Hippokampális gátló kapcsolatok amiloidózis során és egészséges kolinerg rostokban

Doktori tézisek

Sós Katalin Eszter

Semmelweis Egyetem
Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola

Témavezető: Dr. Nyiri Gábor PhD, 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

1. Bevezetés

1.1 Az Alzheimer-kór vizsgálata

Az Alzheimer-kórt (AK) a demencia leggyakoribb formája, amely az egész világon súlyos közegészségügyi kérdés. Az Aβ 36-43 aminosavból álló peptideket jelöl, amelyek az amiloid plakkok fő alkotóelemei. Az Aβ fehérje extracelluláris lerakódásai, mint a szenilis plakkok, az intraneuronális neurofibrilláris kötegek és a nagymértékű neuronális veszteség az AK legfontosabb patológiás tulajdonságai. Az amiloid-béta jelenléte, önmagában nem jelenti teljes bizonysággal az AK meglétét, hiszen számos vizsgálat kimutatta, hogy az Aβ jelenléte önmagában nem mindig okoz AK-t. 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 kolinerg diszfunkción alapuló AK hipotézis a legrégebbi; amely megfigyelték, hogy a kolinerg idegsejtek degenerációja és az ezzel járó kolinerg neurotranszmisszió elvesztése az agykéregben és más területeken jelentősen hozzájárult a kognitív funkciók romlásához. Az AK jellemző kísérői a reaktív gliózis és a neuroinflammáció. Kísérleteinkben egy új KI törzset használtunk, az APPNL-F modellt, amely 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 sajátja, így a megfelelő sejttípusú és időbeli specifitással rendelkező sejtekben expresszálódik.

1.2 A hippokampális gátló interneuronok változása AK-ban

A hippokampuszban a lokális, GABAerg gátló interneuronok a teljes neuronális sejtpopuláció ~ 10–15% -át teszik ki; a piramissejtekhez viszonyított kapcsolatuk alapján periszomatikus régiót (parvalbumin (PV), illetve a kolecisztokinin pozitív kosársejtek, PV+axo-axonikus IN) és dendriteket célzó (szomatosztatin pozitív) csoportra oszthatjuk őket. AK-ral kapcsolatban, a korábbi irodalomban ellentmondásos változásokat figyeltek meg a különböző tipusú IN-ok számában és érzékenységében mind a hippokampuszban, mind pedig a MS-ban;

valamint emberben is. Kísérleteinkben egy új KI törzset használtunk, az APPNL-F modellt, amely kiküszöböli az APP túlzott mértékű expresszióját által okozott és a betegségre nem jellemző műtermékeket azáltal, hogy az állatokban kifejeződő APP promotere nem mesterséges, hanem az egér sajátja, így a megfelelő sejttípusú és időbeli specifitással rendelkező sejtekben expresszálódik. Ezen tulajdonságai miatt ideális modell a hippokampális IN-ok változásának vizsgálatára.

1.3 A kolinerg rendszer jelentősége az Alzheimer-kórban

A bazális előagyból származó kolinerg idegsejtek biztosítják a kolinerg beidegződés fő forrását az agykéregben és a hippokampuszban, és kulcsszerepet játszanak az emlékezésben és a figyelem működésében Számos tanulmány kimutatta, hogy a BF kolinerg sejtek, illetve azok projekciójának diszfunkciója vagy elvesztése az AK patogenezisének legkorábbi kóros eseményei közé tartozik. A kolinerg rendszer degenerációja az AK patológiájának tipikus jellemzője és ezeknek a betegeknek gyakran epilepsziás rohamaik vannak. Többek között ezek az eredmények vezettek a „kolinerg hipotézis” kialakulásához

2. Célkitűzések

Az AK vizsgálatára számos egérmodelt hoztak létre, ahol a fokozott amiloidózis nem specifikusan történt, 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. Ez teszi az APP^{NL-F} egereket a legreálisabb modellekké, az Aβ agyra gyakorolt hatásainak vizsgálatához. Az Aβ felgyülemlése, 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 Aβ felhalmozódása ?

1b) Milyen gyulladásos 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. Dolgozatomban 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 hippokampuszban található kolinerg rostokat egészséges állatokban is. Megvizsgáltuk, hogy a hippokampuszban található kolinerg terminálisok alkotnak-e szinapszisokat. 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 hippokampuszban?

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

3c) Van-e hatással az Aβ felhalmozódása a szepto-hippokampális rostokra?

3. Módszerek

3.1 Felhasznált kísérleti állatok és sztereotaxiás műtétek

A 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: APPNLF; APPNLF x BAC-PV-eGFP;APPNLF x Pvalb-IRES-Cre; C57BL/6J;ChAT-IRES-Cre ; vGAT-IRES- Cre/Gt(ROSA)26Sor_CAG/ZsGreen. A ChAT-Cre és az APP^{NLF} x Pvalb-IRES-Cre egereket a műtét kezdete előtt izoflurán (Forane, Abbvie) gőzével elbódítottuk, majd intraperitoneális altatókoktél 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 vagy AAV2/5-EF1a-DIO-ChR2(H134R)-eYFP-WPRE-hGH) vírust injektáltunk a MS területére. Az APP^{NLF} x Pvalb-IRES-Cre esetében a hippokampális PV IN szelektív jelöléséshez 2x60nl AAV2/5-EF1a-DIO-mCherry vírust injektáltunk egyoldali dorzál hippokampuszba: A szepto-hippokampális PV+ axonok szelektív jelöléséhez 30 nl AAV2/5-EF1a-DIO-eYFP vírust injektáltunk a MS-ba. A műtétek befejezése után az egerek 0.03-0.05 mg/ttkg meloxicam injekciót és 0.5-0.7 ml fiziológiás sóoldatot kaptak intraperitoneálisan, majd elkülönítve, ketrecekben épültek fel a perfúziókig.

3.2 Alkalmazott technikák felsorolás szintjén

Fluoreszcens immunhisztokémia és konfokális lézer-pásztázó mikroszkópia; Beágyazás előtti egyszeres és kétszeres immunhisztokémia; A beágyazás előtti és utáni immuncitokémia kombinációja; Az axon szegmensek 3D rekonstrukciója; Sejtsűrűség

becslése APP^{NLF} egerekben; 3D blokk-felszíni sorozatmetszet pásztázó elektronmikroszkópia, képalkotás és képelemzés

3.3 Alkalmazott statisztika

Az olyan adatcsoportok esetében, amelyek nem mutattak Gauss eloszlást, az adatok leírására a medián és a 25%-75% interkvartilis tartományt használtuk. A Gauss eloszlást mutató adatcsoportok 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

4. Eredmények

4.1 Az Aβ felhalmozódás hatása a hippokampuszban APP-NLF egerekben

Az AK-t postmortem, az amiloid plakkok jelenlétével diagnosztizálják a betegek agyában és évtizedek óta az amiloid plakkokat tekintik az AK egyik elsődleges okának Az APPNL-F egerek az endogén, természetes egér promóter által vezérelt, humán APP svéd és ibériai mutációit expresszálják, valamint az Aβ42 és Aβ40 izoformákat olyan arányban fejezik ki, amely jellemző az emberi AK esetében. Ez teszi az APPNL-F egereket ideális modellekké az Aβ agyra gyakorolt hatásainak vizsgálatához.
Emberekben, az Aβ lerakódások glia aktiválódást, disztrófiás axonális folyamatokat és elváltozásokat okoznak a neurotranszmitter rendszerekben ami az AK lassú kifejlődéséhez. A mikrogliák úgy tűnik, hogy hatékonyan képesek megakadályozni az Aβ plakkok terjedését APPNL-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 Ez valószínűleg akadályozta a mitokondriális mozgást, funkciót, és ami még fontosabb, a mitokondriális kalcium pufferolást, amely legalább lokálisan megőrizhetné az axonális transzportot. Ezen változások közül többet megfigyeltek az AK-ban szenvedő emberekben is. A legtöbb neurontípuson létrejött DN az APPNL-F egerekben, kolinerg, glutamáterg, dopaminerg, SOM+ és CB1R+ GABAerg disztrófiás boutonokat is megfigyeltünk.
Megállapítottuk, hogy a plakkok körül gazdagon megjelennek egészségesnek látszó PV-terminálisok, és PV-pozitív DN-ket is nagyon ritkán találtunk.

4.2 Az Aβ felhalmozódás hatása a hippokampuszban található interneuronokra

Megvizsgáltuk a hippokampusz négy különböző IN populációjának szinaptikus erősségét. Mivel a szinaptikus erősség és a terület szorosan korrelál 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 szinapszisainak mérete nem változott.. A PV IN sűrűsége nem változott, és szinapszisaik is pozitív maradtak a GABAA receptor alegységek tekintetében. Leírtuk azt is, hogy a PV-idegsejtek körüli perineuronális hálók épsége nem befolyásolódott a 18 hónapos APPNL-F egerekben.
Ugyanakkor a kizárólag AIS-eket beidegző, PV+ axo-axonikus sejtek által létrehozott szinapszisok mintegy 35%-kal, szignifikánsan nagyobbak voltak az APPNL-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-ket még viszonylag idős APPNL-F egerekben is. Ezen kívül a PV+ axo-axonikus sejtek hatékonyan ellensúlyozhatják az APPNL-F egerek magasabb piramissejt-aktivitását.

4.3 A bazális előagy kolinerg szinapszisainak vizsgálata a hippokampuszban

Az korábbról már ismert volt, hogy a kolinerg terminálisok egy része létesít szinapszist. A hippokampuszban a kolinerg rostokon a szinapszisokat NL2 jelöléssel azonosítottuk és, 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. Elsőként a gephyrint vizsgáltuk, mert az kapcsolatban van mind a GABAA receptorokkal, mind pedig a NL2-vel. Megállapítottuk, hogy a hippokampális kolinerg rostok szinapszisainak legalább 81% -a tartalmaz gephyrint. Ezenkívül azt találtuk, hogy ezen szinapszisoknak legalább a 80%-ánál GABAA receptor □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 hippokampuszban lévő, szeptális kolinerg terminálisok expresszálták a glutamát dekarboxiláz 65 (GAD65), ezen túlmenően a terminálisok legalább 83%-a vGAT+ volt. Végül kimutattuk, hogy a kolinerg terminálisok tartalmaznak GABA-t.
Mivel a kolinerg rendszer sérülékenysége jól ismert AK esetén, megvizsgáltuk a hippokampuszban, amely nem különböztött 22 hónapos VT és APPNL-F egerekben. A tüskéket vagy dendriteket beidegező GABAA receptor γ2 alegységet tartalmazó vAChT-tal jelölt kolinerg rostokban nem találtunk szignifikáns változást a boutonok receptoralegység tartalmában..

5. Következtetések

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 sejttípussal ellentétben, azonban a PV IN-ok csak alkalmanként és enyhén voltak disztrófiásak az Aβ plakkok körül, és az axon kezdeti szegmenst célzó PV+ IN-ok szinapszisai 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.

6. A szerző publikációs listája

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 (2020)
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)
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)
IF: 4.231

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 pp. 752-+. , 52 p. (2019)
IF: 41.037

Szőnyi, 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 (2019)
IF: 41.037

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: 4.658