül a külső réteget foglalják el a MS-ban (Kiss és mtsai, 1990). Kutatócsoportunk nemrégiben megjelent cikkében bemutatjuk, hogy a medián raphe vGluT2 sejtjei erős beidegzést adnak a MS- diagonális köteg vertikális ágának területére és szelektíven a PV+ GABAerg sejteken végződnek (Szőnyi és mtsai, 2019). Ez a kapcsolat kiemelt jelentőséggel bírhat abban, hogy a negatív élmények során a memóriarögzítésért felelős rendszereket megfelelő állapotra hangolja (Borhegyi és mtsai, 2004a; Vertes and Kocsis, 1997). A GABA tartalmú sejtek másik típusa a calbindin tartalmú sejtek, melyek főként lokális kollaterálisokat adnak, de az entorhinális kéregbe is küldenek rostokat (Aznar és mtsai, 2004; Fuchs és mtsai, 2016; Kiss és mtsai, 1997b).

c. Vezikuláris glutamát transzporter 2-es típusát (vGluT2) tartalmazó sejtek:

Ez a serkentő sejt populáció a rostjaival, a szeptohippokampális pálya mintegy negyedét alkotja (Huh és mtsai, 2010; Sotty és mtsai, 2003), jellemzően a stratum oriens

IN-jait célozza meg, de az entorhinális kéregbe is vetít, ahol többnyire piramissejteket talál meg (Fuhrmann és mtsai, 2015; Justus és mtsai, 2016; Manns és mtsai, 2001; Robinson és mtsai, 2016).

d. A szeptumban található egyéb sejttípusok:

Említeném még a SOM, neurotensin, enkephalin, calcitonin génnel rokon peptid , vazointesztinális peptid , neuropeptid Y CCK, luteinizáló hormont serkentő hormon tartalmú sejteket, mint kisebb részben előforduló szeptális sejtpopulációt (Dobolyi és mtsai, 2005; Frankfurt és mtsai, 1986; Gall and Moore, 1984; Gau és mtsai, 2002; Köhler and Eriksson, 1984)

I.3.2 A szepto-hippokampális kolinerg rendszer és az Alzheimer-kór

A bazális előagyból (BF) származó ChAT idegsejtek biztosítják a kolinerg beidegződés fő forrását az agykéregben és a hippokampuszban, és kulcsszerepet játszanak az emlékezésben és a figyelem működésében (Hasselmo and Bower, 1993; Jones, 1993; Mesulam és mtsai, 1983). Ahogyan az a bevezetőben is részben említésre került, számos tanulmány kimutatta, hogy a BF kolinerg sejtek, illetve azok projekciójának diszfunkciója vagy elvesztése az AK patogenezisének legkorábbi kóros eseményei közé tartozik (Foidl és mtsai, 2016; Geula és mtsai, 2008; H. Ferreira-Vieira és mtsai, 2016; Hampel és mtsai, 2018; Nyakas és mtsai, 2011; Schliebs and Arendt, 2006). A kolinerg rendszer degenerációja az AK patológiájának tipikus jellemzője (Sims és mtsai, 1983; Wilcock és mtsai, 1982) és ezeknek a betegeknek gyakran epilepsziás rohamaik vannak (Amatniek és mtsai, 2006). Valójában, a MS kolinerg vetítésének szelektív léziója növeli a rohamok előfordulását a hippokampuszban a (Ferencz és mtsai, 2001; Freund és mtsai, 1989; Silveira és mtsai, 2000) míg a REM-alvás, amely a fokozott kolinerg sejt aktivitással jár együtt (Zhang és mtsai, 2010), elnyomó hatást gyakorol az epilepsziás rohamokra (Crespel és mtsai, 1998; Frauscher és mtsai, 2016). Többek között ezek az eredmények vezettek a „kolinerg hipotézis” kialakulásához (Francis és mtsai, 1999).

Gau és kollégái megvizsgálták a preszinaptikus kolinerg markerek előfordulását Tg2576 Alzheimer modell egerek agyában (ezek a humán APP svéd mutációját tartalmazzák, hasonlóan az APP^{NLF} transzgenikus egerekhez) és megállapították, hogy

14, 18 és 23 hónapos korban nem volt szignifikáns különbségek a vad típusú és a transzgenikus egerek között a ChAT és az AChE aktivitásban, a vezikuláris acetilkolin transzporter (vAChT) kötődésben vagy a nagyaffinitású kolin felvételi helyekben a kéregben, a hippocampusban (Gau és mtsai, 2002). Wenk bemutatta, hogy fiatal, vad típusú egerek előagyában a TNF- α krónikus infúziója széleskörű gyulladást váltott ki (mint az AK esetében is jellemző). Megismételte ezt a kísérletet transzgenikus egerekkel összehasonlítva, de azok nem tértek el egymástól, azaz a kortikális ChAT aktivitás csökkenése statisztikailag egyenértékű volt az összes egérben. Ez az eredmény összeegyeztethető azzal a hipotézissel, miszerint az APP humán transzgenjének jelenléte nem járul hozzá az elülső agyi kolinerg neuronok sebezhetőségéhez (Wenk és mtsai, 2004). AK-ban szendvedő emberben is mutattak ki megvastagodott, disztrófiás kolinerg axonterminálisokat (Geula és mtsai, 2008). A kolinerg rendszer degenerációja az Alzheimer-kór patológiájának tipikus jellemzője (Sims és mtsai, 1983; Wilcock és mtsai, 1982), és ezeknek a betegeknek gyakran epilepsziás rohamaik is vannak (Amatniek és mtsai, 2006).

II. CÉLKITŰZÉS

Az AK vizsgálatára számos egérmodellt hoztak létre, ahol a fokozott amiloidózis nem specifikusan történt, hanem az állat minden sejtje kifejezte az APP-t, így az azokból származó adatok nem teljesen a valóságot tükrözték. A dolgozatban szereplő kísérletekben egy új KI modellt használtunk, az APP^{NLF} törzset, amely endogén módon, természetes egér promóter által vezérelt humán APP svéd és ibériai mutációit hordozza, amely megemeli az A β 40 és A β 42 teljes mennyiségét, valamint az A β 42 és A β 40 izoformákat olyan arányban fejezik ki, amely jellemző az emberi AK esetében. Ez teszi az APP^{NLF} egereket a legrealisabb modellekké, az A β agyra gyakorolt hatásainak vizsgálatához. Az A β felgyülemzése, az amiloidózis következtében neuroinflammációs elváltozások kialakulnak ki, a dolgozat első részében az ezzel járó folyamatokat mutatom be.

Kérdések:

- 1a) Milyen az APP^{NLF} egerek életkor függő A β felhalmozódása ?**
- 1b) Milyen gyulladáscsökkentő sejttípusok és elváltozások vannak a plakkok környezetében?**
- 1c) Mely hippokampális IN típusok érintettek a disztrófiás neuritek megjelenése által?**

Az APP^{NLF} egerekben 12 hónapos korban jelennek meg az első plakkok a hippokampuszban, jellemzően a str. oriens és str. lacunosum-moleculare rétegekben. Számos GABAerg IN helyezkedik el ezen területeken, dolgozatomban azonban kiemelek két, a hippokampusz memóriaképzésének szabályozásában kritikus szerepet betöltő gátló sejttípust: a periszomatikus PV+ és a dendritikus SOM+ IN-okat. Korábbról már ismert, hogy a GABAerg szinapszisokat és a GABA_A receptorokat az AK befolyásolja, a szinaptikus plaszticitás változásai pedig hatással vannak a szinapszisok erősségére és tartósságára, valamint a szinaptikus rés méretére. Idős APP^{NLF} és VT állatok szinapszisait vizsgálva a következő kérdéseket tettük fel.

Kérdések:

- 2a) Hogyan változik a hippokampális PV+ és SOM+ IN-ok száma és megjelenése?**
- 2b) Hogyan változnak a különböző típusú hippokampális gátló szinapszisok paraméterei?**

A kolinerg rendszer sérülékenysége jól ismert AK-ban, azért megvizsgáltuk a hippocampusban található kolinerg rostokat egészséges állatokban is. Megvizsgáltuk, hogy a hippocampusban található kolinerg terminálisok alkotnak-e szinapszisokat. A szinapszisokat neuroligin 2 (NL2) jelöléssel azonosítani tudtuk. Mivel ez egy GABAerg szinapszisokra jellemző fehérje, megvizsgáltuk, hogy ezek a szinapszisok tartalmazzák-e a GABAerg jelátvitelhez szükséges fehérjéket.

Kérdések:

3a) Létesítenek-e a bazális előagyból származó kolinerg rostok szinapszisokat a hippocampusban?

3b) Rendelkeznek-e a szepto-hippokampális kolinerg axonok GABAerg tulajdonságokkal?

3c) Van-e hatással az $A\beta$ felhalmozódása a szepto-hippokampális rostokra?

III. MÓDSZEREK

III.1. Etikai állásfoglalás

Minden kísérletet a Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet (KOKI) Etikai Kódexe és a kísérleti állatok védelméről szóló hatályos magyar törvény (1998, XXVIII, 243./1998 bekezdés) alapján végeztünk, mely összhangban van az Európai Unió által 2010. szeptember 22-én elfogadott irányelvekkel (2010/63/EU). A kísérleteket az KOKI Állatkísérleti Bizottsága és a Pest Megyei Kormányhivatal a PE/EA/665-2/2017 (Alzheimer) és PE/EA/2552-6/2016 (Kolinerg) ügyiratszámom engedélyezte. Minden erőfeszítést megtettünk az állatok esetleges diszkonfortjának minimalizálása végett és az állatok számának csökkentése érdekében.

III.2. Felhasznált kísérleti állatok

A disszertációban bemutatott kísérletek során az APP^{NLF} egerekből minden esetben hímeket, míg a kolinerg terminálisok vizsgálatánál mindkét nemhez tartozó egereket használtunk, melyek különböző típusú törzsekbe tartoztak. Ezen egértörzsek típusát, a kísérletenként felhasznált állatok darabszámát és az állatok származási helyét az **1. táblázat** mutatja.

1. táblázat: A kísérletek során felhasznált állattörzsek típusa és származási helye és a felhasznált állatok darabszáma.

Egértörzs	Kísérlet típusa	Darabszám	Származási hely
APP ^{NLF}	anatómia	50	Riken, MTA KOKI
APP ^{NLF} x BAC-PV-eGFP	sztereológia,	6	
APP ^{NLF} x Pvalb-IRES-Cre	szeptohippokampális rostok jelölése	6	
C57BL/6J (25–80 nap korú, hímek)		21 darab	MTA KOKI
ChAT-IRES-Cre		51 darab, RRID: IMSR_JAX:006410	Jackson Laboratories
vGAT-IRES-Cre/Gt(ROSA)26Sor_CAG/ZsGreen 1		4 darab	MTA KOKI

III.3. Sztereotaxiás műtétek

A ChAT-Cre és az APP^{NLF} x Pvalb-IRES-Cre egereket a műtét kezdete előtt izoflurán (Forane, Abbvie) gőzével elbódítottuk, majd intraperitoneális altatókóktél injekciót kaptak (8.3 mg/ml ketamin és 1.7 mg/ml xylazin-hidroklorid fiziológiás sóoldatban, 10ml/ttkg mennyiségben). A műtéti anesztézia elérése után az egereket egy sztereotaxiás készülékbe fogtuk.

A ChAT-Cre egerek esetében szepto-hippokampális axonok szelektív jelöléséhez 30–60 nl AAV2/5-EF1a-DIO-eYFP (UNC Vector Core) vagy AAV2/5-EF1a-DIO-ChR2(H134R)-eYFP-WPRE-hGH (plasmid: Addgene 20298, Penn Vector Core) vírust injektáltunk a MS területére. Az APP^{NLF} x Pvalb-IRES-Cre esetében a hippokampális PV IN szelektív jelöléséhez 2x60nl AAV2/5-EF1a-DIO-mCherry vírust injektáltunk egyoldali dorzál hippokampuszba: Br-1.8, y-1.2, z-1.8 és Br-2.4, y-2.0, z-1.9 koordináták szerint. A szepto-hippokampális PV+ axonok szelektív jelöléséhez 30 nl AAV2/5-EF1a-DIO-eYFP vírust (UNC Vector Core) injektáltunk a MS-ba.

A szeptális injektálásokhoz szükséges koordináták Paxinos és Franklin egér sztereotaxiás atlasza (Paxinos, G and Franklin, 2012) alapján lettek meghatározva, mely a Bregmától 1 mm-re anterior, a középvonalban, a bregma és a lambda által meghatározott horizontális síktól (nullszint) 4.3 mm-re ventrálisan helyezkedtek el. A kolinerg beadások kontroll kísérleteihez, ugyanezekből a vírusokból 100 nl került injektálásra ChAT-Cre egerek mindkétoldali hippokampuszába (koordináták: -2.7mm a bregmától, ±2.5mm a középvonaltól, 2.5mm a nullszinttől, valamint -3.1 a Bregmától, ±3mm a középvonaltól and 3mm a nullszinttől). A műtétekhez eNanoject 2010 típusú mikroinjektor pumpát (WPI, Sarasota, FL 34240), és a hozzá tartozó boroszilikát mikropipettákat használtunk (Drummond, Broomall, PA, USA), melyek hegyét 40-50µm vastagságúra törtük.

A műtétek befejezése után az egerek 0.03-0.05 mg/ttkg meloxicam (Metacam, Boehringer-Ingelheim, Németország) injekciót és 0.5-0.7 ml fiziológiás sóoldatot kaptak intraperitoneálisan, majd elkülönítve, ketrecekben épültek fel a perfúzióig.

III.4. Állatok kezelése, szövetek előkészítése a kísérletekhez

Az egereket izoflurán használatával elbódítottuk, majd intraperitoneális altatókoktél injekció segítségével altattuk el (8.3 mg/ml ketamin, 1.7 mg/ml xylazin-hidroklorid és 0.8 mg/ml promethazinium-klorid fiziológiás sóoldatban). A teljes anesztézia elérése után az állatokon transzkardiális perfúziót hajtottunk végre: az elektronmikroszkópos és a fluoreszcens immunjelöléshez 2 percig fiziológiás sóoldatot, 40 percig 4%-os frissen beoldott paraformaldehidet, majd 10 percig 7.4-es pH-jú 0.1M-os foszfát puffert (PB) keringettünk át rajtuk. A perfúzió végeztével az állatok agyát eltávolítottuk a koponyából, majd a vizsgálni kívánt régiókból vibratóm segítségével (VT1200S, Leica, Németország) metszeteket készítettünk. A kolinerg rostok rekonstrukciója során felhasznált vad-típusú egér fixálójához 0.5% glutáraldehidet (GA) is adtunk. A beágyazás után GABA-jelöléshez felhasznált, két vad típusú egeret érrendszerét először 2 percig fiziológiás sóoldattal mostuk át, majd 2% PFA és 2% GA tartalmú 0.1M nátrium acetát pufferoldattal (pH 6.5) 2 percig, amit 2% PFA és 2% GA tartalmú 0.1M nátrium borát pufferoldat (pH 8.5) követett 1órán keresztül. Az agyat eltávolítottuk a koponyából és utófixáltuk egy éjszakán keresztül 4°C-on, 2% PFA/ 2% GA tartalmú 0.1M nátrium borát pufferoldatban (pH 8.5). A gephyrin és GABA_A receptorok elektronmikroszkópos és immunfluoreszcens kimutatásához az egereket jéghideg, oxigenizált mesterséges agy-gerincvelői folyadékkal transzkardiálisan perfundáltuk [összetétele: (mM) NaCl 125, KCl 2.5, CaCl₂ 2.5, MgCl₂ 2, NaHCO₃ 26, NaH₂PO₄ 1.25, glükóz 25]. Ezt követően az agyakat eltávolítottuk a koponyából, blokkokra vágtuk, amelyek tartalmazták a hippocampusokat (külön a két felet) és a MS területét. A blokkokat 4% PFA és 0.2% GA tartalmú fixálóban inkubáltuk 90 percig 4 °C-on, majd ezt követően 2% agarózba ágyaztuk metszés céljából. 50 µm vastagságú, koronális metszeteket készítettünk vibratóm segítségével.

A 3D blokk-felszíni sorozatmetszet pásztázó elektronmikroszkópiához (BF-SEM) használandó egereket mély izoflurános anesztézia után dekapitáltuk. Az agyakat jégen eltávolítottuk a koponyából, majd egy hosszanti és koronális metszésekkel 6 részre vágtuk és immerziósan fixáltuk 2% PFA, 1% GA és 15% telített pikrinsav tartalmú 0.1M PB 2 órán keresztül, szobahőmérsékleten, amelyet követően a fixáló kimosása követett 0.1M PB-rel. A hippocampusokat tartalmazó agy blokkokból 150 µm vastag metszeteket készítettünk.

A metszeteket a metszés után 0.1M-os PB-ben mostuk, majd 10%-os és 30%-os szacharóz oldatban tartottuk legalább 2-2 órán keresztül. Az immunhisztokémiai kísérletek megkezdése előtt a metszeteket 3 alkalommal folyékony nitrogén gőze felett megfagyasztottuk, majd 0.1M PB-ben mostuk őket tovább.

III.5. Használt antitestek jellemzése

A kísérleteinkben használt primer antitesteket, valamint azok koncentrációit és specifikusságukra vonatkozó információk az **2. táblázatban** foglaltam össze. A másodlagos antitesteket is alaposan teszteltük (**3. táblázat**) a lehetséges keresztreaktivitás szempontjából a többi szekunder vagy primer antitesttel, a lehetséges szövettel a primer antitestek nélküli jelölést szintén teszteltük, hogy kizárjuk az autofluoreszcenciát vagy a háttér specifikus jelölése a másodlagos antitestekkel. Nem figyeltünk meg nem-specifikus festést ezen a kontroll körülmények között.

III.6 Fluoreszcens immunhisztokémia és konfokális lézer-pásztázó mikroszkópia

Az 50 µm vastagságú metszetek a korábban leírt előkészítés után azokat tris-pufferelt fiziológiás sóoldatban (TBS) alaposan átmostuk, majd egy órán keresztül TBS-ben oldott 1%-os humán szérum albuminnal (HSA, Sigma-Aldrich) blokkoltuk őket, elkerülendő a primer antitestek aspecifikus kötődését a szövethez. A blokkolás után a metszeteket 3 napig, 4 °C-on, a primer antitesteket tartalmazó TBS-alapú oldatban inkubáltuk. Ezután TBS-sel alaposan átmostuk, majd a szekunder antitesteket tartalmazó TBS-alapú oldatokban egy éjszakán keresztül inkubáltuk őket. Végül alaposan kimostuk a metszeteket TBS-ben, majd 0,1M PB-ben és tárgylemezre szárítottuk, ezt követően Aqua-Poly/Mount (Polysciences) segítségével lefedtük őket. Az immunfluoreszcens jelöléseket Nikon A1R lézer-pásztázó konfokális mikroszkóprendszer segítségével értékeltük ki, mely egy Ti-E fordított elrendezésű mikroszkópra épült, egy 0.45 NA CFI Super Plan Fluor ELWD 20XC, illetve CFI Plan Apochromat VC 60XH olajimmerziós (numerikus apertúra: 1.4) Nikon objektívekkel. A mikroszkópot a NIS-Elements AR 4.3 szoftver vezérelte. Zöld argon ion lézert (457–514 nm, 40 mW), sárga DPSS lézert (561 nm, 20 mW), ibolya dióda lézert (405 nm) és egy távoli vörös dióda lézert (647 nm, 100 mW) (CVI Melles Griot), használtunk a

2. táblázat: A kísérletek során felhasznált primer antitestek jellemzése. Az egyéb referenciákat (KO tesztek, specifikáció) a dolgozathoz tartozó publikációk tartalmazzák.

Antigén	Gazdaállat	Hígítás (fluoreszcens)	Hígítás (beágyazás előtt)	Forrás
Kolin- acetil-transzferáz (ChAT)	egér	1:400-500	1:750 (DAB)	Dr. Costantino Cozzari
GABA	nyúl		1:10 000	Dr. Peter Somogyi
GABA A Receptor gamma 2 alegység	nyúl		1:1000 -	Synaptic Systems 224003
Gephyrin	egér	1:500	1:100	Synaptic Systems 147021
Zöld fluopreszcens fehérje (eGFP)	csirke		1:2000	Molecular Probes A10262
NEUROLIGIN 2 (NL2)	nyúl		1:600	Synaptic Systems 129203
Kannabinoid 1-es típusú receptor (CB1)	kecske		1:2000	Dr. Masahiko Watanabe
Vezikuláris acetilkolin transzporter (VAcHT)	nyúl	1:3000	1:5000	Synaptic Systems 139 103
Vezikuláris acetilkolin transzporter (VAcHT information)	kecske	1:10 000	1:10 000	Immunostar 1308002
Vezikuláris GABA transzporter (VGAT)	tengeri malac	1:2000		Synaptic Systems 131004
GFP	nyúl	1:2000		Molecular Probes A11122
PV	egér	1:1000		Dr. Kenneth Baimbridge
PV	nyúl	1:2000		SWANT 235
GAD65	egér	1:250		Millipore (clone: GAD6) MAB351
Gephyrin	nyúl	1:2000		Synaptic Systems 147008 RbmAB7a
Vezikuláris acetilkolin transzporter (VAcHT)	tengeri malac	1:1000		Synaptic Systems 139 105
Szinaptofizin	egér	1:1000		Sigma Aldrich, clone: SVP-38, S5768
Vezikuláris GABA transzporter (VGAT)	nyúl	1:1000		Synaptic Systems 135 302
Amiloid-béta (MOAB-2)	egér	1:500		Abcam ab126649
IBA1	nyúl	1:1000		FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, 01919741
GFAP (glia fibrilláris savas protein)	csirke	1:1000		Synaptic Systems 173006
mCherry	nyúl	1:2000		BioVision 5993-100
Biotinilált Wisteria Floribunda Lektin (PNN)	lektin	1:5000		Vector Laboratories B-1355, lot: Y0409
parvalbumin (PV)	nyúl	1:2000	1:2000	SWANT 235
parvalbumin (PV)	egér	1:1000	1:1000	Dr. Kenneth Baimbridge
tirozin-hidroxiláz (TH)	egér		1:2000	ImmunoStar 22941
Vezikuláris GABA transzporter (VGAT)	tengeri malac		1:2000	Synaptic Systems 131 004
vGluT 1	tengeri malac		1:1000	Millipore AB5905
CB1 receptor	nyúl		1:1000	Cayman Chemicals 10006590
Szomatosztatin	tengeri malac	1:500	1:500	Synaptic Systems 366 004

3. táblázat: A kísérletek során felhasznált szekunder antitestek és egyéb reagensek jellemzése.

Szekunder antitestek, egyéb reagensek					
Konjugálva	Gazdaállat	Milyen állat ellen?	Hígítás	Forrás	Molekula
1.4 nm nanogold	kecske	nyúl	1:100- 1:300	Nanoprobes	Fab- fragment
10 nm nanogold	kecske	nyúl	1:1000	BBI solutions	
Ultraszám arany	kecske	egér	1:50	Aurion	
Biotin-SP	szamár	kecske	1:1000	JIL Inc. (Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc.)	
Biotin-SP	szamár	egér	1:1000	JIL Inc.	
Biotin-SP	szamár	kecske	1:1000	JIL Inc.	
Biotin-SP	szamár	nyúl	1:500	JIL Inc.	
Biotin	kecske	csirke	1:200	Vector Laboratories	
Biotin	szamár	tengeri malac	1:500	Vector Laboratories	
DyLight 405	szamár	egér	1:200	JIL Inc.	
DyLight 405	szamár	nyúl	1:200	JIL Inc.	
Alexa 488	kecske	csirke	1:500	Vector Laboratories	
Alexa 488	szamár	nyúl	1:500-1000	Life Technologies	teljes IgG
Alexa 488	szamár	csirke	1:1000	JIL Inc.	teljes IgG
Alexa 488	szamár	kecske	1:1000	JIL Inc.	teljes IgG
Cy3	szamár	egér	1:500	JIL Inc.	teljes IgG
Alexa 594	szamár	nyúl	1:500	JIL Inc.	teljes IgG
DyLight 549	szamár	tengerimalac	1:500	JIL Inc.	teljes IgG
Alexa 594	szamár	egér	1:500	Life Technologies	teljes IgG
Alexa 647	szamár	tengerimalac	1:500	JIL Inc.	teljes IgG
Alexa 647	szamár	enyúl	1:500	JIL Inc.	teljes IgG
Alexa 647	szamár	egér	1:500	JIL Inc.	teljes IgG
Cy5	szamár	kecske	1:500	JIL Inc.	
Alexa 594		Streptavidin	1:500	Molecular Probes	

fluorofórok gerjesztésére, a hozzájuk tartozó szűrőkkel. A kolinerger rostok dekonvolúcióját Huygens Professional szoftver alkalmazásával végeztük.

III.7. Beágyazás előtti egyszeres és kétszeres immunhisztokémia

A metszeteket a korábban leírt előkészítés után kétszer fagyasztottuk folyékony nitrogén felett és háromszor mostuk 0,1M PB-ban. A gephyrin immunjelöléshez a metszeteket 1% nátrium borohidrid tartalmú 0,1M PB-ben inkubáltuk 10 percig. A GABA_A receptorok detektálásához a metszeteket 2 mg/ml pepszin (Dako) tartalmú 0,2M

HCl oldatban inkubáltuk 37 °C-on 2–4 percig, közben a metszet minőségét folyamatosan kontrolálva. Alapos 0,1M PB és TBS kimosást követően a metszeteket egy órán keresztül TBS-ben oldott 1%-os HSA-ban blokkoltuk. A blokkolás után a metszeteket 3 napig a primer antitesteket tartalmazó TBS alapú primer oldatban inkubáltuk 2-3 napig, amelyben 0.05% nátrium-azidot is feloldottunk. Ezután a metszeteket alaposan átmostuk TBS-sel, majd egy órán keresztül blokkoló oldattal (Gel-BS) kezeltük, mely 0.2% hidegvízi hal bőrből kivont zselatint (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) és 0.5% HSA-t tartalmazott TBS-ben oldva. A blokkolás után a metszeteket egy aranszemcséhez kötött szekunder antitesteket tartalmazó Gel-BS oldatban inkubáltuk egy éjszakán keresztül.

A metszetek alapos TBS-sel történő átmosása után, a gephyrin és GABA_A receptorok detektálására használt metszeteken 15 percig 2%-os GA fixálást alkalmaztunk, hogy az aranszemcséket a szövethez rögzítsük. Ez követően avidin-biotinilált tormaperoxidáz komplex oldatban inkubáltuk (ABC Elite, 1:1:300, Vector Laboratories) egy éjszakán keresztül 4 °C-on, melyet TBS-ben, amelyet 7.6-os pH-jú tris pufferben (TB) történő mosás és 3,3'-diaminobenzidinben (DAB; Sigma-Aldrich) való inkubáció követett. A DAB-ot 1 ml-enként 2 µl 0.5%-os hidrogén-peroxid hozzáadásával hívtuk elő. Az immunperoxidáz reakciót alapos, 0.1M PB-ben történő mosás követte, majd a gephyrin és a GABA_A receptorok kimutatására használt metszeteket intenzifikálás előkészítő oldatban (ECS; Aurion) inkubáltuk. Az immunarany jelölést ezüst-intenzifikálással tettük erősebbé (SE-EM kit; Aurion) 40-60 percig szobahőn.

A metszeteket végül 0.5%-os ozmium-tetroxid oldattal kezeltük jég felett és felszálló alkohol sorral és acetonitrillel víztelenítettük. A víztelenítés során a metszeteket 1%-os uranilacetáttal kontrasztoltuk 20 percig. A metszeteket végül epoxigyantába (Durcupan, ACM, Fluka, Buchs, Svájc) ágyasztuk.

A beágyazás után a metszetekből a vizsgálni kívánt területeket kivágtuk, azokat epoxigyanta blokkokra ragasztottuk, és ultramikrotóm (Leica EM UC6, Nussloch, Németország) segítségével 70 nm-es ultravékony metszeteket készítettünk belőlük, amelyeket Formwar-bevont gridekre szárítottunk rá. Az ultravékony metszeteket a hagyományos elektronmikroszkópos elemzés előtt ólom citrát oldattal kontrasztoltuk (Ultrostain 2, Leica). A mintákat Hitachi H-7100-as elektronmikroszkóp (Tokió, Japán) segítségével vizsgáltuk, a felvételek készítéséhez egy Veleta CCD-kamerát (Olympus Soft Imaging Solutions) használtunk.

III.8. A beágyazás előtti és utáni immuncitokémia kombinációja

A vAChT jelölés a fentebb leírt beágyazás előtti immunarany módszerrel jelenítettük meg. Váltakozó módon, 70 nm vastagságú metszeteket szedtük fel sorban réz- és nikkel gridekre (5–6 metszet/grid). A GABA immunfestését nikkel grideken végeztük módosított protokoll szerint. A metszetek inkubálását nedves Petri-csészékben lévő oldatcseppeken hajtottuk végre a következő sorrendben: 0.5% perjódsvav 5 percig szobahőmérséleten; 2 perc desztillált vízes (DV) mosás háromszor; 3perc TBS mosás; 15 perc in 1% ovalbumin tartalmú TBS-el való mosás 37-on °C; 8 perc TBS, 90 perc nyúlban termeltetett anti-GABA antiszérum (1:10,000 TBS-ben) 37 °C-on; kétszer 10 perc TBS; 10 perc 1% BSA és 0.05% Tween 20 tartalmú TBS; 90 perc szobahőmérsékleten 10 nm kolloid arany-konjugált kecskében termeltetett nyúl-elleni IgG (BBI solutions; 1:1000); 5 perc DV mosás háromszor; 20 perc 10% telített uranyl-acetát; 4 DV mosás; festés ólom citráttal; DV mosás. A beágyazás utáni GABA immunfestés maratási eljárása eltávolítja a beágyazás előtti vAChT ezüst csapadékát; ezért csak minden második elektronmikroszkópos gridet reagáltattuk a GABA-ra és a vAChT-pozitív terminálisok elemzésére úgynevezett tükröntechnikát alkalmaztunk. A metszetek a szomszédos nikkel- és rézgrideken szisztematikusan vizsgáltuk az immunarany jelöléssel ellátott vAChT-pozitív terminálisok azonosításához. Ezeket a terminálisok voltak azonosítva a következő griden, már GABA-jelöléssel, majd egymást követő metszetsorozaton követtük, és a digitális képeket 50 000-szeres nagyítással készítettük. A beágyazás utáni immunarany részecskéket megszámoztuk ezeken a GABA jelölt terminálisokon és Reconstruct szoftver segítségével (Fiala, 2005) megvizsgáltuk a mért felszínt.

III.9. Az axon szegmensek 3D rekonstrukciója

A kolinerg axonszegmenseket (n=17) 70nm vastag, egymást követő, kolin-acetil-transzferáz (ChAT; DAB) és neuroligin 2 (NL2; immunarany) kettős jelölés alkalmazásával VT egerekben (n=2), vagy eYFP (DAB) és gephyrin (immunarany) kettős jelölés alkalmazásával ChAT-Cre állatokban (n=2) rekonstruáltuk. A CB1+ axonok szintén 70 nm vastag, CB1 (DAB) és NL2 (immunarany) kettősen jelölt metszetekből voltak rekonstruálva. A DAB-t tartalmazó axonokat az egymást követő metszetsorozatokban követtük és mindegyikről 30000-szeres nagyítással digitális képek készültek. A plazmamembránoknak, a mitokondriumoknak, a DAB-tartalmú axonok

feltételezett szinapszisainak és a posztzinaptikus aranyrészecskéknek a 3D-s rekonstrukcióit a Reconstruct szoftver segítségével készítettük. A rekonstruált axonok ábráinak elkészítéséhez és 3D-s hosszuk méréséhez a Blender szoftvert használtuk.

III.10. Sejtsűrűség becslése APP^{NLF} egerekben

Immunfestés után, a 60 μ m vastagságú metszetekről Nikon Ni-E Eclipse fénymikroszkóppal, 10x objektívvel használatával képeket készítettünk. Nikon DS-Fi3 kamerával rögzítettük a képsorozatokat, a metszetek teljes vastagságában 5,6 μ m-es z-beli távolságot tarva. A pixelek mérete 0,57 μ m volt. A méréseket sztereológiai számolással hajtottuk végre 8 bites, szürkeárnyalatos képeken, a NIS-Elements AR 4.5 szoftver segítségével. Elsőként körberajzoltuk a hippokampuszok területét, és azokhoz tartozó területet a szoftver határozta meg. A mérések során, az összes PV IN-t megszámloltuk szisztematikus, véletlenszerűen kiválasztott metszetekben a CA1-3-ban és a gyrus dentatus-ban. A SOM IN-kat is szisztematikus, véletlenszerűen kiválasztott metszetekben a CA1 str. oriens rétegében számloltuk meg. Ezután az adatokat Microsoft Excelbe exportáltuk. Mivel néhány megszámlolt sejtet a metszetek felületén elvágtak, az Abercrombie korrekciót (Abercrombie, 1946) használtuk a potenciális túlmintavétel korrekciójára. A korrekcióhoz a képeket Zeiss Axioskop 2 mot plus fénymikroszkóppal, 40x objektívvel és Retiga 2000R kamerával készítettük. A metszet vastagságának és a sejtek átmérőjének mérését véletlenszerű mintavétellel végeztük a hippokampusz területén. A vastagságot az egyes metszetek öt pontján mértük és átlagoltuk. A sejtek átmérőjét az egyes metszetekben lévő 30 sejt átlagából számítottuk. A frakciók értéke 0,78 volt mind az APP^{NLF}, mind a VT egereknél. Az eredmények azt mutatták, hogy mindkét paraméter elhanyagolható különbséget mutatott az egyes állatokban, ám ennek ellenére a korrekciókat alkalmaztuk. A sejtsűrűség becsléséhez minden tizedik metszetet használtuk.

III.11. 3D blokk-felszíni sorozatmetszet pásztázó elektronmikroszkópia (BF-SEM)

Az immunreakciók és a dehidrációt követően, a BF-SEM által készített képeknél minél magasabb kontraszt elérése érdekében a metszeteket 0,75%-os kálium-ferrocianiddal redukált, 1%-os ozmium-tetroxiddal utófixáltuk 1 órán keresztül jégen, majd thiokarbohidrazid (TCH) inkubáció követte 30 percen keresztül. Ezután 1%-os

ozmium-tetroxid oldatban kezeltük a metszeteket 30 percen keresztül, majd ugyanennyi ideig 1%-os vizes uranyl-acetát oldatban, sötétben. Ezt a Walton-féle ólom aszpartát festés követte 30 percen keresztül 60 °C-on. Minden lépés után 5 x 3 perc DV mosás történt. Végül a metszeteket jégágyon dehidráltuk felszálló alkoholsorban (30%-os etanoltól abszolút etanolig), ahol minden lépés 2x8 percet vett igénybe, ezután acetonitrillel itattuk át 2x10 percen keresztül, először jégágyon, majd szobahőmérsékleten. Ezt követően a metszeteket alumínium csónakokba helyeztük át és gyantába (Epoxy Embedding Medium Kit, Sigma-Aldrich, kemény keverék) ágyasztuk őket estére. A következő napon üveg tárgylemezekre helyeztük át a metszeteket, amiket Aclar (Electron Microscopy Sciences) lapokkal fedtünk le, és kisütöttük őket 60 °C-on, 48 órán keresztül. Ezután a metszeteket epifluoreszcens mikroszkóppal (Zeiss Axioplan 2) vizsgáltuk meg kék fény alatt, hogy megkönnyítsük a metszetek közötti tájékozódást. Miután kiválasztottuk, és kivágtuk a számunkra használandó területet a CA1-es régióból pengével, rögzítettük egy alumínium korongra, majd CircuitWorks Conductive Epoxy (Ted Pella, CW2400) segítségével rögzítettük és kisütöttük 60 °C-on, 3 órán keresztül. A vezetőképes gyanta megszilárdulása után a mintát méretre (~ 400 µm x 400 µm x 75 µm) vágtuk ultramikrotómmal (EM UC6, Leica, Wetzlar, Germany), üveg kés segítségével, majd Rotary-Pumped Sputter Coater (Quorum Technologies, Q150R ES) használatával, 15 nm-es aranyözzel bevontuk a minta felületét. Az elkészült mintát pormentes tárolóba raktuk át, és a BF-SEM használata előtt legalább egy estére a vákuumkamrába helyeztük.

III.12. BF-SEM képképzés

A képképzés során egy in situ ultramikrotómmal („VolumeScope” , FEI, Eindhoven, The Netherlands) és visszaszórtelektron detektorral (BSE) felszerelt FEI Apreo pásztázó elektronmikroszkópot használtunk. A képek nagy vákuumban készültek 6,5mm-es távolságból, 0,1 nA állandó sugár áramerősség mellett, MAPS szoftver segítségével. Az AISZ-ről, kosársejtekről és a SOM+IN-okról készülő képekhez a következő paramétereket használtuk: 2,0 kV magasfeszültség, 1,20 µs pixelenkénti eltöltött idő, 4 nm x 4 nm x 70 nm voxel méret. Az egyes felvételek 16384 x 16383 pixel méretűek voltak, és összesen 300 képet készítettünk 70 nm-es vastagsággal, tehát a kísérlet során elkészült térfogat nagyjából 91 200 µm³ körül volt. A disztrófiás neuritek

esetében a pixel méret 9nm, a metszet vastagsága 280 nm volt, 110 metszet-síkon keresztül.

III.13 BF-SEM Képelemzés

A képek feldolgozása a Fiji ImageJ program (Schindelin és mtsai, 2009) segítségével történt. A BF-SEM által készített metszetekről a képeket a TrakEM2 (Cardona és mtsai, 2012) programba importáltuk, ahol egymáshoz illesztettük őket. A képek szegmentációjához, a körvonalak kirajzolása Wacom Cintiq 27QHD Creative Pen & Touch Display digitális tábla segítségével történt. Terület listákat használtunk az axonális profilokhoz és a mitokondriumokhoz, míg profil listákat a szinapszisok rekonstruálásához. Félig manuális szegmentálást végeztünk, axonprofilokhoz minden második vagy harmadik metszeten, és beépített interpolációs módszert alkalmaztunk. Utána a szinaptikus felszín, a mitokondrium térfogat, és az AISZ hosszmerését a TrakEM2 beépített segédmoduljával végeztük, az adatokat egy Excel segítségével állítottuk elő és elemeztük a Tibco Statistica 13.4 programmal. A szegmentálás után a modelleket „.obj” fájl formátumban exportáltuk és a Blender porgramba (Blender Foundation, Amszterdam, Hollandia) importáltuk további vizsgálat és megjelenítés céljából.

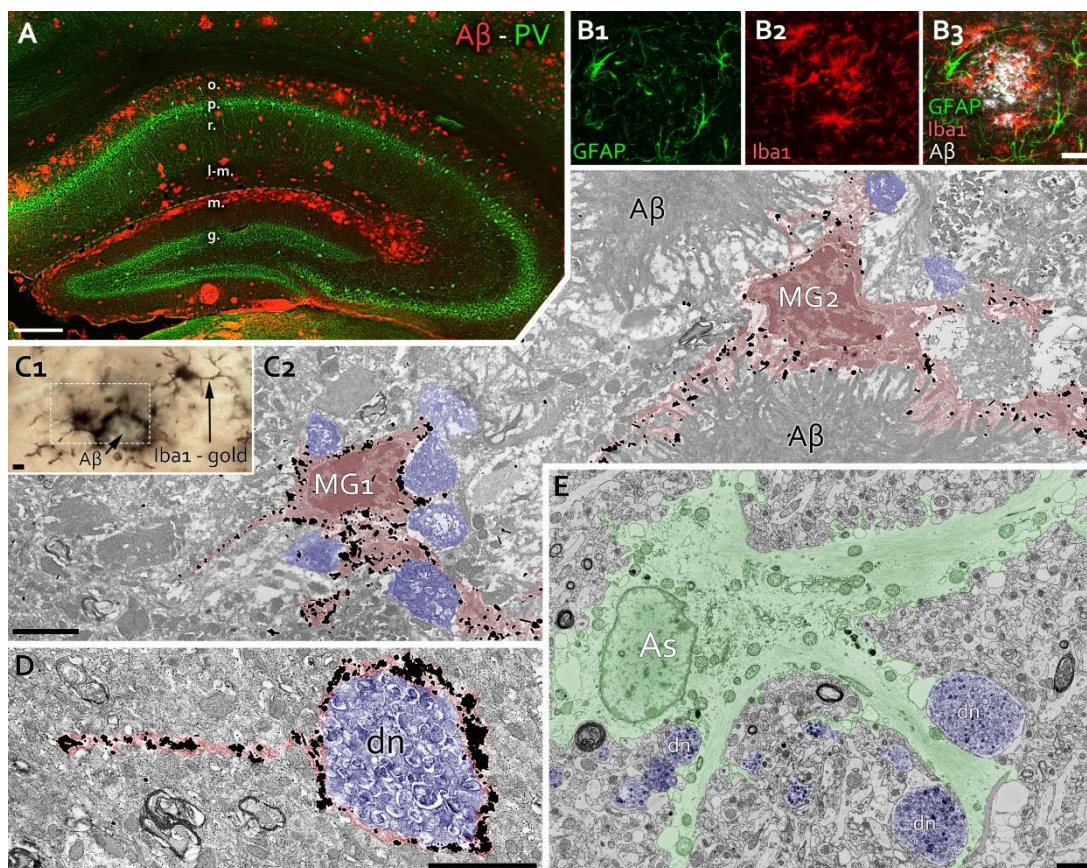
III.14. Alkalmazott statisztika

Az olyan adatszoportok esetében, amelyek nem mutattak Gauss eloszlást, az adatok leírására a medián és a 25%-75% interkvartilis tartományt használtuk. A Gauss eloszlást mutató adatszoportok leírására átlagokat és szórásokat használtunk. A Gauss eloszlást Shapiro-Wilk teszttel teszteltük. A statisztikai különbségek teszteléséhez a nem-parametrikus Mann-Whitney U-tesztet vagy a parametrikus Student-féle t-tesztet használtuk független adatpopulációkban. A statisztikai különbséget mindig kétoldalas tesztekkel teszteltük. A variancia homogenitását F-teszttel vizsgáltuk, és ha szignifikáns volt, akkor a populációkat nem paraméteres tesztekkel hasonlítottuk össze.

IV. EREDMÉNYEK

IV. 1. Az amiloidózis következtében kialakult neuroinflammációs elváltozások és a disztrófiás neuritek neurokémiai azonosítása

Megvizsgáltuk, hogy az endogén egér promóter által vezérelt, mutált és humanizált egér APP gén elegendő-e egerekben a tipikus amiloidózis és disztrófiás neuritek (DN) kialakulásának indukálásához. Minden vizsgálatban homozigóta APP^{NL-F} egereket és VT alomtársaikat használtunk. Immunfluoreszcens festéssel 7 hónapos APP^{NL-F} egerekben nem volt kimutatható A β felhalmozódás. Az első plakkok 9 hónapos korban jelentkeztek több neokortikális területen, majd 12 hónapos korukban a hippocampusban is. A DN-ek hiányoztak a 9 hónapos, valamint nagyon ritkák voltak a 12 hónapos APP^{NL-F} egerekben..



4.ábra. Az amiloid plakkok és disztrófiás neuritek körüli mikroglia és az asztroglia gyűrűi APP^{NL-F} egerekben.

A: A fluoreszcens kép egy 21 hónapos APP^{NL-F} egér hippocampális metszetét mutatja. Az A β lerakódások (piros) gyakoriak a stratum oriensben, lacunosum-moleculare és moleculare-ban. Úgy tűnik, hogy a PV-pozitív IN-ok (zöld) nem érintettek. (o.: str. oriens, p: piramisréteg, r: str. radiatum., l-m.: str. lacunosum-moleculare, m.: gyrus dentatus str.moleculare, g.:gyrus dentatus str. granulosum). Lépték: 250 μ m.

B: GFAP-pozitív asztrociták (B1, zöld) és Iba1-pozitív mikroglia (B2, piros) láthatóak A β -plakk környezetében (B3, fehér) egy 20 hónapos APP^{NL-F} egér str.lacunosum-molecula rétegében. Lépték: 20 μ m.

C: Fény- (C1) és elektronmikroszkópos képek (a C2 kép a C1-ben szaggatott vonallal jelölt területről származik) mutatják be az Iba1 immunoarannyal jelölt mikroglia sejteket (MG1, MG2, piros), amelyek körülveszik az A β lerakódásokat és a szomszédos disztrófiás neuriteket (kék). Lépték: 2 μ m.

D: Az Iba1 immunoarany jelölt mikroglia nyúlvány (piros) körbehatárol egy autofág vezikulákat tartalmazó disztrófiás neuritet (dn, kék), elválasztva azt a szomszédos neuropiltól. Lépték: 2 μ m.

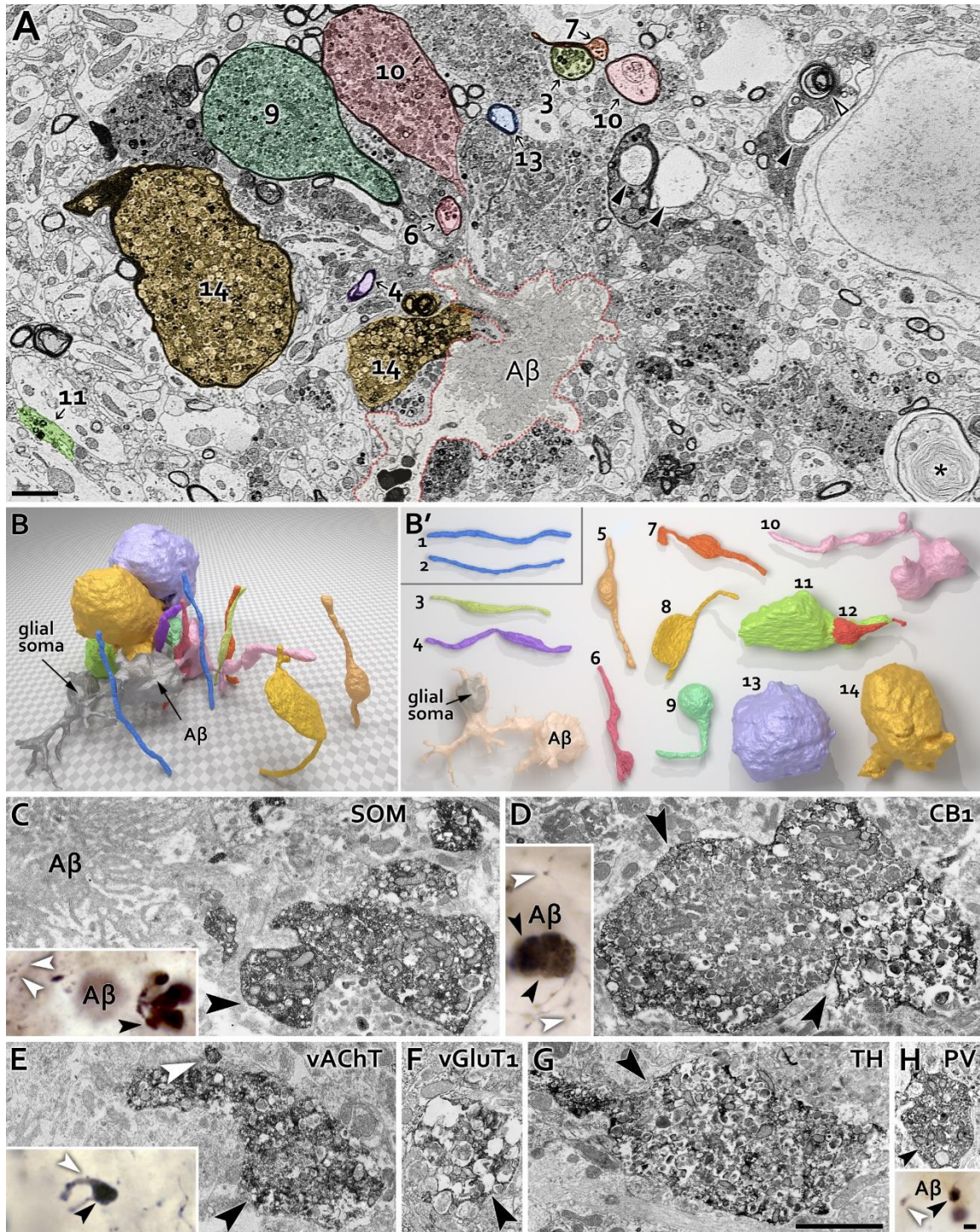
E: Asztroglia nyúlványok APP^{NL-F} egérben (As, zöld) elválasztja az elektrondenz autofág anyagokkal töltött disztrófiás neuriteket (dn, kék) az egészségesnek tűnő szövetektől. Lépték: 2 μ m.

A 18 hónapos APP^{NL-F} egerekben minden neokortikális területen és a hippocampusban találtunk amiloid plakkokat (4A. ábra), amelyet már korábban is leírtak (Saito, 2014); de csoportunk figyelte meg elsőként, hogy az amiloid plakkok körül jellemzően megjelentek a DN-ek. Az A β felhalmozódása során ismert, mind az agyi mikroglia, mind az asztrociták megjelenése és aktiválódása (Hensley, 2010). Immunfestés után ionizált kalcium-kötő adapter fehérje (Iba1)-pozitív aktivált mikroglia nyúlványokat találtunk az amiloid plakkok körül a hippocampus CA1 str. lacunosum-moleculare rétegében 24 hónapos APP^{NL-F} egerekben (4B,C. ábra). Az Iba1-pozitív nyúlványok körülvették a plakkok széleit. Számos DN helyezkedett el ezen mikroglia-A β komplexek körül (4.ábra). A glia fibrilláris savas protein (GFAP) immunfestésével kimutattunk hipertrófiás asztrocitákat is az amiloid plakkok és a DN-k közelében (4B,D. ábra). Transzmissziós és blokkfelszín-pasztázó elektronmikroszkópos (BF-SEM) technika

alkalmazásával megvizsgáltuk különböző életkorban a neuroinflammáció ultrastruktúrális jeleit és a DN-ek jelenlétét az APP^{NL-F} egerek neuropiljében.

A DN-ek háromdimenziós rekonstrukciója (5.ábra) során megfigyeltük a dense-core plakkok morfológiáját (D'Andrea and Nagele, 2010) 24 hónapos APP^{NL-F} egér CA1 régiójának str. radiatum és str. lacunosum-moleculare rétegeiben. Az amiloid lerakódások főként az extracelluláris térben helyezkedtek el, valamint a mikroglia belsejében is láthatóak voltak; mindezek mellett, a szomszédos axonokban különböző degenerációs szakaszokat tudtunk azonosítani (Fig 4D,E). Néhány egészségesnek és myelinizáltnak látszott, mások részben elvesztették myelinizációjukat. Ugyanakkor a 24 hónapos vad típusú alomtársaiknál más típusú neuronális elváltozások is megfigyelhetők voltak, például vakuolumokat, mielin-invaginációt találtunk dendritekben, redundáns és megszakadt mielinhüvelyeket vagy éppen üres mielinizált profilokat. Ugyanakkor csak APP^{NL-F} egerekben figyeltünk meg szabálytalan mitokondriális és lizoszomális felhalmozódásokat, axonális duzzanatokat, csoportosult mitokondriumokkal telt neuritokat és DN-kel rendelkező amiloid plakkokat, mint amelyeket emberi agyból bemutattak már (Peters and Folger, 2013).

APP^{NL-F} egerek hippocampusában megfigyeltünk kolinerg (vAChT+), glutamaterg (vGluT1+) és dopaminerg (TH+) DN-eket (5. ábra). A hippocampusban található IN-kat azonban alaposabban is megvizsgáltuk, mivel a korábbi humán vizsgálatok szomatosztatint (SOM) mutattak ki plakkokban és DN-ekben (D.M. Armstrong, 1989; Morrison és mtsai, 1985). A CB1R+/PV-negatív IN-okról szintén bebizonyosodott, hogy érzékenyek az amiloid citotoxikus hatására (Ramirez, 2005). Megállapítottuk, hogy a plakkok 89%-ában SOM+ (n= 45 db DN esetén, 2 egér), 93% -ában CB1R+ DN volt (n=75 db DN esetén, 2 egér), míg a plakkok csupán 4% -a tartalmazott PV+ DN-eket (n=93 db DN esetén, 2 egér). Ezenkívül ez a néhány PV+ DN sokkal kevésbé volt duzzadt, mint bármely más típusú DN (5.C-H ábra), ami arra utal, más modellekben leírtakkal ellentétben, hogy a PV+ IN-rostok jobban ellenállnak az APP génmutáció hatásainak.



5. ábra. Különböző disztrófiás neuritek APP^{NL-F} egerekben.

A: A β plakka a str. radiatum és lacunosum-moleculare határáról, a CA1 területéről, egészségesnek tűnő axonszakaszok (1,2) és körülötte különböző típusú disztrófiás neuritek (DN,3-14) és A β -t fagocitáló mikroglia. A DN-vel szomszédosan különböző rendellenes profilok figyelhetők meg, pl.: többrétegű testek (*), vákuumok

(fekete nyílhegyek) vagy megosztott myelinhüvelyek (üres nyílhegy), amiloid lerakódások az extracelluláris térben és a mikrogliaokban is (pontozott vonal). Lépték: 2µm.

B: Különböző mértékben érintett axonok egy csoportjának és egy Aβ-t tartalmazó mikrogliaának (A. panelről) a nagy térfogatra kiterjedő 3D rekonstrukciója. B': Az axonális degeneráció különböző állapotai (3-14, az A panelen is) figyelhetőek meg a plakk középpontja körül (A, B). Néhány közülük egészségesnek tűnt (1, 2), míg más myelinizált axonok legalább részben elvesztették myelin borításukat, főleg az amiloid-lerakódás felé néző oldalon (10, 14).

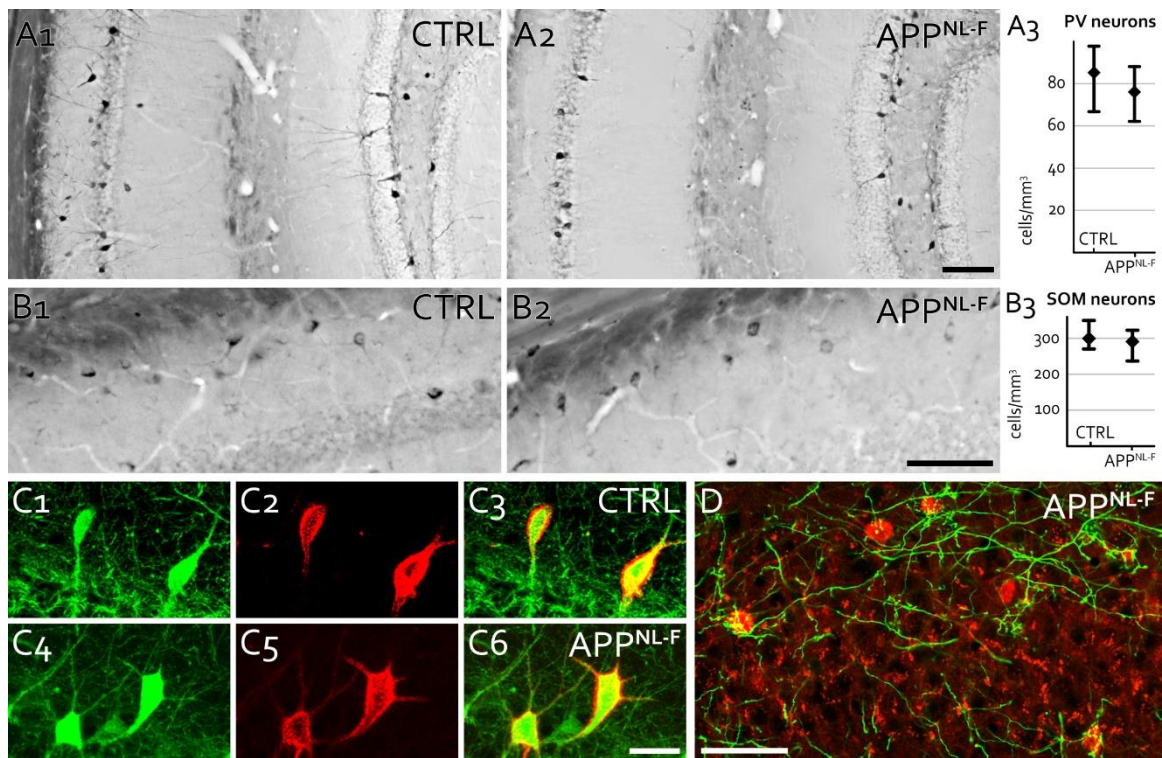
C-H: Különböző típusú neuronok DN-jének és egészséges rostjainak összehasonlítása (DAB immunjelölés az adott neurokémiai marker ellen, sötét csapadék). Disztrófiás terminálisokat (fekete nyílhegyek), amelyek között van szomatosztatin (SOM, C), 1. típusú kannabinoid receptor (CB1, D), vezikuláris acetilkolin transzporter (vAChT, E), vezikuláris glutamát transzporter 1 (vGluT1, F), tirozin-hidroxiláz (TH, G) vagy parvalbumin (PV, H) immunopozitív terminális. A fehér nyílfejek tipikus, egészséges kinézetet mutatnak. Minden felvételen ugyanazokat a skálákat használva mutatjuk, hogy a DN-ek többsége akár százszor nagyobb, mint az egészséges terminális, azonban a PV+ DN-k megnagyobbodása sokkal kevésbé volt kifejezett, bár azokat csak nagyon ritkán lehetett észlelni. Lépték: 2 µm.

IV. 2. A hippokampális PV+ és a SOM+ interneuronok számának és anatómiai megjelenésének jellemzői

Az amiloidózis számos hagyományos modelljében az amiloid plakkok hatására érzékenynek bizonyultak a dendriteket célzó, SOM+ és a piramissejtek periszomatikus régióját beidegző PV+ IN-ok, amelyek kritikus szerepet játszanak a hippokampusz memóriaképzésének szabályozásában (Brady and Mufson, 1997; Verdaguer és mtsai, 2015). Sztereológiai módszerekkel kimutattuk, hogy a PV+ sejtek sűrűsége nem változott jelentősen a 18-20 hónapos APP^{NL-F} egerek hippokampuszában (beleértve a CA1-3-at és a dentate gyrus-t is) a VT alomtársaikhoz képest (6A. ábra) Ezen felül, az APP^{NL-F} egerek SOM IN-jainak sűrűségében sem észleltünk szignifikáns változást még a 24 hónapos APP^{NL-F} egerek CA1 str. oriens rétegében VT alomtársaikhoz képest. Teszteltük, hogy a szepto-hippokampális, PV+ vetítő neuronok mutatják-e bármilyen jelét a degenerációnak

a hippocampusban, de sem a célspecificitásukban, se pedig sűrűségükben nem változtak (6D ábra).

Bár az APP-t túlzott mértékben expresszáló egérmolekkel felnőtt hippocampusában korábban leírták a védő perineuronális hálózat (PNN) borítottságának rendellenességeit (Cattaud és mtsai, 2018; Sethi and Zaia, 2017; Testa és mtsai, 2019), ezzel szemben emberi betegekben nem találtak változást (Morawski és mtsai, 2004). Kvalitatívan megvizsgáltuk a 9, 12, és 21 hónapos APP^{NL-F} egerek hippocampusában a PNN képződését, VT alomtársakkal összevetve nem találtunk bizonyítékot a PNN borítottság romlására (6C. Ábra).



6. ábra Lokális hippocampusz interneuronok vizsgálata APP^{NL-F} egerekben.

A: 18 hónapos VT (CTRL, A1) és APP^{NL-F} egerek (A2) hippocampusának PV IN-jai. A PV IN-kat DAB immunreakcióval jelöltük és a számoltuk meg a CA1-3 és GD régiókban. Mann-Whitney teszt: $p = 0,6625$, 85 sejt/mm³ három VT egérben, ezzel szemben 76 sejt/mm³ értékkel három APP^{NL-F} egérben, medián (alsó-felső kvartilis). Nem találtunk szignifikáns különbséget a genotípusok között (A3). Lépték: 100 μ m.

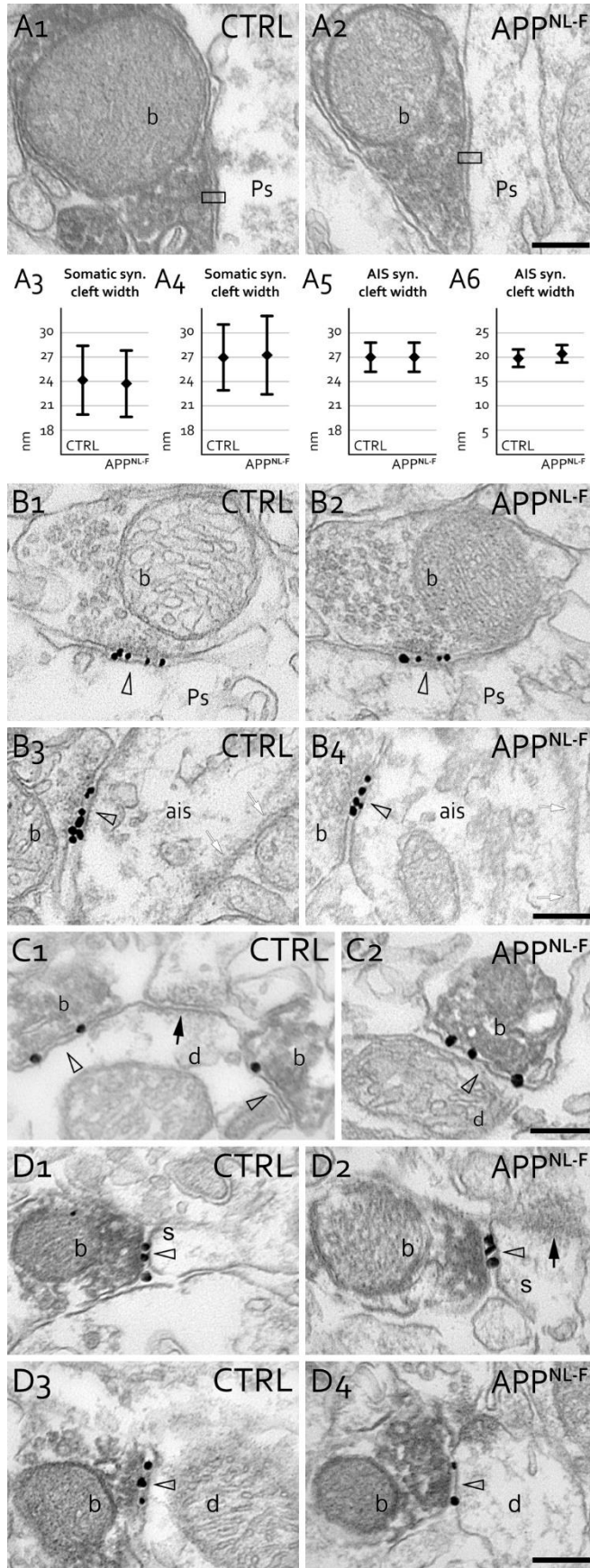
B: Hippokampális SOM IN-ok 18 hónapos kontroll (CTRL, B1) és APP^{NL-F} egerekben (B2). A SOM IN-eket DAB immunreakcióval jelöltük és a számoltuk meg a CA1 stratum oriens-ben. Mann-Whitney teszt: $p = 0,6625$, 300 sejt/mm³ három VT egérben, szemben a 291 sejt/mm³ három APP^{NL-F} egérben, medián (alsó-felső kvartilis). Nem találtunk szignifikáns különbséget a genotípusok között: (B3). Lépték: 50 μ m.

C: A PV+ IN-kat (C1, C4) perineuronális háló (C2-3, C5-6) borítja be mind a 21 hónapos VT (CTRL, C1-3), mind APP^{NL-F} egerekben (C4-6). Lépték: 25 μ m.

D: Víruskövetéses módszerrel jelölt szepto-hippokampális PV+ bemeneti rostok (zöld) egészségesnek tűnnek és megtalálják lokális célsejtjeiket, a hippocampális PV IN-okat (vörös) 18 hónapos APP^{NL-F} egerekben. Lépték: 50 μ m.

IV.3 A különböző típusú hippocampális gátló szinapszisok jellemzése

Az AK befolyásolja a gátló szinapszisokat és a GABA_A receptorokat a fő GABA receptor alegységek mRNS-ének és fehérjeexpressziójának befolyásolásán keresztül (Limon és mtsai és mtsai, 2012; Ulrich and Bettler, 2007), valamint a szinaptikus plaszticitás változásai módosíthatják a szinapszis erősségét, így a szinaptikus rés szélességét. Ezért ezeket a tulajdonságokat összehasonlítottuk VT és az APP^{NL-F} állatok között. Megvizsgáltuk a szomatikus terminálisok gátló szinapszisainak szinaptikus rés szélességét CA1 piramisisejteken és nem találtunk különbséget a VT és az APP^{NL-F} egérpárok között. Az eredményeket a 7.A 3-4 ábra mutatja be, az első pár egér esetében a szinaptikus rés szélessége: VT-ban $24,1 \pm 4,2$ nm (átlag \pm SD, 39 vizsgált szinapszis) t-teszt: $p=0,64$, vs. APP^{NL-F} egérben a szélesség: $23,7 \pm 4,1$ nm (42 vizsgált szinapszis); második egérpár esetében, VT-ban a szinaptikus rés szélessége: $27,0 \pm 4,1$ nm (48 vizsgált szinapszis), vs APP^{NL-F} egérben $27,3 \pm 4,8$ nm (36 vizsgált szinapszis), t-teszt: $p=0,78$, volt. Megmértük az AIS szinaptikus rés szélességét CA1 piramisisejteken is, és nem találtunk különbséget a VT és az APP^{NL-F} egérpárok között. Eredményeinket a 7. ábra A5-6 grafikon mutatja: első pár egérben, a szinaptikus rés szélessége 27 nm, 17 VT szinapszisban, 27 nm, 21 vizsgált APP^{NL-F} szinapszisban, Mann-Whitney teszt: $p=0,77$, medián (alsó-felső kvartilis); második egérpár esetében, a szinaptikus rés szélessége 19,8 (18-21,6) nm 8 VT szinapszisban, ezzel szemben a 20,7 (18,9-22,5) nm-rel 8 APP^{NL-F} szinapszisban Mann-Whitney teszt: $p=0,64$.



7. ábra A hippocampusz gátló szinapszisai és azok GABA_A receptorai APP^{NL-F} egerekben

A: Szinaptikus rés szélessége (a testelt profilok fekete keretben jelölve) PV+ (DAB, sötétszínű csapadék) szomatikus vagy AIS-t célzó terminálisokon (b: bouton) CA1-ben piramissejt szómáján (A1-2, Ps: piramissejt szóma) vagy az AIS-en 18 hónapos APP^{NL-F} egerekben nem volt szignifikánsan különböző (két egérpárban, A3-4) vagy AIS-eken (két egérpárban, A5-6) összehasonlítva a VT egerekkel (CTRL). Lépték: 200 nm.

B: Immunoarany jelölt GABA_A γ2 receptor alegység lokalizációja a szinapszisban (nyílhegyek) szomatikus terminálison (B1, B2) és AIS terminálison (ais, B3, B4) 17 és 21 hónapos VT (CTRL) és APP^{NL-F}-egerekben. Nem találtunk változást a GABA_A receptor γ2 alegység tartalomban. Kis fehér nyilak jelzik az AIS-specifikus membránt. Lépték: 200 nm.

C: A szinaptikus GABA_A receptor jelölés SOM+ terminálisokon, VT (CTRL, C1) és APP^{NL-F} egerekben megegyezik (C2). Immunarannyal jelölt GABA_A γ2

receptor alegységeket a SOM pozitív terminálisok (b, DAB-vel jelölve) által létesített szinapszisokban (nyílhegyek) a posztszinaptikus dendriteken (d) a CA1 lacunosum-moleculareban, 17 hónapos egerekben. A fekete nyíl egy SOM-negatív bouton jelöletlen szinaptikus kapcsolatát jelzi (C1). Lépték: 200 nm.

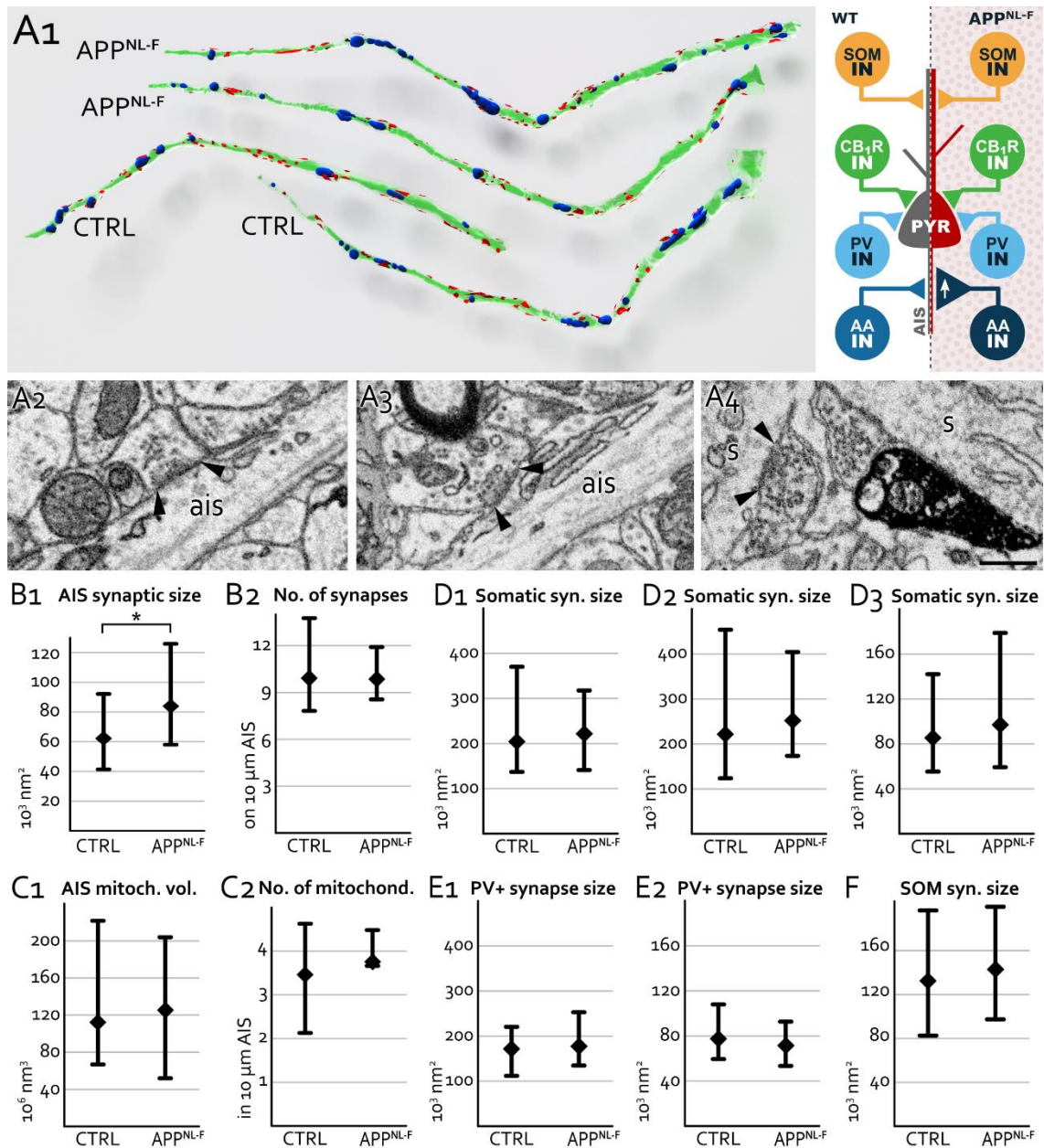
D: A GABA_A receptor jelölése a hippocampusz kolinerg szinapszisaiban hasonló a VT (CTRL, D1, D3) és APP^{NL-F} (D2, D4) alomtestvér egerekben. Immunoarannnyal jelölt GABA_A γ 2 receptor alegység látható a vezikuláris acetilkolin transzporter (vAChT) pozitív kolinerg bouton (b, DAB-vel jelölve) által létrehozott szinapszisokban (nyitott nyílhegyek), amelyek tüskéket (s, D1-D2) vagy dendritek (d, D3-D4) idegeznek be CA1-ben, VT (CTRL) és APP^{NL-F} egerekben. A D2 panelen a fekete nyíl ugyanazon tüske aszimmetrikus serkentő bemenetét mutatja. Lépték: 200 nm.

Megmértük a GABA_A receptor γ 2 alegység pozitív szinapszisok arányát a PV+ IN terminálisokban, CA1 piramissejteken 17 és 21 hónapos 2 VT és 2 APP^{NL-F} egérben. Megállapítottuk, hogy gyakorlatilag minden szinapszis, amelyeket PV+ szomatikus terminálisok hoztak létre (VT: 68/69, APP^{NL-F}: 68/68), vagy PV+ axo-axonikus terminálisok hoztak létre [VT: 45/45, 9 axon kezdeti szegmensen (AIS), APP^{NL-F}: 61/62, 13 AIS-en], valamint a SOM+ IN terminálisok által létesített szinapszisok (VT: 19/19, APP^{NL-F}: 29/29) mind GABA_A receptor γ 2 alegység pozitívak voltak genotípustól függetlenül (7B-C ábra). Mivel korábban bebizonyítottuk, hogy a hippocampuszban a kolinerg terminálisok GABAerg szinapszisokat hoznak létre (Takács és mtsai, 2018), és mivel ismert, hogy a kolinerg rendszer különösen érzékeny az AK-ban, megvizsgáltuk a GABA_A receptor γ 2 alegység pozitívítását a kolinerg szinapszisoknak is hippocampusz CA1 régióban. Nem találtunk különbséget a VT és az APP^{NL-F} egerek között a kolinerg terminálisok GABA_A receptor γ 2 alegység tartalmában (7D. ábra, VT: 33/41, 81%; APP^{NL-F}: 36/44, 82%).

A nagyobb szinapszis több receptort tartalmaz és hatékonyabb (Holderith és mtsai, 2012). BF-SEM használatával, teljesen rekonstruáltunk SOM+, disztális dendritet célzó IN-okat, PV+/CB1R-negatív gátló IN-okat, PV-negatív/CB1R+ szómát beidegző kosárasejteket, valamint PV+ axo-axonikus IN-okat, amelyek a CA1 piramissejteken hoznak létre szinapszisokat. Elsőként összehasonlítottuk a szomatikus, kosárasejt-szinapszisok típusait 18 hónapos VT és az APP^{NL-F} egerekben (8. ábra). Nem találtunk különbséget

szinapszisok felszínének nagyságában (a különböző zsugorodásból eredő különbségek miatt, az egereket párosával használtuk és hasonlítottuk össze, lásd a 3. táblázatot a részletekért). Ezután a CB1R immunoarany jelölés segítségével megkülönböztettük a kosársejt-terminálisok két típusát, és meghatároztuk a kifejezetten PV+/CB1R-negatív terminálisok által létrehozott szinapszis méretét (Takács és mtsai, 2015). Megállapítottuk, hogy a PV+/CB1R- negatív kosársejtek szinapszisainak paraméterei nem változtak APP^{NL-F} egerekben (a részleteket lásd a 3. táblázatban). Ezután összehasonlítottuk a SOM+ IN által létrehozott szinapszis méretét a piramissejtek disztális dendriteinél, ahol ismét nem találtunk különbséget a szinapszisok nagyságában VT és az APP^{NL-F} alomból származó egerek között (8. ábra és a részleteket lásd a 4. táblázatban).

Az A β növeli a glutamát felszabadulásának valószínűségét (Cummings és mtsai, 2015; Medawar és mtsai, 2019) és ennek következtében magasabb a piramissejt-aktivitás, amelyet leghatékonyabban az AIS-ek gátlásával lehet kompenzálni, mivel döntő szerepet játszanak a piramissejteken az akciós potenciál létrehozásában. Ezért BF-SEM alkalmazásával megvizsgáltuk kifejezetten a CA1 piramissejt AIS-jeit több morfológiai tulajdonságát három pár 18 hónapos VT és APP^{NL-F} egéren, és a hat egér mindegyikéből több AIS-t teljesen rekonstruáltunk (4. táblázat). Nem találtunk változást sem az AIS-eken található szinapszisok átlagos sűrűségében, sem az AIS-en belüli mitokondriumok sűrűségében, valamint térfogatában (a részleteket lásd a 4. táblázatban). Megállapítottuk azonban, hogy a PV+ axo-axonikus sejtek AIS-einek szinapszissai körülbelül 35% -kal nagyobbak az APP^{NL-F} egerekben (Mann-Whitney teszt: $p < 0,001$, 8. ábra és a részleteket lásd a 4. táblázatban).



8.ábra A hippocampus gátló szinapszisainak 3D morfológiája 18 hónapos APP^{NL-F} egerekben.

A: CA1 piramisajt axon kezdeti szegmenseinek BF-SEM 3D rekonstrukciója APP^{NL-F} és VT (CTRL) állatokban. A szinapszisokat (piros) az axonális membránon (zöld) és a mitokondriumokat (kék) rekonstruáltuk és számoltuk meg. A jobb oldalon, az eredmények vázlatos ábrázolása azt mutatja, hogy amíg szinaptikus terület a SOM+ IN-k (SOM IN), a CB1R+ kosár sejtek (CB1R IN), a PV+ kosár sejtek (halványkék PV IN) esetében nem változott, addig a PV+ axo-axonikus sejtek (AA IN) szinaptikus területe jelentősen, kb. 35% -kal megnőtt.

B: Jelentősen megnőtt a piramissejt (PS) AIS-én található PV+ szinapszisok mérete három pár APP^{NL-F} és VT (CTRL, B1) egérben vizsgálva (összesített adatok), míg szinapszisaik lineáris sűrűsége az AIS-en változatlan maradt (B2).

C: Nem tapasztaltunk változást a piramis sejtek mitokondriumok méretében (C1) vagy sűrűségében (C2) az AIS-ben, amint azt három pár (egyesített adat) VT (CTRL) és APP^{NL-F} egerekből származó adat mutatja.

D: A piramis sejt szómáján található szinapszisok mérete nem változott három pár VT és APP^{NL-F} egérben (D1-3). E: A PV+/CB1R-negatív IN-k által, a PS-ek szómáján létesített szinapszisok mérete nem különbözött két pár 18 hónapos VT és APP^{NL-F} egérben (E1, E2). F: A SOM+ IN-k által, a PS-ek dendritjein létrehozott szinapszisok mérete nem volt eltérő két pár (összesített adat) 18 hónapos VT és APP^{NL-F} egérben.

A következő összefoglaló táblázat (4.táblázat) tartalmazza a BF-SEM kísérletekből származó statisztikai adatokat, amelyek korábról ilyen részletességgel nem voltak ismertek.

4.táblázat BF-SEM kísérletekből származó, a CA1 piramis sejtek szinaptikus parametereinek összehasonlító statisztikai adatok

Ultrastrukturális paraméter	VT	APP^{NL-F}
<i>A CA1 piramis sejteken található szomatikus szinapszisok szinaptikus területe (nm², egérpár 1), p=0.9542</i>		
<i>Szinapszisok száma</i>	<i>100</i>	<i>100</i>
<i>Medián</i>	<i>203898</i>	<i>221232</i>
<i>Alsó kvartilis</i>	<i>136960</i>	<i>141059</i>
<i>Felső kvartilis</i>	<i>370260</i>	<i>317769</i>
<i>A CA1 piramis sejteken található szomatikus szinapszisok szinaptikus területe (nm², egérpár 2), p=0.3388</i>		
<i>Szinapszisok száma</i>	<i>100</i>	<i>100</i>
<i>Medián</i>	<i>221674</i>	<i>251685</i>
<i>Alsó kvartilis</i>	<i>123681</i>	<i>173417</i>
<i>Felső kvartilis</i>	<i>453867</i>	<i>404389</i>
<i>A CA1 piramis sejteken található szomatikus szinapszisok szinaptikus területe (nm², egérpár 3), p=0.4349</i>		
<i>Szinapszisok száma</i>	<i>173</i>	<i>177</i>
<i>Medián</i>	<i>85496</i>	<i>96940</i>
<i>Alsó kvartilis</i>	<i>55382</i>	<i>59209</i>
<i>Felső kvartilis</i>	<i>142013</i>	<i>178778</i>

A CA1 piramis sejtek szómáján található CB1R-negatív PV+ IN szinapszisának szinaptikus területe (nm², egérpár 4), p=0.1860

Szinapszisok száma	90	100
Medián	171460	177651
Alsó kvartilis	112007	134771
Felső kvartilis	220626	253022

A CA1 piramis sejtek szómáján található CB1R-negatív PV+ IN szinapszisának szinaptikus területe (nm², egérpár 5), p=0.0993

Szinapszisok száma	100	100
Medián	77320	71605
Alsó kvartilis	59435	53437
Felső kvartilis	107981	92711

A piramis sejtek dendritjén található SOM+ IN-ok szinapszisainak szinaptikus területe (nm²) két pár egérből, p=0.0706

Szinapszisok száma	194	196
Medián	132486	142723
Alsó kvartilis	82546	97368
Felső kvartilis	196627	200001

Szinaptikus terület a piramis sejtek AIS-eken (nm²) három pár egérből, p= 5,7038E-10

Szinapszisok száma	387	380
Medián	9	9
Alsó kvartilis	62096	83983
Felső kvartilis	41403	58021
Upper quartile	92186	125968

Az AIS-en lévő szinapszisok lineáris sűrűsége (darab/10μm) három pár egérből gyűjtve, p=0.9755

Szinapszisok száma	460	515
AIS-ek száma	12	11
Medián	9.91	9.85
Alsó kvartilis	7.83	8.56
Felső kvartilis	13.77	11.91

A piramis sejtek AIS mitokondriumainak térfogata (nm³ x 10⁶) három pár egérből gyűjtve, p=0.7535

Szinapszisok száma	101	124
AIS-ek száma	8	8
Medián	112	125
Alsó kvartilis	67	52
Felső kvartilis	222	204

A piramis sejtek AIS mitokondriumainak sűrűsége (darab/10μm) három pár egérből gyűjtve, p=0.4705

Mitokondriumok száma	100	138
AIS-ek száma	8	9
Medián	3.46	3.75
Alsó kvartilis	2.13	3.66
Felső kvartilis	4.63	4.48

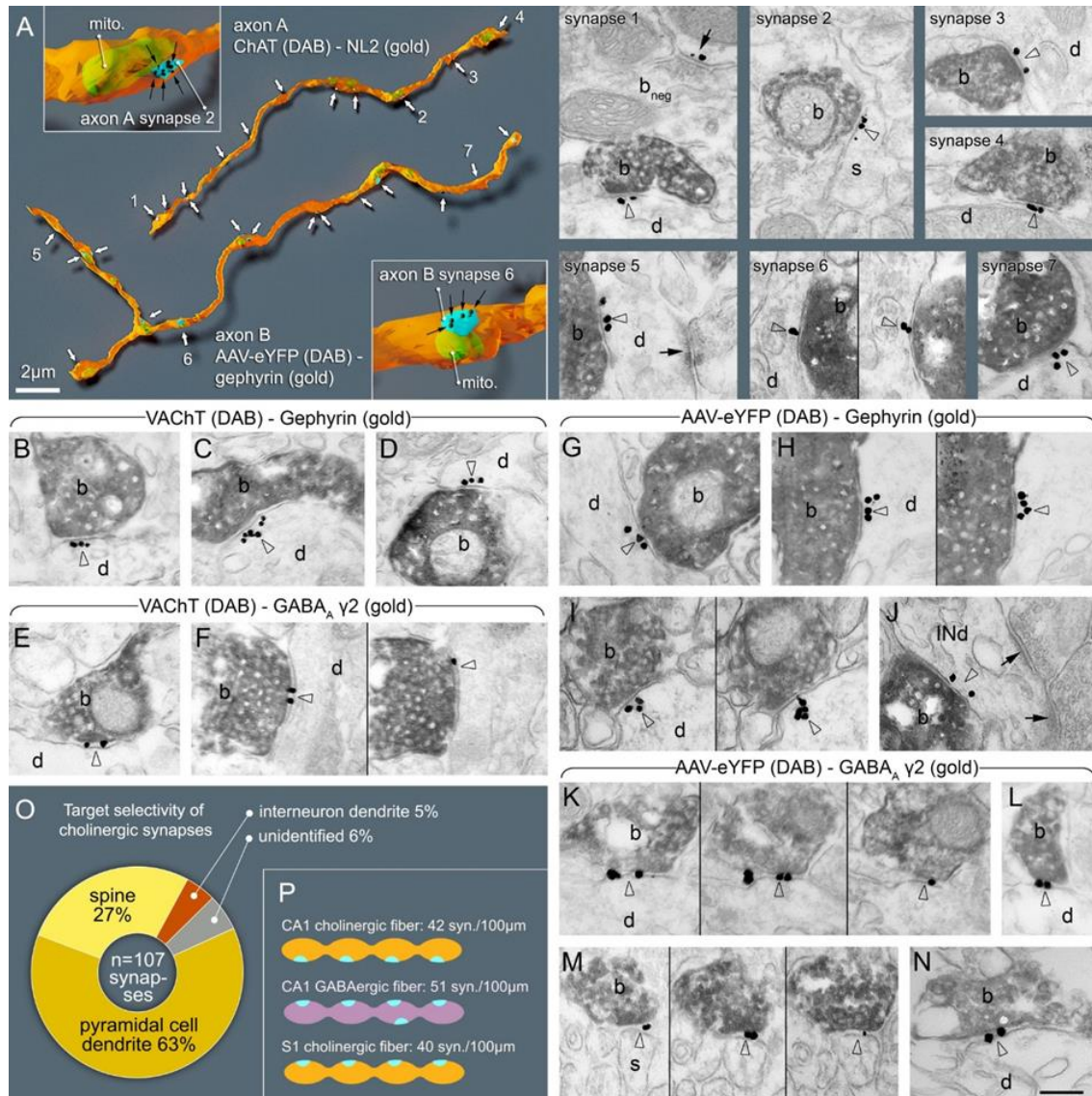
II.4. A hippokampális kolinerg rostok kapcsolatainak vizsgálata

Kutatócsoportunk bebizonyította, hogy a kolinerg rostok által létrehozott szinapszisok (CA1, S1 szomatoszenzoros kéreg, prefrontális kéreg, bazolaterális amygdala) expresszálják a neuroligin 2 (NL2) posztszinaptikus fehérjét (Takács és mtsaiés mtsai, 2013). Ez a fehérje közvetlenül kölcsönhatásban van a gephyrinnel, a gátló, posztszinaptikus denzitások központi állványzófehérjéjével (Tyagarajan and Fritschy, 2014) és együttesen szerepet játszanak a GABA_A receptorok kihorgonyzásában (Dong és mtsaiés mtsai, 2007; Jedlicka és mtsaiés mtsai, 2011; Pouloupoulos és mtsaiés mtsai, 2009). Az korábról már ismert volt, hogy a kolinerg terminálisok egy kis része létesíthet szinapszist, kutatócsoportunk azonban azt feltételezte, hogy mindegyik terminális szinapszisokat alkot. .

A hippokampuszban a kolinerg rostokon a szinapszisokat NL2 jelöléssel azonosítottuk (9. ábra) és háromdimenziós, sorozat mikroszkópos rekonstrukcióval vizsgáltuk. Véletlenül kiválasztott, hosszú axon szakaszokat rekonstruáltunk (6–33 μm , átlag: 21 μm , n=17), egyrészt vad típusú állatban anti-kolin acetiltransferáz (ChAT) antitesttel megjelölve, másrészt eYFP-adenó-asszociált vírussal (AAV) injektált ChAT-Cre egerekben, ahol a szinapszisaikat NL2 vagy gephyrin immunoarany jelöléssel azonosítottuk. Mindegyik nagyszámban létesített szinapszisokat (9. ábra). A szinapszisok átlagos sűrűsége 42 szinapszis/100 μm volt. Korábban ezen kapcsolatok közül néhányat nem is lehetett volna szinapszisként tekinteni a gyenge membrán-megvastagodásaik és a szűkebb intercelluláris szinaptikus résük miatt (pl. 9. ábra, szinapszis 2–3) (Umbriaco és mtsaiés mtsai, 1995); azonban a NL2 és gephyrin jelölés egyértelműen meghatározta az aktív zónájukat. Összehasonlításként, GABAerg axonszakaszokat is rekonstruáltunk (CB1+, n=2, amelyek hossza 18 és 29 μm), amelyek szintén nagyszámban létesítettek szinapszisokat. Miután megbizonyosodtunk arról, hogy az összes hippokampális kolinerg terminális a bazális előagy kolinerg sejtjeiből ered, azt találtuk, hogy gyakorlatilag az összes vizsgált hippokampális kolinerg terminális egy vagy több NL2-pozitív szinapszist létesített (9. ábra).

A kolinerg axonok mentén a szinapszisok lineáris sűrűsége hasonló volt a GABAerg axonokéhoz (kolinerg axonokon a szinapszisok száma 100 μm -ként: 42 a CA1 régióban, 40 a S1-ben; CB1+ axonokon: 51). Hippokampusz CA1 régiójában azt találtuk, hogy a NL2 és a gephyrin pozitív kolinerg szinapszisok (n=107, 4 egérből összegyűjtött

adat) elsősorban a piramis sejtek dendritjeit (63%) és a tüskenyakakat idegzik be (27%), valamint interneuronok dendritjeit (5%), míg néhány esetben a posztzinaptikus célt nem lehetett besorolni (6%) (9O ábra).



9.ábra: Az összes kolinerg terminális szinapszist létesít, expresszálja a GABAerg markereket és beidegzi a piramis sejteket vagy az interneuronokat.

A., Háromdimenziós EM rekonstrukciók azt mutatják, hogy a hippocampus kolinerg rostjai szinapszisosokat (nyilak) alkotnak. Az A jelű axont ChAT antitesttel jelöltük meg vad típusú (VT) egérben. A B jelű axon egy AAV-eYFP vírussal jelölt septo-hippokampális rost ChAT-Cre egérben. A képbeszűrésök szinapszist alkotó, két tipikus terminálst mutatnak be (kék). A plazmamembránt részben átlátszóvá tettük a

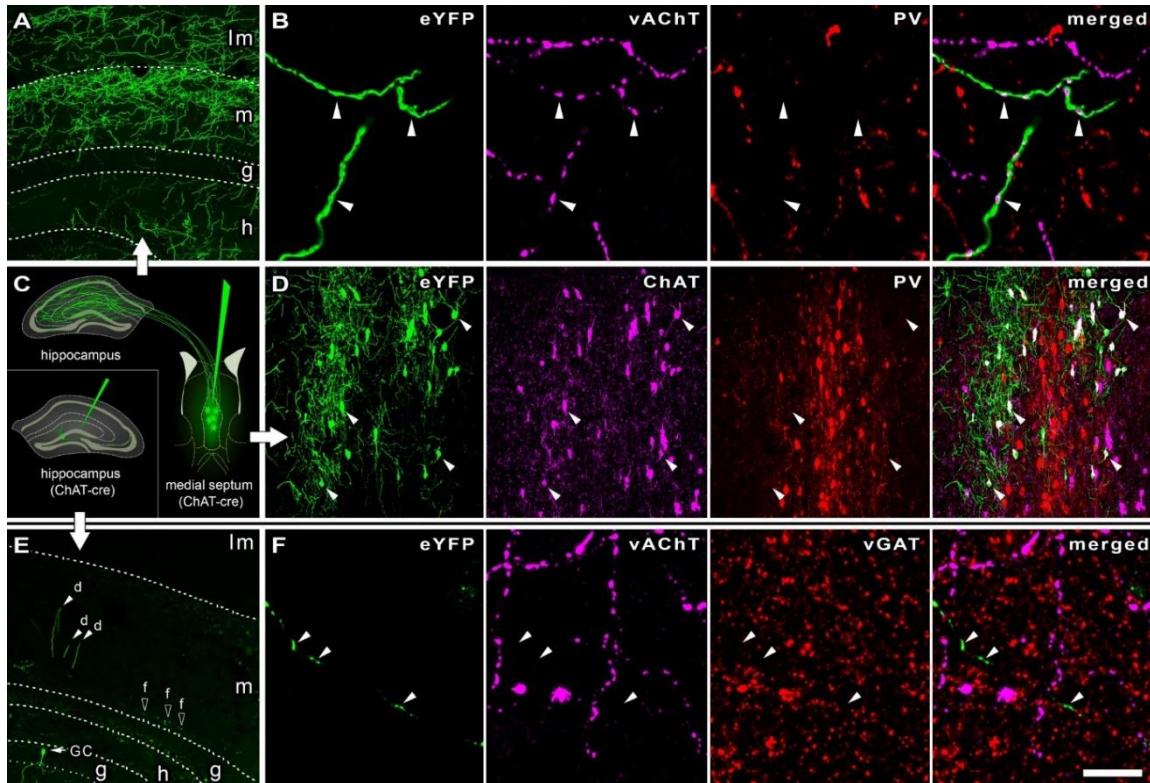
mitokondriumok (mito, zöld) felfedésére. Az NL2 (A axon, 1-4. szinapszisok) vagy a gephyrin (B axon, 5-7. szinapszisok) aranyjelölése a szinapszisok felismerésére szolgál (fekete pontok és nyilak a képbeszúráson). Rekonstruált axonális szegmensek boutonjai (b), amelyek szinapszisokat létesítenek (1-7., nyílhegyek, azonos számokkal jelölve a bal oldalon) a dendriteken (d) és a tüskéken (s). Az 1. szinapszis mellett egy ChAT-negatív, feltételezhetően GABAerg terminális bouton (bneg) található, amely NL2-pozitív szinapszist (nyíl) képez. b – n: Gephyrin (nyílhegyek, arany; b-d; g-j) és GABA_A γ 2 receptor alegységek (nyílhegyek, arany; e-f; k-n) lokalizálódnak posztzinaptikusan a vAChT⁺ terminálisok által létrehozott szinapszisokban VT egerekben (b – f; DAB, b), illetve AAV-eYFP-vel jelölt szepto-hippokampális terminálisokban ChAT-Cre egerekben (g-n; DAB, b). Az egymást követő metszetek képeit vékony fekete vonalak elválasztják. A terminálisok dendriteket (d) vagy a tüskéket idegzik be. A j képen a posztzinaptikus célpont egy interneuron dendritje (INd), amelyen I-es típusú szinapszisok vannak (nyilak). A szinapszisok a str. oriens (a, b-e, g-j, l, m), stratum radiatum (k, n) és stratum lacunosum-moleculare (f) rétegekből származnak. A lépték 200 nm az összes EM-kép esetében. o - A rekonstruált kolinerg axonális szegmentek célszelektivitása str. oriens és radiatum rétegekben. Tüske: 27,1%, piramisajt-dendrit: 62,6%, interneuron dendrit: 4,7%, nem azonosítható: 5,6%. p: CA1-ben és S1 kéregben levő 100 μ m kolinerg axonális szegmensre jutó szinapszisok száma összehasonlítva a CA1 GABAerg rostjaival.

Minden beidegzett tüske kapott egy másik, feltételezhetően glutamáterg aszimmetrikus, I típusú bemenetet is egy jelöletlen terminálisból, ami arra utal, hogy a kolinerg szinapszisok önmagukban nem indukálnak tüske kialakulást. Ezek az adatok azt sugallják, hogy ezeknek a szinapszisoknak kb. 90%-a a CA1 piramis sejteket célozza meg, miközben az interneuronokat is megtalálnak (legalább 5%), ez az arány közel áll a CA1 régió neuronális arányához. Ezután megvizsgáltuk, hogy GABAerg tulajdonságúak-e ezek a szinapszisok.

IV.5. A szepto-hippokampális kolinerg axonok GABAerg tulajdonságának anatómiai vizsgálata

Bár már mások is úgy vélték, hogy a hippokampusz kolinerg beidegződése kizárólagosan a bazális előagyból származik és a lokális kolinerg sejtpopuláció jelenléte az eger hippokampuszban csupán korábbi kísérletek műterméke volt (Blusztajn and Rinnofner, 2016), ennek ellenére mi is teszteltük ezt a feltevést. Cre-függő eYFP-AAV-t injektáltunk a ChAT-Cre egerek hippokampuszába (10C. Ábra), és a hippokampusz metszeteken eYFP, a vAChT és a vGAT jelölést alkalmaztunk (10. ábra, E,F). Néhány eYFP pozitív sejtet találtunk a hippokampuszban is, de rendkívül ritkák voltak és hasonlítottak a dentate gyrus szemcsesejtjeihez és a CA3 piramis sejtekhez. Találtunk néhány, azokból származó, ritkán elágazó eYFP+ rostot is, de a vAChT vagy a vGAT immunreaktivitást soha nem volt megtalálható ezekben a terminálisokban (323 terminálisból 0 volt jelölt, 2 egerből). Ugyanazon mintákban teszteltük a vAChT pozitív terminálisokat is, és soha nem találtunk eYFP-pozitivitást (2 egerből 3673-ból 0). Így megerősítettük, hogy a hippokampuszban nincsenek kolinerg sejtek, csak a Cre enzim rendkívül ritka ektopiás expressziója. Ezek az eredmények azt is megerősítették, hogy a szepto-hippokampális kolinerg rostok vAChT jelöléssel megbízhatóan megjelölhetőek.

Egy másik megközelítés ellenőrzése céljából az eYFP-AAV-t injektáltunk ChAT-Cre egerek mediális szeptumába, és a PV/ChAT/eYFP hármas jelöléseket festettünk (10. ábra C,A,B). Az MS-ben az összes vizsgált eYFP-pozitív sejt 97,6% -a volt ChAT+, de egyikük sem volt PV+ (n=212, 2 egerből). Vizsgáltuk ezen sejtek rostjait a hippokampuszban, és itt is elvégeztünk a PV/vAChT/eYFP hármas jelölést (10. ábra). Megállapítottuk, hogy az eYFP pozitív terminálisok vAChT-jelöléssel kolokalizáltak, de soha nem PV+ (n=252 terminális 2 egerből). Ezek az eredmények megerősítették, hogy ezekben az állatokban az eYFP+ rostok kizárólag kolinerg sejtekből származnak.



10. ábra, Kontroll kísérletek a szeptohippokampális kolinerg sejtek és rostok jelölésére cre-függő vírus- és immunjelölő technikákkal.

A: Az *eYFP-t* expresszáló kolinerg rostok robosztus hálózata a hippocampusban AAV-injektálást követően *ChAT-Cre* egér MS-jában. (*lm*: laconosum-moleculare, *m*: moleculare, *g*: granule-cell layer, *h*: hilus)

B: Hippocampusban, az AAV-*eYFP* vírus által jelölt szepto-hippokampális rostok *vAChT-t* tartalmaznak, de *PV-t* nem. A *vAChT*-jelölés a rostok terminálisaiban (nyíl) található.

C: Az AAV-*eYFP*-injektálás helye a *ChAT-cre* egerek MS-ba/ hippocampusába.

D: Az összes *eYFP-t* expresszáló MS neuron *ChAT+*, míg egyikük sem tartalmazott *PV-t*. (A nyilak néhány sejttestet jelölnek.)

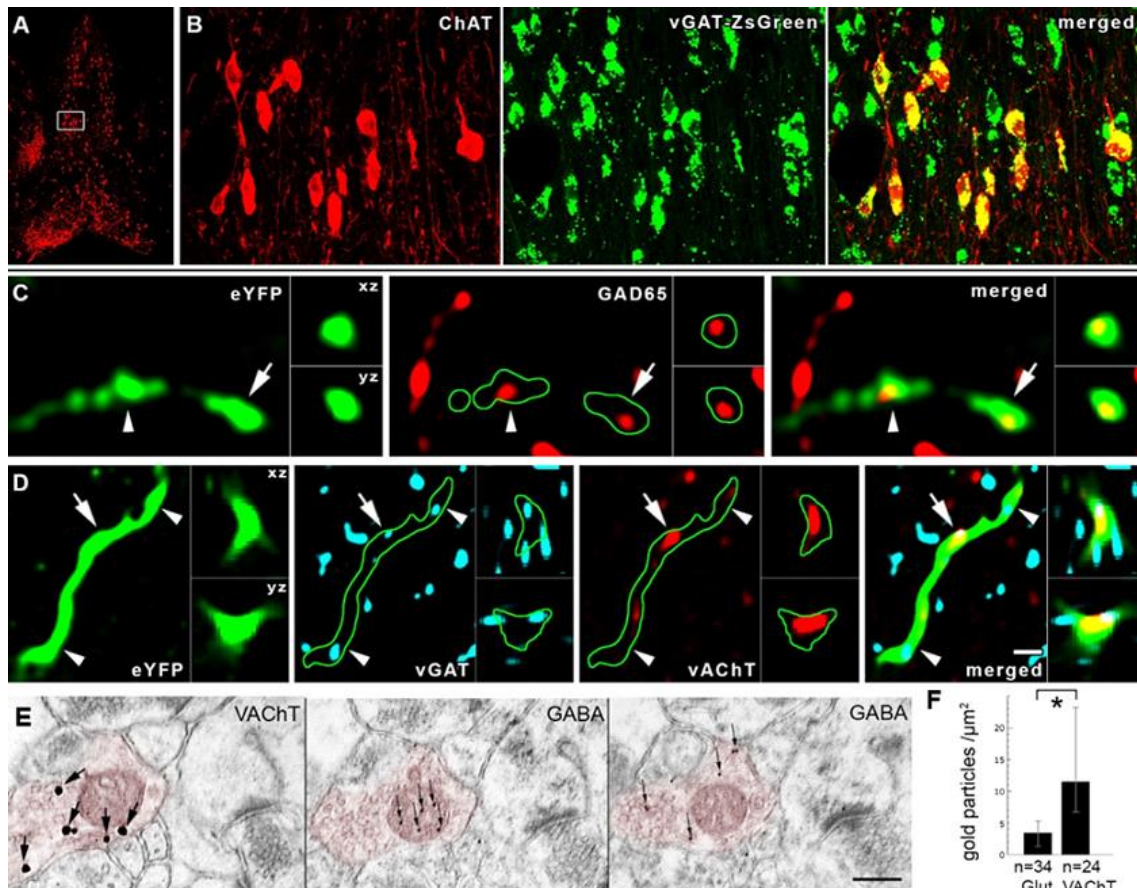
E: AAV-*eYFP* injektálást követően a *ChAT-cre* egerek hippocampusába elhanyagolható mennyiségű *eYFP* expresszáló sejt volt kimutatható. Egy *eYFP-t* expresszáló szemcsesejt látható néhány dendrit-szegmással és kevés szétszórt rosttal. (*d*: dendrit, *f*: rost, GC: szemcsesejt)

F: A hippocampusban található lokális *eYFP-t* expresszáló rostok nem tartalmaznak *vAChT-t* vagy *vGAT*-ot. (A nyílhegyek jelölnek néhány terminálist, a

léptékek az F képen 150 μm az A, D, E, és 6 μm a B és F esetében. Miután megállapítottuk, hogy minden kolinerg rost a BF-ből származik, lokalizáltuk a posztszinaptikus GABAerg jelátvitel elemeit ezekben a kapcsolatokban. Elsőként a gephyrint vizsgáltuk, mert az kapcsolatban van mind a GABA_A receptorokkal, mind pedig a NL2-vel. Megállapítottuk, hogy a hippocampális kolinerg rostok szinapszisainak legalább 81% -a tartalmaz gephyrint a dendriteken és a tüskenyakokon (9.ábra). Ezenkívül azt találtuk, hogy ezen szinapszisoknak legalább a 80%-ánál GABA_A receptor gamma2 alegység jelölés volt látható, amely mind a dendriteken, mind a tüskenyakakon könnyen kimutatható volt (9.ábra). Ezután lokalizáltuk a preszinaptikus GABAerg és kolinerg jelátviteli rendszer elemeit ezekben a terminálisokban. ZsGreen fluoreszcens riporter egérvonalat kereszteztünk vGAT-Cre egérvonallal, amelynek a mediális szeptumában megjelöltük ChAT+ sejtjeiket, így meg tudtuk állapítani, hogy minden szepto-hippokampális kolinerg sejt vGAT immunopozitív is (11.ábra A, B). A hippocampusz kolinerg terminálisai expresszálták a GABA-szintetizáló enzimet, a glutamát dekarboxiláz 65 (GAD65) enzimet is (11.ábra C). Ezen túlmenően a kolinerg szepto-hippokampális terminálisok legalább 83%-a vGAT+ volt (11.ábra D), míg a szepto-hippokampális kolinerg terminálisok 64% -ában volt kimutatható a vAChT. Végül, beágyazás utáni immunarany jelölést használva kimutattuk, hogy a kolinerg terminálisok tartalmaznak GABA-t (11.ábra E, F).

IV.6 A szepto-hippokampális kolinerg axonok anatómiai vizsgálata idős APP^{NL-F} egerekben

A szepto-hippokampális kolinerg rostok vizsgálatához 17 hónapos ChAT-eGFP és APP-NL-F/eGFP-Cre egerek mediális szeptumában AAV5-EF1 α -DIO-eYFP vírust injektáltunk. A vírussal jelölt ChAT-sejtek axonális arborizációi a hippocampusban nem különböztek (12.ábra). GABA_A receptor γ 2 alegységek a vAChT-tal jelölt kolinerg szinapszisokban tüskéket (A1-2) vagy dendriteket (B1-2) idegeznek be VT és APP^{NLF} egerekben. Ismét nem találtunk szignifikáns változást a kolinerg boutonok GABA_A γ 2 receptor tartalmában.



11.ábra A-B: A MS kolinerg sejtjei GABAergek. A B ábra kinagyítva mutatja az A ábrán jelölt fehér keretben található területet. A ChAT jelölt neuronokat piros, míg a vGAT-ot kifejezőket zöld szín jelzi vGAT-ZsGreen riporter egérben.

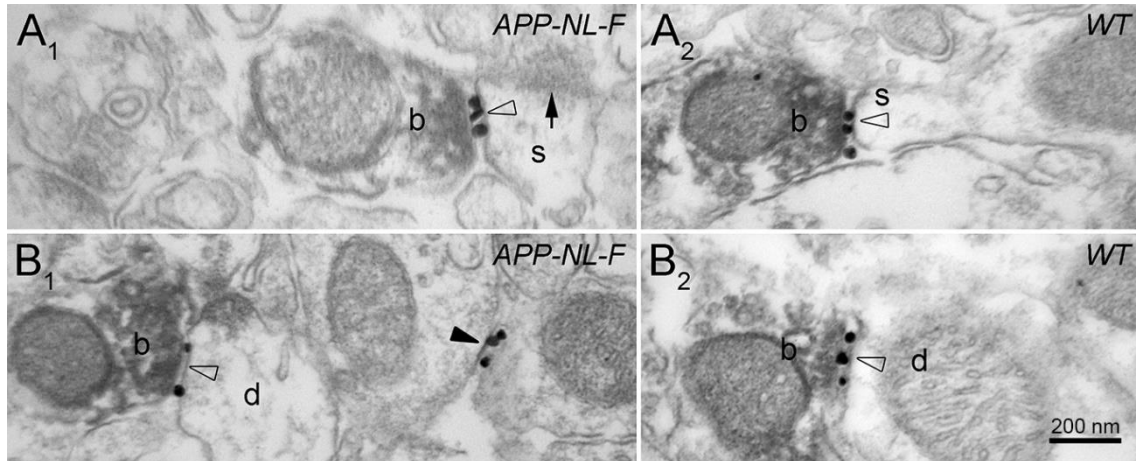
C: Az AAV-eYFP vírus által jelölt szepto-hippokampális rostok kifejezik a GAD65-öt. A képbeszúrásokon a nyíllal jelölt terminális xz és yz vetülete látható. (A nyíl és a nyílhegy a terminálisok felé mutat, a rostok körvonalát zöld vonal jelöli.)

D: Az AAV-eYFP vírus jelölt szepto-hippokampális rostok kifejezik a vGAT-ot és a vAChT-t. (A D ábra léptéke: 210, 14, 2 és 1 μm az A, B, C és D esetében.)

E-F: A hippocampusz kolinerg terminálisai GABA-t tartalmaznak. Egy vAChT+ terminális három, egymást követő EM metszete látható (E, pirosra színezve). A vAChT-t beágyazás előtti immunoarany módszerrel jelöltük jelenítettük meg (az E első panele, ezüsttel intenzifikált felerősített arany részecskék, nagy nyilak), amíg az azokat követő ultravékony metszeten (az E második és harmadik panele) a GABA-t jelöltük beágyazás utáni immunfestéssel (kisebb arany részecskék, vékony nyilak).

F: A GABA-jelölés immunoarany sűrűségének mediánjai (oszlopok) és interkvartilis tartományai (sávok) glutamaterg (Glut, medián: 3,5 aranysemcsék / μm^2 ,

intervartilis tartományok: 1,5-5,3) és VAcHT+ terminálisokban (VAcHT, medián: 11,5 arany részecskék / μm^2 , interkvartilis tartományok: 6,8–22,7). A csillag a szignifikáns különbséget jelöli ($p < 0,05$). Az I. típusú szinapszisokat alkotó vAcHT- terminálisokat glutamatergnek tekintettük. A lépték 200 nm az összes EM-kép esetében.



12. ábra A-B: A hippocampális kolinerg szinapszisok GABA_A receptor jelölése hasonló az $\text{APP}^{\text{NL-F}}$ és VT egerekben. GABA_A receptor $\gamma 2$ alegységek (immunarany jelölés) a szinapszisokban (nyitott nyílhegyek), vAcHT+ kolinerg boutonok (b) és tüskék (s, A1-2) vagy dendritek (d, B1-) (DAB-bal jelölve) 2) 17 hónapos $\text{APP}^{\text{NL-F}}$ (A1-B1) és VT (A2-B2) egerek CA1-jében. Az A1-en fekete nyíl ugyanazon tüske aszimmetrikus serkentő bemenetét mutatja. A B1-en egy vAcHT-/ GABA_A $\gamma 2+$ szinapszis is látható (fekete nyílhegy). Nem publikált eredmények.

VI. MEGBESZÉLÉS

Az AK-t postmortem, az amiloid plakkok jelenlétével diagnosztizálják a betegek agyában (Harrison és Owen, 2016). Habár számos fehérje, köztük a tau-protein, az apolipoprotein E, és a preszenilin mutációit is megtalálták már a demenciák súlyos formáiban, évtizedek óta az amiloid plakkokat tekintik az AK egyik elsődleges okának (Barage és Sonawane, 2015; Hardy, 1997; Selkoe és Hardy, 2016). Ezért, az állatokon végzett kísérletekben (Huang, Yadong; Mucke, 2012; Huang és mtsai, 2019; Lannfelt és mtsai, 2014; Mullane és Williams, 2013) és sok klinikai vizsgálatban az elsődleges célpont (Lannfelt és mtsai, 2014; Zotova és mtsai, 2013) az A β agyból történő eltávolítása volt. Ez az elmélet inspirálta annak a több, mint száz egér modellnek a létrehozását, amelyekben az A β felhalmozódását, a mutált APP túlzott expressziója váltja ki és amelyet egy erős nem-specifikus promóter szabályoz. Ezek a megközelítések felgyorsították az A β lehetséges hatásainak vizsgálatát, mivel az ilyen állatokat már néhány hónappal a születésüket követően lehetett vizsgálni. Ezekben az egérekben azonban, több olyan sejtben is mesterségesen nagy mennyiségben kifejeződött a mutált APP-t, amely természetesen nem jelenne meg, így modellspecifikus műtermékeket vezethettek be.

Kísérleteink során megvizsgáltuk a svéd és az ibériai mutációk együttes hatását, amelyek általánosak a familiáris öröklődésű AK-ban szenvedő betegekben (Palop and Mucke, 2016). Az APP^{NL-F} egerek az endogén, természetes egér promóter által vezérelt, humán APP svéd és ibériai mutációit expresszálják, valamint az A β 42 és A β 40 izoformákat olyan arányban fejezik ki, amely jellemző az emberi AK esetében. Ez teszi az APP^{NL-F} egereket ideális modellekké az A β agyra gyakorolt hatásainak vizsgálatához (Nilsson és mtsai, 2014).

A nem specifikus promóterek által szabályzott, az APP-t túlzott mértékben expresszáló egerek esetében lecsökkent a hippokampális SOM+ (Ramos és mtsai, 2006; Silva Albuquerque és mtsai, 2015; Stanley és mtsai, 2012) és a PV+IN-k (Brady és Mufson, 1997; Popovi és mtsai, 2008; Takahashi és mtsai, 2010) száma, ezzel szemben mi nem találtunk szignifikáns csökkenést ezen IN-ek sűrűségében. A PV idegsejtek körüli perineuronális háló károsodásáról szintén beszámoltak (Cattaud és mtsai, 2018; Sethi és Zaia, 2017; Testa és mtsai, 2019), ám az APP^{NL-F} egerekben nem észleltünk nyilvánvaló károsodást, hasonlóan az emberekben tapasztaltakhoz (Morawski és mtsai, 2004).

Míg a GABA_A receptorok sérülékenysége az AK-ban korábbról ismert volt (Limon és mtsai, 2012; Ulrich és Bettler, 2007), azonban méréseink során nem találtunk hatást a szomatikus GABA_Aerg és kolinerg szinapszisok GABA_A receptor tartalmának illetve szinaptikus rés szélességének változására a hippokampuszban. Megállapítottuk azonban, hogy az amiloid felhalmozódásnak lokális, neurotoxikus, gyulladáshatása van, mivel a közvetlen plakk közelében, tipikus mikroglialis és asztroglialis reakciókat és DN-eket figyeltünk meg.

Emberekben, az A β lerakódások glia aktiválódást, disztrófiás axonális folyamatokat és elváltozásokat okoznak a neurotranszmitter rendszerekben (Duyckaerts és mtsai, 2009; Sanchez-Varo és mtsai, 2012; Serrano-Pozo és mtsai, 2013), ami az AK lassú kifejlődéséhez vezet (Villemagne és mtsai, 2013). A mikroglia úgy tűnik, hogy hatékonyan képesek megakadályozni az A β plakkok terjedését APP^{NL-F} egerekben, mivel a DN képződése viszonylag kis térfogatra korlátozódott a plakk középpontja körül. A DN-kben szabálytalan mitokondriumokat, lizoszomális felhalmozódást, axonális duzzanatot és klaszterezett mitokondriumokat találtunk, amelyeket valószínűleg az axonális károsodással összefüggő kalcium-beáramlás és az azt követő mitokondriális diszfunkciók okozták (Green, 2009; Reddy and Flint, 2011). Ez valószínűleg akadályozta a mitokondriális mozgást, funkciót, és ami még fontosabb, a mitokondriális kalcium puffertolást (Contreras és mtsai, 2010; Williams és mtsai, 2013), amely legalább lokálisan megőrizhetné az axonális transzportot (Edwards, 2019). Ezen változások közül többet megfigyeltek az AK-ban szenvedő emberekben is. A legtöbb neurontípuson létrejött DN az APP^{NL-F} egerekben, kolinerg, glutamaterg, dopaminerg, SOM+ és CB1R+ GABA_Aerg disztrófiás boutonokat is megfigyeltünk. Azonban számos, az előrehaladt korrall összefüggő morfológiai változást észleltünk az azonos alomból származó, VT egerekben is, ilyen például a vakuolumok megjelenése, a rendellenes mielin elváltozások (szétesés, felcsavarodás) a CA1 réteg lacunosum-moleculare-ban, a gliózis; a disztrófiás neuritek és az amiloid plakkok teljesen hiányoztak a kontroll állatokból. Azonban számos mitokondrium- és lizoszóma-felhalmozódás, axonális duzzanat, fűrtös mitokondrium csoportosulással, valamint disztrófiás neuritek jellemzően csak APP^{NL-F} egerekben található.

Mivel az A β megnöveli a glutamát felszabadulási valószínűségét (Cummins és mtsai, 2015; Medawar és mtsai, 2019) és ezáltal magasabb lesz a piramisest-aktivitás, a

hálózati hiperaktivitás szintén gyakori azoknál az embereknél, akik svéd vagy ibériai familiáris AK mutációval rendelkeznek (Palop and Mucke, 2016). A helyi gyulladásos reakciókhoz kapcsolódó citokin-felszabadulás (Vezzani és Granata, 2005) elősegítheti az epileptiform jelenségek kialakulását az AD betegekben a betegség korai szakaszában (Akiyama és mtsai, 2014; Friedman és mtsai, 2012; Vossel, 2017). A magasabb piramissejt-aktivitás ugyanakkor homeosztatisz kompenzációs mechanizmusokat is indukálhat a helyi IN-okban (Palop és mtsai, 2007; De Strooper és Karran, 2016), amelyek hatékonyan gátolhatják a piramissejtek tüzelését. Megállapítottuk, hogy a PV neuronok ideálisak lennének ehhez a feladathoz, mivel jobban ellenállnak az A β -val kapcsolatos kihívásoknak. Ezeknek a gyorsan tüzelő IN-knak nagy a kalcium-puffer kapacitása (maga a parvalbumin hatékony kalciumkötő fehérje) (Eggermann és Jonas, 2012; Hu és mtsai, 2014b), és a mitokondriális sűrűségük tipikusan magasabb, mint a legtöbb más IN-nak (Gulyás és mtsai, 2006; Kageyama, 1982). Megállapítottuk, hogy a plakkok körül gazdagon megjelennek egészségesnek látszó PV-terminálisok, és PV-pozitív DN-eket is nagyon ritkán találtunk. A PV IN sűrűsége nem változott, és szinapszisaik is pozitív maradtak a GABA_A receptor alegységek tekintetében. Leírtuk azt is, hogy a PV-idegsejtek körüli perineuronális hálók épsége nem befolyásolódott a 18 hónapos APP^{NL-F} egerekben.

Megvizsgáltuk a hippocampusz négy különböző IN populációjának szinaptikus erősségét. Mivel a szinaptikus erősség és a terület szorosan korrelál (Holderith és mtsai, 2012), megbecsültük azoknak az IN-oknak a szinaptikus területeit, amelyek gátolják a piramissejtek aktivitását. Megállapítottuk, hogy a dendriteket célzó SOM+ IN-ok, a szómát célzó PV-/CB1R+ kosársejtek, PV+ kosársejtek szinapszisaik mérete nem változott. Ugyanakkor a kizárólag AIS-eket beidegző, PV+ axo-axonikus sejtek által létrehozott szinapszisaik (Ganter és mtsai, 2004; Somogyi és mtsai, 1983) mintegy 35%-kal, szignifikánsan nagyobbak voltak az APP^{NL-F} egerekben. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy az APP túlzott mértékű expresszióját mutató más AK modellek adataival ellentétben, a tiszta amiloidózis természetesebb fejlődése megkíméli a PV+ IN-eket még viszonylag idős APP^{NL-F} egerekben is. Ezen kívül a PV+ axo-axonikus sejtek hatékonyan ellensúlyozhatják az APP^{NL-F} egerek magasabb piramissejt-aktivitását. Ezek az eredmények azt is sugallják, hogy a PV-idegsejtek túlélését elősegítő mechanizmusokat ki lehetne használni a jövőbeni kezeléseknél, mivel ezek a folyamatok más sejtek

túlélését is támogathatják, és segíthetnek enyhíteni az A β -val kapcsolatos idegrendszeri gyulladáshatásokat.

Évtizedek óta a kolinerg kommunikáció domináns formájának a nem szinaptikus felszabadulást gondolták (Descarries, Laurent, Gisinger, Victor, Steriade, 1997; Lendvai and Vizi, 2008; Sarter és mtsaiés mtsai, 2012; Zoli és mtsaiés mtsai, 1999), amelyet látszólag olyan vizsgálatok támasztottak alá, amelyek kevés szinapszisú kolinerg rostokat mutattak be. Kimutatták, hogy az előagy kolinerg neuronok rendkívül nagy sebességgel és pontossággal reagálnak a jutalomra és a büntetésre (Hangya és mtsaiés mtsai, 2015) és hogy, a kolinerg sejtek figyelemre méltó pontossággal, milliszekundumos időskálán szabályozzák a kérgi információk feldolgozását (Gritton és mtsaiés mtsai, 2015; Gu and Yakel, 2011; Letzkus és mtsaiés mtsai, 2015; Muñoz and Rudy, 2014). Ezek az adatok sürgették annak felülvizsgálatát, hogy az acetilkolin felszabadulás és jelátvitel szinaptikus vagy nem szinaptikus formában történik-e.

Kutatócsoportunk már korábban bebizonyította, hogy a kolinerg rostok által létrehozott szinapszisok expresszálik a NL2 posztszinaptikus fehérjét (Takács és mtsaiés mtsai, 2013). Ez közvetlenül kölcsönhatásban van a gephyrinnel, a gátló, posztszinaptikus denzitások központi állványzófehérjéjével (Tyagarajan and Fritschy, 2014) és együttesen szerepet játszanak a GABA_A receptorok kihorgonyzásában (Dong és mtsaiés mtsai, 2007; Jedlicka és mtsaiés mtsai, 2011; Pouloupoulos és mtsaiés mtsai, 2009). Az korábbról már ismert volt, hogy a kolinerg terminálisok egy része létesít szinapszist, kutatócsoportunk azonban azt bizonyította, hogy mindegyik terminális szinapszist formál.

A hippocampusban a kolinerg rostokon a szinapszisokat NL2 jelöléssel azonosítottuk és rekonstrukció után vizsgáltuk. Miután megbizonyosodtunk arról, hogy az összes hippocampális kolinerg terminális a bazális előagy kolinerg sejtjeiből ered, azt találtuk, hogy gyakorlatilag az összes vizsgált hippocampális kolinerg terminális egy vagy több NL2-pozitív szinapszist létesített. A kolinerg axonok mentén a szinapszisok lineáris sűrűsége hasonló volt a GABAerg axonokéhoz. Hippocampus CA1 régiójában azt találtuk, hogy a NL2 és a gephyrin pozitív kolinerg szinapszisok elsősorban a piramissejtek dendritjeit és a tüskenyakakat idegzik be, valamint interneuron dendritjeit, míg néhány esetben a posztszinaptikus célt nem tudtuk beazonosítani.

Lokalizáltuk a posztszinaptikus GABAerg jelátvitel elemeit ezekben a kapcsolatokban. Elsőként a gephyrint vizsgáltuk, mert az kapcsolatban van mind a

GABA_A receptorokkal, mind pedig a NL2-vel. Megállapítottuk, hogy a hippocampális kolinerg rostok szinapszisainak legalább 81% -a tartalmaz gephyrint. Ezenkívül azt találtuk, hogy ezen szinapszisoknak legalább a 80%-ánál GABA_A receptor γ 2 alegység jelölés volt látható, amely mind a dendriteken, mind a tüskenyakakon könnyen kimutatható volt. Ezután lokalizáltuk a preszinaptikus GABA_Aerg és kolinerg jelátviteli rendszer elemeit ezekben a terminálisokban. A hippocampusban lévő, szeptális kolinerg terminálisok expresszálták a glutamát dekarboxiláz 65 (GAD65), GABA-szintetizáló enzimet is. Ezen túlmenően a kolinerg szepto-hippocampális terminálisok legalább 83%-a vGAT⁺ volt, míg a szepto-hippocampális kolinerg terminálisok 64% -ában volt kimutatható a vAChT. Végül kimutattuk, hogy a kolinerg terminálisok tartalmazzák GABA-t.

Mivel a kolinerg rendszer sérülékenysége jól ismert AK esetén, megvizsgáltuk a MS vírussal jelölt ChAT-sejtjeinek axonális arborizációját a hippocampusban, amely nem különbözött 22 hónapos VT és APP^{NL-F} egerekben. A tüskéket vagy dendriteket beidegező GABA_A receptor γ 2 alegységet tartalmazó vAChT-tal jelölt kolinerg rostokban nem találtunk szignifikáns változást a boutonok receptoralegység tartalmában. Az általunk talált eredményekhez hasonlóan, mások sem találtak szignifikáns különbségeket a vad típusú és a transzgénikus egerek között a kolinerg markerek aktivitását vizsgálva (Gau és mtsai és mtsai, 2002). Valamint az APP humán transzgénjének jelenléte más munkák szerint sem járul hozzá az előagy kolinerg neuronok sebezhetőségéhez (Wenk és mtsai és mtsai, 2004)

VII. KÖVETKEZTETÉSEK

A hippokampális SOM+ és a PV+IN-k számában nem találtunk szignifikáns csökkenést. Kísérleteink során nem találtunk hatást a szomatikus GABAerg és kolinerg szinapszisok GABA_A receptor tartalmának illetve szinaptikus rés szélességének változására a hippokampusban.

Megállapítottuk azonban, hogy az amiloid felhalmozódásnak lokális, neurotoxikus, gyulladáshatása van, mivel a közvetlen plakkközelében, tipikus mikroglialis és asztroglialis reakciókat és DN-eket figyeltünk meg. A mikroglia úgy tűnik, hogy hatékonyan képesek megakadályozni az A β plakkok terjedését APP^{NL-F} egerekben, mivel a DN képződése viszonylag kis térfogatra korlátozódott a plakkközéppontja körül. A DN-kben szabálytalan mitokondriumokat, lizoszomális felhalmozódást, axonális duzzanatot és klaszterezett mitokondriumokat találtunk.

A legtöbb neurontípuson létrejött DN az APP^{NL-F} egerekben, kolinerg, glutamaterg, dopaminerg, SOM+ és CB1R+ GABAerg disztrófiás boutonokat is megfigyeltünk. Számos mitokondrium- és lizoszóma-felhalmozódás, axonális duzzanat, fürtös mitokondrium csoportosulással, valamint disztrófiás neuritek jellemzően csak APP^{NL-F} egerekben található.

Megállapítottuk, hogy a plakkok körül gazdagon megjelennek egészségesnek látszó PV-terminálisok, és PV-pozitív DN-eket is nagyon ritkán találtunk. A PV IN sűrűsége nem változott, és szinapszisaik is pozitív maradtak a GABA_A receptor alegységek tekintetében. Leírtuk azt is, hogy a PV-idegsejtek körüli perineuronális hálóképződése nem befolyásolódott a 18 hónapos APP^{NL-F} egerekben.

Megvizsgáltuk a hippokampusz négy különböző IN populációjának szinaptikus erősségét. Megállapítottuk, hogy a dendriteket célzó SOM+ IN-ok, a szómát célzó PV-/CB1R+ kosársejtek, PV+ kosársejtek szinapszisaik mérete nem változott. Ugyanakkor a kizárólag AIS-eket beidegző, PV+ axo-axonikus sejtek által létrehozott szinapszisok, mintegy 35%-kal, szignifikánsan nagyobbak voltak az APP^{NL-F} egerekben.

A hippokampusban a kolinerg rostokon a szinapszisokat NL2 jelöléssel azonosítottuk és rekonstrukció után vizsgáltuk. Miután megbizonyosodtunk arról, hogy az összes hippokampális kolinerg terminális a bazális előagy kolinerg sejtjeiből ered, azt találtuk, hogy gyakorlatilag az összes vizsgált hippokampális kolinerg terminális egy vagy több NL2-pozitív szinapszist létesített. A kolinerg axonok mentén a szinapszisok

lineáris sűrűsége hasonló volt a GABAerg axonokéhoz. Hippokampusz CA1 régiójában azt találtuk, hogy a NL2 és a gephyrin pozitív kolinerg szinapszisok elsősorban a piramissejtek dendritjeit és a tüskenyakakat idegzik be, valamint interneuron dendritjeit, míg néhány esetben a posztszinaptikus célt nem tudtuk beazonosítani.

Lokalizáltuk a posztszinaptikus GABAerg jelátvitel elemeit ezekben a kapcsolatokban. Megállapítottuk, hogy a hippocampális kolinerg rostok szinapszisainak legalább 81% -a tartalmaz gephyrint. Ezenkívül azt találtuk, hogy ezen szinapszisoknak legalább a 80%-ánál GABA_A receptor $\gamma 2$ alegység jelölés volt látható, amely mind a dendriteken, mind a tüskenyakakon könnyen kimutatható volt. Ezután lokalizáltuk a preszinaptikus GABAerg és kolinerg jelátviteli rendszer elemeit ezekben a terminálisokban. A hippocampuszban lévő, szeptális kolinerg terminálisok expresszálták a glutamát dekarboxiláz 65, GABA-szintetizáló enzimet is. Ezen túlmenően a kolinerg szepto-hippocampális terminálisok legalább 83%-a vGAT+ volt, míg a szepto-hippocampális kolinerg terminálisok 64% -ában volt kimutatható a vAChT. Végül kimutattuk, hogy a kolinerg terminálisok tartalmazzák GABA-t.

Mivel a kolinerg rendszer sérülékenysége jól ismert AK esetén, megvizsgáltuk a MS vírussal jelölt ChAT-sejtjeinek axonális arborizációját a hippocampuszban, amely nem különbözött 22 hónapos VT és APP^{NL-F} egerekben. A tüskéket vagy dendriteket beidegező GABA_A receptor $\gamma 2$ alegységet tartalmazó vAChT-tal jelölt kolinerg rostokban nem találtunk szignifikáns változást a boutonok receptoralegység tartalmában.

VIII. ÖSSZEFOGLALÁS

Az Alzheimer-kór egy olyan neurodegeneratív rendellenesség, amely a kognitív képességek csökkenésével majd teljes elvesztésével járhat együtt, egyik jellemzője az agy különböző területein megjelenő amiloid-béta lerakódások, amelyet az APP proteolízise okoz. Mi ennek hatását vizsgáltuk egér modellben. APP^{NL-F} egerekben az APP gént megváltoztatták, mely így két emberi familiáris AK mutációt is tartalmaz, amelyeket - az AK más egérmodelleivel ellentétben - endogén egér APP promóter vezérel. BF-SEM használatával és 3D rekonstrukció után, nem találtunk változásokat a a hippokampális interneuronok esetében GABA_A receptor pozitivitásában és a hippocampalis interneuronok szomatikus és dendritikus szinapszisainak méretében APP^{NL-F} és vad típusú egerek között. Szintén nem találtunk eltéréseket a PV+ interneuronok körül elhelyezkedő perineuronális hálózat kifejeződésében, valamint a hippokampális PV+ vagy SOM+ IN-ok sűrűségben. A modellállatban kialakultak amiloid plakkok, amelyek körül disztrófiás neuritek jelentek meg. A többi vizsgált sejtípussal ellentétben, azonban a PV IN-ok csak alkalmanként és enyhén voltak disztrófiásak az A β plakkok körül, és az axon kezdeti szegmenst célzó PV+ IN-ok szinapszissai jelentősen megnövekedtek. Eredményeink azt sugallják, hogy a PV IN-ok nagyon ellenállóak az amiloidózissal szemben APP^{NL-F} egerekben és a hippocampalis piramissejtek amiloid által kiváltott ingerlékenység-növekedése kompenzálható lehet a PV+ AIS-célzó sejtek által. Azokat a mechanizmusokat, amelyek a PV neuronokat ellenállóbbakká teszik, ki lehetne használni az AK kezelésében.

Továbbá megmutattuk, hogy a hippokampusz kolinerg terminálisainak mindegyikén szinapszisokon keresztül történik a jelátvitel ráadásul ezek hatékony GABAerg szinapszisok is egyben. Mivel ezek adják a kéreg egyik legsűrűbb és legjelentősebb szubkortikális beidegzését, ezért eredményeink átírták a hippokampális állapotok szabályozásával kapcsolatos eddigi tankönyvi adatokat és immár új modellek létrehozását sürgetik.

IX. SUMMARY

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder that can be associated with decreased and then complete loss of cognitive abilities, characterized by amyloid-beta deposits in various areas of the brain caused by proteolysis of APP. We investigated the effect of this in a mouse model. In APP^{NL-F} mice, the APP gene has been altered, thus containing two human familial AD mutations that, unlike other mouse models of AD, are driven by the endogenous mouse APP promoter. Using BF-SEM and after 3D reconstruction, we found no changes in GABA_A receptor positivity in hippocampal interneurons and in the size of somatic and dendritic synapses of hippocampal interneurons between APP^{NL-F} and wild-type mice, and hippocampal PV + or SOM + INs in density. Amyloid plaques formed in the model animal, around which dystrophic neurites appeared. However, in contrast to the other cell types studied, PV INs were only occasionally and mildly dystrophic around A β plaques, and the synapses of PV + INs targeting the initial axon segment were significantly increased. Our results suggest that PV INs are highly resistant to amyloidosis in APP^{NL-F} mice and that the amyloid-induced increase in hippocampal pyramidal cells may be compensated for by PV + AIS-targeting cells. The mechanisms that make PV neurons more resistant could be exploited in the treatment of AD.

Furthermore, we have shown that each of the cholinergic terminals of the hippocampus transmits signals through synapses, and these are also efficient GABAergic synapses. Because they provide one of the densest and most significant subcortical innervations in the cortex, our results rewrote previous textbook data on the regulation of hippocampal conditions and now urge the creation of new models.

X. IRODALOMJEGYZÉK

- Abercrombie, M. (1946). Estimation of nuclear population from microtome section. *Anat. Rec.* *94*, 239–247.
- Abramov, E., Dolev, I., Fogel, H., Ciccotosto, G.D., Ruff, E., and Slutsky, I. (2009). Amyloid-B as a positive endogenous regulator of release probability at hippocampal synapses. *Nat. Neurosci.* *12*, 1567–1576.
- Acsády, L., Kamondi, A., Sík, A., Freund, T., and Buzsáki, G. (1998). GABAergic cells are the major postsynaptic targets of mossy fibers in the rat hippocampus. *J. Neurosci.* *18*, 3386–3403.
- Akiyama, H., Barger, S., Barnum, S., Bradt, B., Bauer, J., Cole, G.M., Cooper, N.R., Eikelenboom, P., Fiebich, B.L., Finch, C.E., (2014). Inflammation and Alzheimer's.
- Amatniek, J.C., Hauser, W.A., DelCastillo-Castaneda, C., Jacobs, D.M., Marder, K., Bell, K., Albert, M., Brandt, J., and Stern, Y. (2006). Incidence and predictors of seizures in patients with Alzheimer's disease. *Epilepsia* *47*, 867–872.
- Andersen, P.; Bliss, T.V.P.. S.K.K. (1971). Lamellar Organization of Hippocampal Excitatory Pathways. *238*, 222–238.
- Andersen, Per; Morris, Richard; Amaral, David G; Bliss, Tim; O'Keefe, J. (2009). *The Hippocampus Book*. (Oxford University Press).
- Andersen P. (2007). *The Hippocampus book* (Oxford University Press).
- Arvanitakis, Z., Wilson, R.S., Bienias, J.L., Evans, D.A., and Bennett, D.A. (2004). Diabetes Mellitus and Risk of Alzheimer Disease and Decline in Cognitive Function. *Arch. Neurol.* *61*, 661–666.
- Attila Sík. György Buzsáki (1995). Hippocampal CA1 Interneurons : Labeling Study An in vivo Intracellular. *J. Neurosci.* *75*, 6651–6665.
- Auld, D.S., Kar, S., and Quirion, R. (1998). β -amyloid peptides as direct cholinergic neuromodulators: A missing link? *Trends Neurosci.* *21*, 43–49.
- Aznar, S., Qian, Z.X., and Knudsen, G.M. (2004). Non-serotonergic dorsal and median raphe projection onto parvalbumin- and calbindin-containing neurons in hippocampus and septum. *Neuroscience* *124*, 573–581.
- Aznavour, N., Watkins, K.C., and Descarries, L. (2005). Postnatal Development of the

- Cholinergic Innervation in the Dorsal Hippocampus of Rat : Quantitative Light and Electron Microscopic. *75*, 61–75.
- Barage, S.H., and Sonawane, K.D. (2015). Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. *Neuropeptides* *52*, 1–18.
- Baruch-Suchodolsky, R., and Fischer, B. (2009). A β 40, either Soluble or Aggregated, Is a Remarkably Potent Antioxidant in Cell-Free Oxidative Systems. *Biochemistry* *48*, 4354–4370.
- Baude, A., Bleasdale, C., Dalezios, Y., Somogyi, P., and Klausberger, T. (2007). Immunoreactivity for the GABAA receptor alpha1 subunit, somatostatin and Connexin36 distinguishes axoaxonic, basket, and bistratified interneurons of the rat hippocampus. *Cereb. Cortex* *17*, 2094–2107.
- Bertram, L., Lill, C.M., and Tanzi, R.E. (2010). The genetics of alzheimer disease: Back to the future. *Neuron* *68*, 270–281.
- Beydoun, M.A., Beydoun, H.A., and Wang, Y. (2008). Obesity and central obesity as risk factors for incident dementia and its subtypes: A systematic review and meta-analysis (*Obesity Reviews* (2008) *9*, (204-218)). *Obes. Rev.* *9*, 267.
- Bezaire, M.J.. S.I. (2013). Quantitative Assessment of CA' Local Circuits: Knowledge Base for Interneuron-Pyramidal Cell Connectivity. *Hippocampus* *23*, 751–785.
- Blasco-Ibáñez, J.M., and Freund, T.F. (1997). Distribution, ultrastructure, and connectivity of calretinin-immunoreactive mossy cells of the mouse dentate gyrus. *Hippocampus* *7*, 307–320.
- Blennow, K., Leon, M.J. De, and Zetterberg, H. (2006). Alzheimer ' s disease. *368*, 387–403.
- Blusztajn, J.K., and Rinnofner, J. (2016). Intrinsic Cholinergic Neurons in the Hippocampus : Fact or Artifact ? *8*, 6–11.
- Bolós, M., Perea, J.R., and Avila, J. (2017). Alzheimer's disease as an inflammatory disease. *Biomol. Concepts* *8*, 37–43.
- Borhegyi, Z., Varga, V., Szilágyi, N., Fabo, D., and Freund, T.F. (2004a). Phase segregation of medial septal GABAergic neurons during hippocampal theta activity. *J. Neurosci.* *24*, 8470–8479.
- Borhegyi, Z., Varga, V., Szilágyi, N., Fabo, D., and Freund, T.F. (2004b). Phase Segregation of Medial Septal GABAergic Neurons during Hippocampal Theta

- Activity. *J. Neurosci.* *24*, 8470–8479.
- Born, H.A., Kim, J.Y., Savjani, R.R., Das, P., Dabaghian, Y.A., Guo, Q., Yoo, J.W., Schuler, D.R., Cirrito, J.R., Zheng, H., (2014). Genetic suppression of transgenic APP rescues hypersynchronous network activity in a mouse model of alzheimer’s disease. *J. Neurosci.* *34*, 3826–3840.
- Brady, D.R., and Mufson, E.J. (1997). Parvalbumin-immunoreactive neurons in the hippocampal formation of Alzheimer’s diseased brain. *Neuroscience* *80*, 1113–1125.
- Brejyeh, Z., Karaman, R., Fredes, F., Silva, M.A., Koppensteiner, P., Kobayashi, K., Joesch, M., Shigemoto, R., Vierock, J., Rodriguez-Rozada, S., (2021). Is tau in the absence of amyloid on the Alzheimer’s continuum?: A study of discordant PET positivity. *Molecules* *31*, 1–104.
- Buhl, E.H., Halasy, K., and Somogyi, P. (1994). Diverse sources of hippocampal unitary inhibitory postsynaptic potentials and the number of synaptic release sites. *Nature* *368*, 823–828.
- Burns, A., and Iliffe, S. (2009). Alzheimer’s disease. *BMJ* *338*, 467–471.
- Campion, D., Flaman, J.M., Brice, A., Hannequin, D., Dubois, B., Martin, C., Moreau, V., Charbonnier, F., Didierjean, O., Tardieu, S., (1995). Mutations of the presenilin I gene in families with early-onset alzheimer’s disease. *Hum. Mol. Genet.* *4*, 2373–2377.
- Cardona, A., Saalfeld, S., Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Preibisch, S., Longair, M., Tomancak, P., Hartenstein, V., and Douglas, R.J. (2012). TrakEM2 software for neural circuit reconstruction. *PLoS One* *7*.
- Catado, Janine K; Staton, A.G. (2010). Smoking cessation and ALzheimer’s disease:facts, fallacies and promises. *Exp. Rev. Neurother.* *10*, 629–631.
- Cattaud, V., Bezzina, C., Rey, C.C., Lejards, C., Dahan, L., and Verret, L. (2018). Early disruption of parvalbumin expression and perineuronal nets in the hippocampus of the Tg2576 mouse model of Alzheimer’s disease can be rescued by enriched environment. *Neurobiol. Aging* *72*, 147–158.
- Contestabile, A. (2011). The history of the cholinergic hypothesis. *Behav. Brain Res.* *221*, 334–340.
- Contreras, L., Drago, I., Zampese, E., and Pozzan, T. (2010). Mitochondria: The

- calcium connection. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1797, 607–618.
- Crespel, A., Baldy-Moulinier, M., and Coubes, P. (1998). The relationship between sleep and epilepsy in frontal and temporal lobe epilepsies: Practical and physiopathologic considerations. *Epilepsia* 39, 150–157.
- Crook, R., Verkkoniemi, A., Perez-Tur, J., Mehta, N., Baker, M., Houlden, H., Farrer, M., Hutton, M., Lincoln, S., Hardy, J., (1998). A variant of Alzheimer's disease with spastic paraparesis and unusual plaques due to deletion of exon 9 of presenilin 1. *Nat. Med.* 4, 452–455.
- Cruts, M., Backhovens, H., Wang, S.Y., Van Gassen, G., Theuns, J., De Jonghe, C., Wehnert, A., De Voecht, J., De Winter, G., Cras, P. (1995). Molecular genetic analysis of familial early-onset alzheimer's disease linked to chromosome 14q24.3. *Hum. Mol. Genet.* 4, 2363–2371.
- Cummings, D.M., Liu, W., Portelius, E., Bayram, S., Yasvoina, M., Ho, S.H., Smits, H., Ali, S.S., Steinberg, R., Pegasiou, C.M., (2015). First effects of rising amyloid- β in transgenic mouse brain: Synaptic transmission and gene expression. *Brain* 138, 1992–2004.
- Cummings, J., Aisen, P.S., Dubois, B., Frölich, L., Jack, C.R., Jones, R.W., Morris, J.C., Raskin, J., Dowsett, S.A., and Scheltens, P. (2016). Drug development in Alzheimer's disease: The path to 2025. *Alzheimer's Res. Ther.* 8, 1–12.
- D.M. Amstron (1989). Substance P and somatostatin coexist within neuritic plaques: Implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neuroscience* 31, 663–671.
- D'Andrea, M.R., and Nagele, R.G. (2010). Morphologically distinct types of amyloid plaques point the way to a better understanding of Alzheimer's disease pathogenesis. *Biotech. Histochem.* 85, 133–147.
- DeBoer, S.R., DeBoer, S.R., Sisodia, S.S., Dolios, G., and Wang, R. (2014). Differential release of β -amyloid from dendrite- versus axon-targeted APP. *J. Neurosci.* 34, 12313–12327.
- DeFelipe, J. (1999). Chandelier cells and epilepsy. *Brain* 122, 1807–1822.
- Descarries, Laurent, Gisinger, Victor, Steriade, M. (1997). Diffuse transmission by acetylcholine in the CNS. *53*, 603–625.
- Dobolyi, A., Irwin, S., Makara, G., Usdin, T.B., and Palkovits, M. (2005). Calcitonin

- gene-related peptide-containing pathways in the rat forebrain. *J. Comp. Neurol.* *489*, 92–119.
- Dong, H.K., Gim, J.A., Yeo, S.H., and Kim, H.S. (2017). Integrated late onset Alzheimer's disease (LOAD) susceptibility genes: Cholesterol metabolism and trafficking perspectives. *Gene* *597*, 10–16.
- Dong, N., Qi, J., and Chen, G. (2007). Molecular reconstitution of functional GABAergic synapses with expression of neuroligin-2 and GABAA receptors. *Mol. Cell. Neurosci.* *35*, 14–23.
- Du, X., Wang, X., and Geng, M. (2018). Alzheimer's disease hypothesis and related therapies. *Transl. Neurodegener.* *7*, 1–7.
- Duyckaerts, C., Delatour, B., and Potier, M.C. (2009). Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol.* *118*, 5–36.
- E. Hellstrom-Lindahl, M.V. and A.M. (2009). Comparison of A β levels in the brain of Swedish APP670, 671 and PS1M146V mutation carriers and patients with sporadic Alzheimer's disease. *Neurochem Int* *55*, 243–252.
- Edwards, F.A. (2019). A Unifying Hypothesis for Alzheimer's Disease: From Plaques to Neurodegeneration. *Trends Neurosci.* *42*, 310–322.
- Eggermann, E., and Jonas, P. (2012). How the “slow” Ca²⁺ buffer parvalbumin affects transmitter release in nanodomain-coupling regimes. *Nat. Neurosci.* *15*, 20–22.
- Ferando, I., and Mody, I. (2015). In vitro gamma oscillations following partial and complete ablation of δ subunit-containing GABAA receptors from parvalbumin interneurons. *Neuropharmacology* *88*, 91–98.
- Ferencz, I., Leanza, G., Nanobashvili, A., Kokaia, Z., Kokaia, M., and Lindvall, O. (2001). Septal cholinergic neurons suppress seizure development in hippocampal kindling in rats: Comparison with noradrenergic neurons. *Neuroscience* *102*, 819–832.
- Fiala, J.C. (2005). Reconstruct: A free editor for serial section microscopy. *J. Microsc.* *218*, 52–61.
- Foidl, B.M., Do-Dinh, P., Hutter-Schmid, B., Bliem, H.R., and Humpel, C. (2016). Cholinergic neurodegeneration in an Alzheimer mouse model overexpressing amyloid-precursor protein with the Swedish-Dutch-Iowa mutations. *Neurobiol. Learn. Mem.* *136*, 86–96.

- Francis, P.T., Webster, M. -T, Chessel, I.P., Holmes, C., Strattmann, G.C., Procter, A.W., Cross, A.J., Green, A.R., and Bowen, D.M. (1993). Neurotransmitters and Second Messengers in Aging and Alzheimer's Disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 695, 19–26.
- Francis, P.T., Palmer, A.M., Snape, M., and Wilcock, G.K. (1999). The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: A review of progress. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 66, 137–147.
- Frankfurt, M., Siegel, R.A., Sim, I., and Wuttke, W. (1986). Estrous cycle variations in cholecystikinin and substance P concentrations in discrete areas of the rat brain. *Neuroendocrinology* 42, 226–231.
- Frauscher, B., Von Ellenrieder, N., Dubeau, F., and Gotman, J. (2016). EEG desynchronization during phasic REM sleep suppresses interictal epileptic activity in humans. *Epilepsia* 57, 879–888.
- Freund, Tamas F., Buzsáki, G. (1996). Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6, 347–470.
- Freund, T.F., and Buzsáki, G. (1996). Interneurons of the Hippocampus. *Hippocampus* 6, 347–470.
- Freund, T.F., and Katona, I. (2007). Perisomatic Inhibition. *Neuron* 56, 33–42.
- Freund, T.F., Martin, K.A.C., Smith, A.D., and Somogyi, P. (1983). Glutamate decarboxylase-immunoreactive terminals of Golgi-impregnated axoaxonic cells and of presumed basket cells in synaptic contact with pyramidal neurons of the cat's visual cortex. *J. Comp. Neurol.* 221, 263–278.
- Freund, T.F., Buzsáki, G., Prohaska, O.J., Leon, A., and Somogyi, P. (1989). Simultaneous recording of local electrical activity, partial oxygen tension and temperature in the rat hippocampus with a chamber-type microelectrode. Effects of anaesthesia, ischemia and epilepsy. *Neuroscience* 28, 539–549.
- Freund, T.F., Katona, I., and Piomelli, D. (2003). Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol. Rev.* 83, 1017–1066.
- Friedman, D., Honig, L.S., and Scarmeas, N. (2012). Seizures and Epilepsy in Alzheimer's Disease. *CNS Neurosci. Ther.* 18, 285–294.
- Frotscher, Michael; Schlander, Michael; Leranth, C. (1986). Cholinergic neurons in the hippocampus. *Cell Tissue Res.* 246, 293–301.

- Fuchs, E.C., Zivkovic, A.R., Cunningham, M.O., Middleton, S., LeBeau, F.E.N., Bannerman, D.M.M., Rozov, A., Whittington, M.A., Traub, R.D., Rawlins, J.N.P., (2007). Recruitment of Parvalbumin-Positive Interneurons Determines Hippocampal Function and Associated Behavior. *Neuron* 53, 591–604.
- Fuchs, E.C., Neitz, A., Pinna, R., Melzer, S., Caputi, A., Monyer, H., Fuchs, E.C., Neitz, A., Pinna, R., Melzer, S., (2016). Local and Distant Input Controlling Excitation in Layer II of the Medial Entorhinal Cortex Article Local and Distant Input Controlling Excitation in Layer II of the Medial Entorhinal Cortex. *Neuron* 89, 194–208.
- Fuhrmann, F., Justus, D., Fuhrmann, M., Remy, S., Fuhrmann, F., Justus, D., Sosulina, L., Kaneko, H., Beutel, T., and Friedrichs, D. (2015). Correlated Firing of Hippocampal Neurons Are Controlled by a Medial Septal Glutamatergic Circuit Locomotion , Theta Oscillations , and the Speed- Correlated Firing of Hippocampal Neurons Are Controlled by a Medial Septal Glutamatergic Circuit. *Neuron* 1–12.
- Gall, C., and Moore, R.Y. (1984). Distribution of enkephalin, substance P, tyrosine hydroxylase, and 5-hydroxytryptamine immunoreactivity in the septal region of the rat. *J. Comp. Neurol.* 225, 212–227.
- Ganter, P., Szücs, P., Paulsen, O., and Somogyi, P. (2004). Properties of horizontal axo-axonic cells in stratum oriens of the hippocampal CA1 area of rats in vitro. *Hippocampus* 14, 232–243.
- Gau, J.T., Steinhilb, M.L., Kao, T.C., D’Amato, C.J., Gaut, J.R., Frey, K.A., and Turner, R.S. (2002). Stable β -secretase activity and presynaptic cholinergic markers during progressive central nervous system amyloidogenesis in Tg2576 mice. *Am. J. Pathol.* 160, 731–738.
- Geula, C., Nagykerly, N., Nicholas, A., and Wu, C.-K. (2008). Early cholinergic neuronal and axonal pathology in aging and AD. *J. Neuropathol Exp Neurol* 67, 309–318.
- Goate, A., and Hardy, J. (2012). Twenty years of Alzheimer’s disease-causing mutations. *J. Neurochem.* 120, 3–8.
- Goedert, M., and Spillantini, M.G. (2006). REVIEWS A Century of Alzheimer ’ s Disease. *Science* (80-.). 777–781.

- Green, K.N. (2009). Calcium in the initiation, progression and as an effector of Alzheimer's disease pathology. *J. Cell. Mol. Med.* *13*, 2787–2799.
- Gritton, H.J., Howe, W.M., Mallory, C.S., Hetrick, V.L., Berke, J.D., and Sarter, M. (2015). Cortical cholinergic signaling controls the detection of cues. 1–9.
- Grünblatt, E., Zehetmayer, S., Bartl, J., Löffler, C., Wichart, I., Rainer, M.K., Jungwirth, S., Bauer, P., Danielczyk, W., Tragl, K.H. (2009). Genetic risk factors and markers for Alzheimer's disease and/or depression in the VITA study. *J. Psychiatr. Res.* *43*, 298–308.
- Gu, Z., and Yakel, J.L. (2011). Article Timing-Dependent Septal Cholinergic Induction of Dynamic Hippocampal Synaptic Plasticity. *Neuron* *71*, 155–165.
- Gulyás, A.I., and Freund, T.F. (1996). Pyramidal cell dendrites are the primary targets of calbindin D28k-immunoreactive interneurons in the hippocampus. *Hippocampus* *6*, 525–534.
- Gulyás, A.I., Mlles, R., Hájos, N., and Freund, T.F. (1993). Precision and Variability in Postsynaptic Target Selection of Inhibitory Cells in the Hippocampal CA3 Region. *Eur. J. Neurosci.* *5*, 1729–1751.
- Gulyás, A.I., Hájos, N., Katona, I., and Freund, T.F. (2003). Interneurons are the local targets of hippocampal inhibitory cells which project to the medial septum. *Eur. J. Neurosci.* *17*, 1861–1872.
- Gulyás, A.I., Buzsáki, G., Freund, T.F., and Hirase, H. (2006). Populations of hippocampal inhibitory neurons express different levels of cytochrome c. *Eur. J. Neurosci.* *23*, 2581–2594.
- H. Ferreira-Vieira, T., M. Guimaraes, I., R. Silva, F., and M. Ribeiro, F. (2016). Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. *Curr. Neuropharmacol.* *14*, 101–115.
- Haam, J., and Yakel, J.L. (2017). Cholinergic modulation of the hippocampal region and memory function. *J. Neurochem.* *142*, 111–121.
- Hájos, N., and Freund, T.F. (2002). Pharmacological separation of cannabinoid sensitive receptors on hippocampal excitatory and inhibitory fibers. *Neuropharmacology* *43*, 503–510.
- Hájos, N., Acsády, L., and Freund, T.F. (1996). Target selectivity and neurochemical characteristics of VIP-immunoreactive interneurons in the rat dentate gyrus. *Eur.*

J. Neurosci. 8, 1415–1431.

- Hama, E., and Saido, T.C. (2005). Etiology of sporadic Alzheimer's disease: Somatostatin, neprilysin, and amyloid β peptide. *Med. Hypotheses* 65, 498–500.
- Hampel, H., Mesulam, M.M., Cuello, A.C., Farlow, M.R., Giacobini, E., Grossberg, G.T., Khachaturian, A.S., Vergallo, A., Cavedo, E., Snyder, P.J., (2018). The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain* 141, 1917–1933.
- Hangya, B., Borhegyi, Z., Szilagy, N., Freund, T.F., and Varga, V. (2009). GABAergic Neurons of the Medial Septum Lead the Hippocampal Network during Theta Activity. *J. Neurosci.* 29, 8094–8102.
- Hangya, B., Ranade, S.P., Lorenc, M., and Kepecs, A. (2015). Central Cholinergic Neurons Are Rapidly Recruited by Reinforcement Feedback. *Cell* 162, 1155–1168.
- Hardy, J. (1997). Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 20, 154–159.
- Harrison, J.R., and Owen, M.J. (2016). Alzheimer's disease: The amyloid hypothesis on trial. *Br. J. Psychiatry* 208, 1–3.
- Hasselmo, M.E., and Bower, J.M. (1993). Acetylcholine and memory. *Trends Neurosci.* 16, 218–222.
- Hoey, S.E., Williams, R.J., and Perkinson, M.S. (2009). Synaptic NMDA receptor activation stimulates α -secretase amyloid precursor protein processing and inhibits amyloid- β Production. *J. Neurosci.* 29, 4442–4460.
- Holderith, N., Lorincz, A., Katona, G., Rózsa, B., Kulik, A., Watanabe, M., and Nusser, Z. (2012). Release probability of hippocampal glutamatergic terminals scales with the size of the active zone. *Nat. Neurosci.* 15, 988–997.
- Hu, H., Gan, J., and Jonas, P. (2014a). Fast-spiking, parvalbumin+ GABAergic interneurons: From cellular design to microcircuit function. *Science* (80-.). 345.
- Hu, H., Gan, J., and Jonas, P. (2014b). Fast-spiking, parvalbumin+ GABAergic interneurons: From cellular design to microcircuit function. *Science* (80-.). 345.
- Huang, Yadong; Mucke, L. (2012). Alzheimer Mechanism and Therapeutic Strategies. *Cell* 148, 1204–1222.
- Huang, Y.M., Shen, J., and Zhao, H.L. (2019). Major Clinical Trials Failed the Amyloid

- Hypothesis of Alzheimer's Disease. *J. Am. Geriatr. Soc.* 67, 841–844.
- Huh, C.Y.L., Goutagny, R., and Williams, S. (2010). Glutamatergic neurons of the mouse medial septum and diagonal band of Broca synaptically drive hippocampal pyramidal cells: relevance for hippocampal theta rhythm. *J. Neurosci.* 30, 15951–15961.
- Igbavboa (2009). Amyloid β -Protein Stimulates Trafficking of Cholesterol and Caveolin-1 from the Plasma Membrane to the Golgi Complex in Mouse Primary Astrocytes *Urole. Neuroscience* 162, 1328–1338.
- Jedlicka, P., Hoon, M., Papadopoulos, T., Vlachos, A., Winkels, R., Pouloupoulos, A., Betz, H., Deller, T., Brose, N., Varoqueaux, F., (2011). Increased dentate gyrus excitability in neuroligin-2-deficient mice in vivo. *Cereb. Cortex* 21, 357–367.
- Jinno, S., and Kosaka, T. (2000). Colocalization of parvalbumin and somatostatin-like immunoreactivity in the mouse hippocampus: Quantitative analysis with optical disector. *J. Comp. Neurol.* 428, 377–388.
- Jinno, S., and Kosaka, T. (2006). Cellular architecture of the mouse hippocampus: A quantitative aspect of chemically defined GABAergic neurons with stereology. *Neurosci. Res.* 56, 229–245.
- Jinno, S., Klausberger, T., Marton, L.F., Dalezios, Y., Roberts, J.D.B., Fuentealba, P., Bushong, E. a, Henze, D., Buzsáki, G., and Somogyi, P. (2007). Neuronal diversity in GABAergic long-range projections from the hippocampus. *J. Neurosci.* 27, 8790–8804.
- Jones, B.E. (1993). The organization of central cholinergic systems and their functional importance in sleep-waking states. *Prog. Brain Res.* 98, 61–71.
- Justus, D., Dalügge, D., Bothe, S., Fuhrmann, F., Hannes, C., Kaneko, H., Friedrichs, D., Sosulina, L., Schwarz, I., Elliott, D.A., (2016). Glutamatergic synaptic integration of locomotion speed via septoentorhinal projections. *Nat. Publ. Gr.*
- Kageyama, G.H. (1982). Histochemical localization of cytochrome oxidase in the hippocampus: Correlation with specific neuronal types and afferent pathways. *Neuroscience* 7, 2337–2361.
- Kar, S., Issa, A.M., Seto, D., Auld, D.S., Collier, B., and Quirion, R. (2002). Amyloid β -Peptide Inhibits High-Affinity Choline Uptake and Acetylcholine Release in Rat Hippocampal Slices. *J. Neurochem.* 70, 2179–2187.

- Karlócai, M.R., Kohus, Z., Káli, S., Ulbert, I., Szabó, G., Máté, Z., Freund, T.F., and Gulyás, A.I. (2014). Physiological sharp wave-ripples and interictal events in vitro: What's the difference? *Brain* *137*, 463–485.
- Katona, I., Sperlág, B., Sík, A., Káfalvi, A., Vizi, E.S., Mackie, K., and Freund, T.F. (1999). Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. *J. Neurosci.* *19*, 4544–4558.
- Katona, L., Micklem, B., Borhegyi, Z., Swiejkowski, D.A., Valenti, O., Viney, T.J., Kotzadimitriou, D., Klausberger, T., and Somogyi, P. (2017). Behavior-dependent activity patterns of GABAergic long-range projecting neurons in the rat hippocampus. *Hippocampus* *27*, 359–377.
- Kiss, J., Borhegyi, Z., and Csaky, A. (1997). Parvalbumin-containing cells of the angular portion of the vertical limb terminate on calbindin-immunoreactive neurons located at the border between the lateral and medial septum of the rat. 48–56.
- Kiss J, Patel AJ, Baimbridge KG, F.T. (1990). Topographical Of Neurons Containing Parvalbumin And Choline Acetyltransferase Septum-Diagonal Band Region Of The Rat. *Neuroscience* *36*, 61–72.
- Kivipelto, M., Ngandu, T., Fratiglioni, L., Viitanen, M., Kåreholt, I., Winblad, B., Helkala, E.L., Tuomilehto, J., Soininen, H., and Nissinen, A. (2005). Obesity and vascular risk factors at midlife and the risk of dementia and Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* *62*, 1556–1560.
- Klausberger, T., and Somogyi, P. (2008). Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. *Science* *321*, 53–57.
- Klausberger, T., Magill, P.J., Cobden, P.M., and Somogyi, P. (2003). Brain-state- and cell-type-specific firing of hippocampal interneurons in vivo. *421*.
- Klausberger, T., Márton, L.F., Baude, A., Roberts, J.D.B., Magill, P.J., and Somogyi, P. (2004). Spike timing of dendrite-targeting bistratified cells during hippocampal network oscillations in vivo. *Nat. Neurosci.* *7*, 41–47.
- Köhler, C., and Eriksson, L.G. (1984). An immunohistochemical study of somatostatin and neurotensin positive neurons in the septal nuclei of the rat brain. *Anat. Embryol. (Berl)*. *170*, 1–10.

- Kohus, Z., Káli, S., Rovira-Esteban, L., Schlingloff, D., Papp, O., Freund, T.F., Hájos, N., and Gulyás, A.I. (2016). Properties and dynamics of inhibitory synaptic communication within the CA3 microcircuits of pyramidal cells and interneurons expressing parvalbumin or cholecystokinin. *J. Physiol.* *594*, 3745–3774.
- Lannfelt, L., Relkin, N.R., and Siemers, E.R. (2014). Amyloid- β -directed immunotherapy for Alzheimer's disease. *J. Intern. Med.* *275*, 284–295.
- Lee, S.-H., Földy, C., and Soltesz, I. (2010). Distinct endocannabinoid control of GABA release at perisomatic and dendritic synapses in the hippocampus. *J. Neurosci.* *30*, 7993–8000.
- Lendvai, B., and Vizi, E.S. (2008). Nonsynaptic chemical transmission through nicotinic acetylcholine receptors. *Physiol. Rev.* *88*, 333–349.
- Letzkus, J.J., Wolff, S.B.E., and Lüthi, A. (2015). Disinhibition, a Circuit Mechanism for Associative Learning and Memory. *Neuron* *88*, 264–276.
- Limon, A., Reyes-Ruiz, J.M., and Miledi, R. (2012). Loss of functional GABA_A receptors in the Alzheimer diseased brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 10071–10076.
- Ling, Y., Morgan, K., and Kalsheker, N. (2003). Amyloid precursor protein (APP) and the biology of proteolytic processing: Relevance to Alzheimer's disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *35*, 1505–1535.
- Lleo, A.; Greenberg, S.M.; Growdon, J.H. (2006). Current pharmacotherapies for Alzheimer's disease. *Annu. Rev. Med.* *57*, 513–533.
- Loreth, D., Ozmen, L., Revel, F.G., Knoflach, F., Wetzelschellner, P., Frotscher, M., Metzger, F., and Kretz, O. (2012). Selective degeneration of septal and hippocampal GABAergic neurons in a mouse model of amyloidosis and tauopathy. *Neurobiol. Dis.* *47*, 1–12.
- Maccaferri, G. (2005). Stratum oriens horizontal interneurone diversity and hippocampal network dynamics. *J. Physiol.* *562*, 73–80.
- Maccaferri, G., and McBain, C.J. (1995). Passive propagation of LTD to stratum oriens-alveus inhibitory neurons modulates the temporoammonic input to the hippocampal CA1 region. *Neuron* *15*, 137–145.
- Maccaferri, G., David, J., Roberts, B., Szucs, P., Cottingham, C.A., and Somogyi, P. (2000). Cell surface domain specific postsynaptic currents evoked by identified

- GABAergic neurones in rat hippocampus in vitro. *J. Physiol.* 524, 91–116.
- Manns, I.D., Mainville, L., and Jones, B.E. (2001). Evidence for glutamate, in addition to acetylcholine and GABA, neurotransmitter synthesis in basal forebrain neurons projecting to the entorhinal cortex. *Neuroscience* 107, 249–263.
- Manseau, F., Goutagny, R., Danik, M., and Williams, S. (2008). The hippocamposeptal pathway generates rhythmic firing of GABAergic neurons in the medial septum and diagonal bands: an investigation using a complete septohippocampal preparation in vitro. *J. Neurosci.* 28, 4096–4107.
- Mattis, J., Brill, J., Evans, S., Lerner, T.N., Davidson, T.J., Hyun, M., Ramakrishnan, C., Deisseroth, K., and Huguenard, J.R. (2014). Frequency-Dependent, Cell Type-Divergent Signaling in the Hippocamposeptal Projection. *J. Neurosci.* 34, 11769–11780.
- McBain, C.J., DiChiara, T.J., and Kauer, J.A. (1994). Activation of metabotropic glutamate receptors differentially affects two classes of hippocampal interneurons and potentiates excitatory synaptic transmission. *J. Neurosci.* 14, 4433–4445.
- Medawar, E., Benway, T.A., Liu, W., Hanan, T.A., Haslehurst, P., James, O.T., Yap, K., Muessig, L., Moroni, F., Nahaboo Solim, M.A., (2019). Effects of rising amyloid β levels on hippocampal synaptic transmission, microglial response and cognition in APP Swe /PSEN1 M146V transgenic mice. *EBioMedicine* 39, 422–435.
- Melzer, S., Michael, M., Caputi, A., Eliava, M., Fuchs, E.C., Whittington, M.A., and Monyer, H. (2012). Long-range-projecting gabaergic neurons modulate inhibition in hippocampus and entorhinal cortex. *Science* (80-.). 335, 1506–1510.
- Mesulam, M.M., Mufson, E.J., Wainer, B.H., and Levey, A.I. (1983). Central cholinergic pathways in the rat: An overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6). *Neuroscience* 10, 1185–1201.
- Mielke, M.M., Vemuri, P., and Rocca, W.A. (2014). Clinical epidemiology of Alzheimer’s disease: Assessing sex and gender differences. *Clin. Epidemiol.* 6, 37–48.
- Mikkonen, M., Alafuzoff, I., Tapiola, T., Soininen, H., and Miettinen, R. (1999). Subfield- and layer-specific changes in parvalbumin, calretinin and calbindin-D28k immunoreactivity in the entorhinal cortex in Alzheimer’s disease.

Neuroscience 92, 515–532.

- Miles, R., Tóth, K., Gulyás, A.I., Hájos, N., and Freund, T.F. (1996). Differences between somatic and dendritic inhibition in the hippocampus. *Neuron* 16, 815–823.
- Miranda, M.I., and Bermúdez-Rattoni, F. (1999). Reversible inactivation of the nucleus basalis magnocellularis induces disruption of cortical acetylcholine release and acquisition, but not retrieval, of aversive memories. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 6478–6482.
- Morawski, M., Brückner, M.K., Riederer, P., Brückner, G., and Arendt, T. (2004). Perineuronal nets potentially protect against oxidative stress. *Exp. Neurol.* 188, 309–315.
- Morrison, J.H., Rogers, J., Scherr, S., Benoit, R., and Bloom, F.E. (1985). © 198© 1985 Nature Publishing Group. (1985).5 Nature Publishing Group. *Nature* 314, 90–92.
- Mullane, K., and Williams, M. (2013). Alzheimer’s therapeutics: Continued clinical failures question the validity of the amyloid hypothesis - But what lies beyond? *Biochem. Pharmacol.* 85, 289–305.
- Muñoz, W., and Rudy, B. (2014). Spatiotemporal specificity in cholinergic control of neocortical function. *Curr. Opin. Neurobiol.* 26, 149–160.
- Niederst, E.D., Reyna, S.M., and Goldstein, L.S.B. (2015). Axonal amyloid precursor protein and its fragments undergo somatodendritic endocytosis and processing. *Mol. Biol. Cell* 26, 205–217.
- Nilsson, L., Nordberg, A., Hardy, J., Wester, P., and Winblad, B. (1986). Physostigmine restores 3H-acetylcholine efflux from Alzheimer brain slices to normal level. *J. Neural Transm.* 67, 275–285.
- Nilsson, P., Saito, T., and Saido, T.C. (2014). New mouse model of Alzheimer’s. *ACS Chem. Neurosci.* 5, 499–502.
- Nordberg, A. (1992). Biological markers and the cholinergic hypothesis in Alzheimer’s disease. *Acta Neurol. Scand.* 85, 54–58.
- Nyakas, C., Granic, I., Halmy, L.G., Banerjee, P., and Luiten, P.G.M. (2011). The basal forebrain cholinergic system in aging and dementia. Rescuing cholinergic neurons from neurotoxic amyloid- β 42 with memantine. *Behav. Brain Res.* 221, 594–603.
- Nyakas C, Luiten PG, Spencer DG, T.J. (1987). 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.* 533–545.
- Palop, J.J., and Mucke, L. (2016). Network abnormalities and interneuron dysfunction in Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 17, 777–792.
- Palop, J.J., Chin, J., Roberson, E.D., Wang, J., Thwin, M.T., Bien-ly, N., Yoo, J., Ho, K.O., Yu, G., Kreitzer, A., (2007). Article Aberrant Excitatory Neuronal Activity and Compensatory Remodeling of Inhibitory Hippocampal Circuits in Mouse Models of Alzheimer ' s Disease. 697–711.
- Papp, E Hájos, N., Acsady, L., and Freund, T.F. (1999). Medial septal and median raphe innervation of vasoactive intestinal polypeptide-containing interneurons in the hippocampus. *90*, 369–382.
- Paxinos, G and Franklin, K.B.J. (2012). Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates.
- Pelkey, K.A., Chittajallu, R., Craig, M.T., Tricoire, L., Wester, J.C., and McBain, C.J. (2017). Hippocampal GABAergic Inhibitory Interneurons. *Physiol. Rev.* 97, 1619–1747.
- Peters, A., and Folger, C. (2013). A website entitled “The Fine Structure of the Aging Brain.” *J Comp Neurol.* 521, 1203–1206.
- Polanco, J.C., Li, C., Bodea, L.G., Martinez-Marmol, R., Meunier, F.A., and Götz, J. (2018). Amyloid- β and tau complexity - Towards improved biomarkers and targeted therapies. *Nat. Rev. Neurol.* 14, 22–40.
- Popovi, M., Caballero-Bleda, M., Kadish, I., and Groen, T. van (2008). Ubfield And Layer-Specific Depletion In Calbindin- D28k, Calretinin And Parvalbumin Immunoreactivity In The Dentate Gyrus Of App/Ps1 Transgenic Mice. *Neuroscience* 155, 182–191.
- Poulopoulos, A., Aramuni, G., Meyer, G., Soykan, T., Hoon, M., Papadopoulos, T., Zhang, M., Paarmann, I., Fuchs, C., Harvey, K., (2009). Neuroligin 2 Drives Postsynaptic Assembly at Perisomatic Inhibitory Synapses through Gephyrin and Collybistin. *Neuron* 63, 628–642.
- Prox, J., Bernreuther, C., Altmepfen, H., Grende, J., Glatze, M., D'Hooge, R., Stroobants, S., Ahmed, T., Balschun, D., Willem, M., (2013). Postnatal disruption of the disintegrin/metalloproteinase ADAM10 in brain causes epileptic seizures,

- learning deficits, altered spine morphology, and defective synaptic functions. *J. Neurosci.* *33*, 12915–12928.
- Ramirez, B.G. (2005). Prevention of Alzheimer's Disease Pathology by Cannabinoids: Neuroprotection Mediated by Blockade of Microglial Activation. *J. Neurosci.* *25*, 1904–1913.
- Ramos, B., Baglietto-Vargas, D., Rio, J.C. del, Moreno-Gonzalez, I., Santa-Maria, C., Jimenez, S., Caballero, C., Lopez-Tellez, J.F., Khan, Z.U., Ruano, D., (2006). Early neuropathology of somatostatin/NPY GABAergic cells in the hippocampus of a PS1 × APP transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* *27*, 1658–1672.
- Raymond T., Bartus; Reginald L. Dean; Bernard , Beer; Arnold S., L. (1982). The Cholinergic Hypothesis of Geriatric Memory Dysfunction. *Science* (80-.). *217*, 408–417.
- Reddy, P.H., and Flint, B. (2011). Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease. *Trends Mol Med* *14*, 45–53.
- Robinson, X.J., Fre, X., Ducharme, G., Vigneault, E., Mestikawy, S. El, and Williams, X.S. (2016). Optogenetic Activation of Septal Glutamatergic Neurons Drive Hippocampal Theta Rhythms. *36*, 3016–3023.
- Rylett, R.J., Ball, M.J., and Colhoun, E.H. (1983). Evidence for high affinity choline transport in synaptosomes prepared from hippocampus and neocortex of patients with Alzheimer's disease. *Brain Res.* *289*, 169–175.
- Saito, T., Iwata, N., Tsubuki, S., Takaki, Y., Takano, J., Huang, S.M., Suemoto, T., Higuchi, M., and Saido, T.C. (2005). Somatostatin regulates brain amyloid β peptide A β 42 through modulation of proteolytic degradation. *Nat. Med.* *11*, 434–439.
- Saito, T., Matsuba, Y., Yamazaki, N., Hashimoto, S., and Saido, T.C. (2016). Calpain activation in Alzheimer's model mice is an artifact of APP and presenilin overexpression. *J. Neurosci.* *36*, 9933–9936.
- Saiz-Sanchez, D., De la Rosa-Prieto, C., Ubeda-Banon, I., and Martinez-Marcos, A. (2015). Interneurons, tau and amyloid- β in the piriform cortex in Alzheimer's disease. *Brain Struct. Funct.* *220*, 2011–2025.

- Sanchez-Varo, R., Trujillo-Estrada, L., Sanchez-Mejias, E., Torres, M., Baglietto-Vargas, D., Moreno-Gonzalez, I., De Castro, V., Jimenez, S., Ruano, D., Vizuete, M. (2012). Abnormal accumulation of autophagic vesicles correlates with axonal and synaptic pathology in young Alzheimer's mice hippocampus. *Acta Neuropathol.* *123*, 53–70.
- Sarter, M., and Bruno, J.P. (1997). Cognitive functions of cortical acetylcholine: Toward a unifying hypothesis. *Brain Res. Rev.* *23*, 28–46.
- Sarter, M., Lustig, C., and Taylor, S.F. (2012). Neuropharmacology Cholinergic contributions to the cognitive symptoms of schizophrenia and the viability of cholinergic treatments. *Neuropharmacology* *62*, 1544–1553.
- Schindelin, J., Arganda-Carrera, I., Frise, E., Verena, K., Mark, L., Tobias, P., Stephan, P., Curtis, R., Stephan, S., Benjamin, S., (2009). Fiji - an Open platform for biological image analysis. *Nat. Methods* *9*, 241.
- Schliebs, R., and Arendt, T. (2006). The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease. *J. Neural Transm.* *113*, 1625–1644.
- Selkoe, D.J., and Hardy, J. (2016). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol. Med.* *8*, 595–608.
- Serrano-Pozo, A., Muzikansky, A., Gómez-Isla, T., Growdon, J.H., Betensky, R.A., Frosch, M.P., and Hyman, B.T. (2013). Differential relationships of reactive astrocytes and microglia to fibrillar amyloid deposits in Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *72*, 462–471.
- Sethi, M.K., and Zaia, J. (2017). Extracellular matrix proteomics in schizophrenia and Alzheimer's disease. *Anal. Bioanal. Chem.* *409*, 379–394.
- Sharma, K. (2019). Cholinesterase inhibitors as Alzheimer's therapeutics (Review). *Mol. Med. Rep.* *20*, 1479–1487.
- Silva Albuquerque, M., Mahar, I., Davoli, M.A., Chabot, J.G., Mechawar, N., Quirion, R., and Krantic, S. (2015). Regional and sub-regional differences in hippocampal GABAergic neuronal vulnerability in the TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease. *Front. Aging Neurosci.* *7*, 1–7.
- Silveira, D.C., Holmes, G.L., Schachter, S.C., Geula, C., and Schomer, D.L. (2000). Increased susceptibility to generalized seizures after immunolesions of the basal

- forebrain cholinergic neurons in rats. *Brain Res.* 878, 223–227.
- Sims, N.R., Bowen, D.M., Allen, S.J., Smith, C.C.T., Neary, D., Thomas, D.J., and Davison, A.N. (1983). Presynaptic Cholinergic Dysfunction in Patients with Dementia. *J. Neurochem.* 40, 503–509.
- Solarski, M., Wang, H., Wille, H., and Schmitt-Ulms, G. (2018). Somatostatin in Alzheimer's disease: A new Role for an Old Player. *Prion* 12, 1–8.
- Somogyi, P., and Klausberger, T. (2005). Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. *J. Physiol.* 562, 9–26.
- Somogyi, J., Baude, A., Omori, Y., Shimizu, H., El Mestikawy, S., Fukaya, M., Shigemoto, R., Watanabe, M., and Somogyi, P. (2004). GABAergic basket cells expressing cholecystinin contain vesicular glutamate transporter type 3 (VGLUT3) in their synaptic terminals in hippocampus and isocortex of the rat. *Eur. J. Neurosci.* 19, 552–569.
- Somogyi, P., Cowey, A., Kisvarday, Z.F., Freund, T.F., and Szentágothai, J. (1983). Retrograde transport of γ -amino[3H]butyric acid reveals specific interlaminar connections in the striate cortex of monkey. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80, 2385–2389.
- Sotty, F., Danik, M., Manseau, F., Laplante, F., Quirion, R., and Williams, S. (2003). Distinct electrophysiological properties of glutamatergic, cholinergic and GABAergic rat septohippocampal neurons: novel implications for hippocampal rhythmicity. *J. Physiol.* 551, 927–943.
- Stanley, E.M., Fadel, J.R., and Mott, D.D. (2012). Interneuron loss reduces dendritic inhibition and GABA release in hippocampus of aged rats. *Neurobiol. Aging* 33, 431.
- De Strooper, B., and Karran, E. (2016). The Cellular Phase of Alzheimer's Disease. *Cell* 164, 603–615.
- Sylvia E. Perez, Saleem Dar, Milos D. Ikonovic, Steven T. DeKosky, and E.J.M. (2007). Cholinergic Forebrain Degeneration in the APP^{swe}/PS1 Δ E9 Transgenic Mouse. *Neurobiol Dis.* 28, 3–15.
- Szőnyi, A., Zichó, K., Barth, A.M., Gönczi, R.T., Schlingloff, D., Török, B., Sipos, E., Major, A., Bardóczi, Z., Sos, K.E., (2019). Median raphe controls acquisition of negative experience in the mouse Median raphe controls acquisition of negative

- experience in the mouse. *Science* (80-.). 1–55.
- Takács, V.T., Freund, T.F., and Gulyás, A.I. (2008). Types and synaptic connections of hippocampal inhibitory neurons reciprocally connected with the medial septum. *Eur. J. Neurosci.* 28, 148–164.
- Takács, V.T., Freund, T.F., and Nyiri, G. (2013). Neuroligin 2 Is Expressed in Synapses Established by Cholinergic Cells in the Mouse Brain. *PLoS One* 8.
- Takács, V.T., Szőnyi, A., Freund, T.F., Nyiri, G., and Gulyás, A.I. (2015). Quantitative ultrastructural analysis of basket and axo-axonic cell terminals in the mouse hippocampus. *Brain Struct. Funct.* 220, 919–940.
- Takács, V.T., Cserép, C., Schlingloff, D., Pósfai, B., Szőnyi, A., Sos, K.E., Környei, Z., Dénes, Á., Gulyás, A.I., Freund, T.F., (2018). Co-transmission of acetylcholine and GABA regulates hippocampal states. *Nat. Commun.* 9.
- Takahashi, H., Brasnjevic, I., Rutten, B., Van Der Kolk, N., Perl, D.P., Bouras, C., Steinbusch, H.W.M., and Schmitz, C. (2010). Hippocampal interneuron loss in an APP/PS1 double mutant mouse and in Alzheimer’s disease. *Brain Struct. Funct.* 214, 145–160.
- Takami, M., Nagashima, Y., Sano, Y., Ishihara, S., Morishima-Kawashima, M., Funamoto, S., and Ihara, Y. (2009). γ -Secretase: Successive tripeptide and tetrapeptide release from the transmembrane domain of β -carboxyl terminal fragment. *J. Neurosci.* 29, 13042–13052.
- Tamás F. Freund, M.A. (1988). GABA-containing neurons in the septum control inhibitory interneurons in the hippocampus. *Nature* 336, 170–173.
- Testa, D., Prochiantz, A., and Di Nardo, A.A. (2019). Perineuronal nets in brain physiology and disease. *Semin. Cell Dev. Biol.* 89, 125–135.
- Tóth, K., and Freund, T.F. (1992). Calbindin D28k-containing nonpyramidal cells in the rat hippocampus: Their immunoreactivity for GABA and projection to the medial septum. *Neuroscience* 49, 793–805.
- Tukker, J.J., Fuentealba, P., Hartwich, K., Somogyi, P., and Klausberger, T. (2007). Cell Type-Specific Tuning of Hippocampal Interneuron Firing during Gamma Oscillations In Vivo. *J. Neurosci.* 27, 8184–8189.
- Del Turco, D., Paul, M.H., Schlaudraff, J., Hick, M., Endres, K., Müller, U.C., and Deller, T. (2016). Region-specific differences in amyloid precursor protein

- expression in the mouse hippocampus. *Front. Mol. Neurosci.* *9*, 1–12.
- Tyagarajan, S.K., and Fritschy, J.M. (2014). Gephyrin: A master regulator of neuronal function? *Nat. Rev. Neurosci.* *15*, 141–156.
- Ulrich, D., and Bettler, B. (2007). GABA(B) receptors: synaptic functions and mechanisms of diversity. *Curr. Opin. Neurobiol.* *17*, 298–303.
- Umbriaco, D., Garcia, S., Beaulieu, C., and Descarries, L. (1995). Relational Features of Acetylcholine , Noradrenaline , Serotonin and GABA Axon Terminals in the Stratum Radiatum of Adult Rat Hippocampus (CA1). *620*.
- Vandecasteele, M., Varga, V., Berényi, A., Papp, E., Barthó, P., and Venance, L. (2014). Optogenetic activation of septal cholinergic neurons suppresses sharp wave ripples and enhances theta oscillations in the hippocampus. *111*.
- Vassar, R. (2013). ADAM10 Prodomain Mutations Cause Late-Onset Alzheimer’s Disease: Not Just the Latest FAD. *Neuron* *80*, 250–253.
- Vassar, R., and Citron, M. (2000). A -Generating Enzymes : Recent Advances in □ - and -Secretase Research. *27*, 419–422.
- Vaz, M., and Silvestre, S. (2020). Alzheimer’s disease: Recent treatment strategies. *Eur. J. Pharmacol.* *887*.
- Velazquez, R., Ferreira, E., Knowles, S., Fux, C., Rodin, A., Winslow, W., and Oddo, S. (2019). Lifelong choline supplementation ameliorates Alzheimer’s disease pathology and associated cognitive deficits by attenuating microglia activation. *Aging Cell* *18*, 1–11.
- Velazquez, R., Winslow, W., and Mifflin, M.A. (2020). www.aging-us.com AGING 2020, Vol. 12, No. 3. *12*, 2026–2027.
- Verdaguer, E., Brox, S., Petrov, D., Olloquequi, J., Romero, R., de Lemos, M.L., Camins, A., and Auladell, C. (2015). Vulnerability of calbindin, calretinin and parvalbumin in a transgenic/knock-in APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer disease together with disruption of hippocampal neurogenesis. *Exp. Gerontol.* *69*, 176–188.
- Vertes, R.P., and Kocsis, B. (1997). Brainstem-diencephalo-septohippocampal systems controlling the theta rhythm of the hippocampus. *Neuroscience* *81*, 893–926.
- Vezzani, A., and Granata, T. (2005). *Brain_Inflammation_Epilepsy.* *46*, 1–20.
- Vida, I., Halasy, K., Szinyei, C., Somogyi, P., and Buhl, E.H. (1998). Unitary IPSPs

evoked by interneurons at the stratum radiatum — stratum lacunosum-moleculare border in the CA1. 755–773.

- Villemagne, V.L., Burnham, S., Bourgeat, P., Brown, B., Ellis, K.A., Salvado, O., Szoëke, C., Macaulay, S.L., Martins, R., Maruff, P., (2013). Amyloid β deposition, neurodegeneration, and cognitive decline in sporadic Alzheimer's disease: A prospective cohort study. *Lancet Neurol.* 12, 357–367.
- Vossel, K.A. (2017). relevance. 16, 311–322.
- Wenk, G.L., Mcgann-Gramling, K., and Hauss-Wegrzyniak, B. (2004). The presence of the APP^{swE} mutation in mice does not increase the vulnerability of cholinergic basal forebrain neurons to neuroinflammation. *Neuroscience* 125, 769–776.
- Whitehouse, P.J., Martino, A.M., Marcus, K.A., Zweig, R.M., Singer, H.S., Price, D.L., and Kellar, K.J. (1988). Reductions in Acetylcholine and Nicotine Binding in Several Degenerative Diseases. *Arch. Neurol.* 45, 722–724.
- Wilcock, G.K., Esiri, M.M., Bowen, D.M., and Smith, C.C.T. (1982). ALZHEIMER ' S DISEASE Correlation of Cortical Choline Acetyltransferase Activity with the Severity of Dementia and Histological Abnormalities We have examined the choline acetyltransferase [CAT] activity in autopsy samples of frontal and temporal lobe c. *J. Neurol. Sci.* 57, 407–417.
- Williams, G.S.B., Boyman, L., Chikando, A.C., Khairallah, R.J., and Lederer, W.J. (2013). Mitochondrial calcium uptake. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 10479–10486.
- Wittner, L., and Maglóczy, Z. (2017). Synaptic Reorganization of the Perisomatic Inhibitory Network in Hippocampi of Temporal Lobe Epileptic Patients. *Biomed Res. Int.* 2017.
- Xu, M., Chung, S., Zhang, S., Zhong, P., Ma, C., Chang, W.C., Weissbourd, B., Sakai, N., Luo, L., Nishino, S. (2015). Basal forebrain circuit for sleep-wake control. *Nat. Neurosci.* 18, 1641–1647.
- Yao, Z.X., and Papadopoulos, V. (2002). Function of beta-amyloid in cholesterol transport: a lead to neurotoxicity. *FASEB J.* 16, 1677–1679.
- Yuan, M., Meyer, T., Benkowitz, C., Savanthrapadian, S., Ansel-Bollepalli, L., Foggetti, A., Wulff, P., Alcamì, P., Elgueta, C., and Bartos, M. (2017). Somatostatin-positive interneurons in the dentate gyrus of mice provide local- and long-range septal synaptic inhibition. *Elife* 6, 1–25.

- Zhang, H., Lin, S., and Nicoletti, M.A.L. (2010). Spatiotemporal Coupling between Hippocampal Acetylcholine Release and Theta Oscillations In Vivo. *30*, 13431–13440.
- Zoli, M., Jansson, A., Syková, E., Agnati, L.F., and Fuxe, K. (1999). Volume transmission in the CNS and its relevance for neuropsychopharmacology. *Trends Pharmacol. Sci.* *20*, 142–150.
- Zotova, E., Bharambe, V., Cheaveau, M., Morgan, W., Holmes, C., Harris, S., Neal, J.W., Love, S., Nicoll, J.A.R., and Boche, D. (2013). Inflammatory components in human Alzheimer's disease and after active amyloid- β immunization. *Brain* *136*, 2677–2696.

XI. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

I. Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények:

Sos, KE; Mayer, MI; Takács, VT, Major, A; Bardóczi, Zs.; Beres BM; Szeles, T; Saito, T; Saido, TC; Mody, I; Freund, TF; Nyiri, G

Amyloid β induces interneuron-specific changes in the hippocampus of APPNL-F mice

PLOS One 15 : 5 Paper: e0233700 , 28 p. (2020)

Folyóiratcikk/Szaccikk (Folyóiratcikk)/Tudományos

IF: 3.240

Takacs, VT ; Cserep, C ; Schlingloff, D ; Posfai, B ; Szonyi, A ; **Sos, KE** ; Kornyei, Z ; Denes, A; Gulyas, AI ; Freund, TF ; Nyiri G

Co-transmission of acetylcholine and GABA regulates hippocampal states

NATURE COMMUNICATIONS 9 : 1 Paper: 2848 , 15 p. (2018)

Folyóiratcikk/Szaccikk (Folyóiratcikk)/Tudományos

IF: 11.878

II. Egyéb — nem az értekezés témájában megjelent — eredeti közlemények:

Sos KE, Mayer MI, Cserep C, Takacs FS, Szonyi A, Freund TF, Nyiri G

Cellular architecture and transmitter phenotypes of neurons of the mouse median raphe region

BRAIN STRUCTURE & FUNCTION 222: (1) pp. 287-299. (2017)

Folyóiratcikk/Szaccikk (Folyóiratcikk)/Tudományos

IF: 4.231

Szönyi, A ; Zichó, K ; Barth, AM ; Gönczi, RT ;Schlingloff, D ; Török, B ; Sipos, E ; Major, A ; Bardóczi, Zs ; **Sos, KE;** Gulyás, AI; Varga, V; Zelena, D; Freund, TF;

Nyiri, G

Median raphe controls acquisition of negative experience in the mouse

SCIENCE 366 : 6469 Paper: eaay8746 , 12 p. (2019)

IF: 41.846

Szonyi, A ; **Sos, KE** ; Nyilas, R ; Schlingloff, D ; Domonkos, A ; Takacs, VT. ; Posfai, B; Hegedus, P ; Priestley, JB. ; Gundlach, AL. ; Gulyás AI; Varga V; Losonczy A; Freund TF; Nyiri G

Brainstem nucleus incertus controls contextual memory formation

SCIENCE 364 : 6442 Paper: eaaw0445 , 13 p. (2019)

Folyóiratcikk/Szakcikk (Folyóiratcikk)/Tudományos

IF: 41.846

Markovics, A ; Toth, KF ; **Sos, KE** ; Magi, J ; Gyongyosi, A ; Benyo, Z ; Zouboulis, CC. ; Biro, T; Olah, A

Nicotinic acid suppresses sebaceous lipogenesis of human sebocytes via activating hydroxycarboxylic acid receptor 2 (HCA(2))

JOURNAL OF CELLULAR AND MOLECULAR MEDICINE 9 : 23 pp. 6203-6214.

, 12 p. (2019)

IF: 4.486

XII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet szeretnék mondani témavezetőmnek, Dr. Nyiri Gábornak, és korábbi csoportvezetőmnek, Dr. Freund Tamásnak, akik megmutatták nekem az idegtudomány szépségét, lehetőséget biztosítottak a PhD dolgozatom elkészítéséhez és számos remek projektben való részvételhez.

Munkatársaim közül szeretném kiemelni Schlingloff Dániel és Mayer Márton támogatását, akik az elmúlt években a legtöbb segítséget nyújtották nekem és akikre inkább barátaimként gondolok, mint csupán munkatársaimra.

Szeretném megköszönni az Agykéreg Kutatócsoport, a Hálózat-Idegéltan Kutatócsoport tagjainak, és a Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet munkatársainak azt, hogy az általuk megteremtett baráti légkörben dolgozhatok.

Nem utolsósorban mondok köszönetet családom tagjainak és páromnak, Róth Nándornak, akik mindannyian végig biztatással fordultak felém. Szeretném kiemelni gyerekkori barátnőm, Seres Rita támogatását, aki még a legnehezebb időkben is tudta, hogy sikerülni fog.

A dolgozatot Édesanyám és apai Nagymamám emlékének ajánlom.

A kutatás a EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009 azonosítójú projekt-támogatás keretében zajlott.