

Szegedi Tudományegyetem
Szent-Györgyi Albert Orvosi Kar
Elméletiorvostudományok Doktori Iskola

**Az Alzheimer-kór patológiáját jellemző neuroinflammáció és
károsodott neurogenesis vizsgálata, gyógyítási lehetőségeinek
feltérképezése APP/PS1 transzgén egérmodellben**

PhD Tézis

Szilágyi-Szögi Titanilla Zita

Témavezető:

Dr. Fülöp Livia

Szeged

2023

A tézis témájához kapcsolódó publikációk

I. **Titanilla Szögi**, Ildikó Schuster, Emőke Borbély, Andrea Gyebrovski, Zsolt Bozsó, János Gera, Róbert Rajkó, Miklós Sántha, Botond Penke and Lívía Fülöp

Effects of the Pentapeptide P33 on Memory and Synaptic Plasticity in APP/PS1 Transgenic Mice: A Novel Mechanism Presenting the Protein Fe65 as a Target
INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES, 2019 Jun 22;
20(12):3050. DOI: 10.3390/ijms20123050; **IF: 4.556**

II. **Titanilla Szögi**^a, Emőke Borbély^a, Ildikó Schuster, Zsolt Bozsó, Miklós Sántha, Melinda E. Tóth, Botond Penke and Lívía Fülöp,

^a Egyenlő szerzői hozzájárulás

Examination of Longitudinal Alterations in Alzheimer's Disease-Related Neurogenesis in an APP/PS1 Transgenic Mouse Model, and the Effects of P33, a Putative Neuroprotective Agent Thereon

INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES, 2022 Sep 8;
23(18):10364. DOI: 10.3390/ijms231810364; **IF: 6.20**

A tézis témájához kapcsolódó konferencia megjelenések

I. **Titanilla Szögi**, Emőke Borbély, Dóra Tüdős, Ildikó Schuster, Botond Penke and Lívía Fülöp

The Effects of the Neuroprotective Pentapeptide p33 on the Neurogenesis in APP/PS1 Mice

NEURODEGENERATIVE DISEASES, (2017) 17 (Suppl. 1): 1–1890. DOI: 10.1159/000464378

II. **Titanilla Szögi**, Emőke Borbély, Dóra Tüdős, Botond Penke and Lívía Fülöp

Longitudinal Examination of the Neurogenesis in Transgenic Alzheimer's Disease Mice Model

NEURODEGENERATIVE DISEASES, (2017) 17 (Suppl. 1): 1–1890. DOI: 10.1159/000464378

A tézis témájához nem kapcsolódó publikációk

I. Emőke Borbély, Viktória Varga, **Titanilla Szögi**, Ildikó Schuster, Zsolt Bozsó, Botond Penke, Lívía Fülöp

Impact of Two Neuronal Sigma-1 Receptor Modulators, PRE084 and DMT, on Neurogenesis and Neuroinflammation in an A β 1–42- Injected, Wild-Type Mouse Model of AD

INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES, 2022 Feb 24; 23 (5): 2514.
DOI: 10.3390/ijms23052514.; **IF: 6.208**

II. Brigitta Dukay, Fruzsina R Walter, Judit P Vigh, Beáta Barabási, Petra Hajdu, Tamás Balassa, Ede Migh, András Kincses, Zsófia Hoyk, **Titanilla Szögi**, Emőke Borbély, Bálint

Csoboz, Péter Horváth, Livia Fülöp, Botond Penke, László Vígh, Mária A Deli, Miklós Sántha, Melinda E Tóth

Neuroinflammatory processes are augmented in mice overexpressing human heat-shock protein B1 following ethanol-induced brain injury

JOURNAL OF NEUROINFLAMMATION, 2021 Jan 10;18(1):22. DOI: 10.1186/s12974-020-02070-2; **IF:9.587**

III. Ibolya Török, György Seprényi, Erzsébet Pór, Emőke Borbély, **Titanilla Szögi**, Endre Dobó

Post-diaminobenzidine Treatments for Double Stainings: Extension of Sulfide-Silver-Gold Intensification for Light and Fluorescent Microscopy

JOURNAL OF HISTOCHEMISTRY & CYTOCHEMISTRY, 2020 Aug; 68(8):571-582. DOI: 10.1369/0022155420942213; **IF: 2.479**

IV. Gábor Olajos, Anasztázia Hetényi, Edit Wéber, **Titanilla Szögi**, Livia Fülöp, Tamás A Martinek

Peripheral cyclic β -amino acids balance the stability and edge-protection of β -sandwiches

ORGANIC & BIOMOLECULAR CHEMISTRY, 2018 Aug 1;16(30):5492-5499. DOI: 10.1039/c8ob01322e. **IF: 3.49**

V. János Gera, Titanilla Szögi, Zsolt Bozsó, Livia Fülöp, Exequiel E Barrera, Ana M Rodriguez, Luciana Méndez, Carina M L Delpiccolo, Ernesto G Mata, Federica Cioffi, Kerensa Broersen, Gabor Paragi, Ricardo D Enriz

Searching for improved mimetic peptides inhibitors preventing conformational transition of amyloid- β_{42} monomer

BIOORGANIC CHEMISTRY, 2018 Dec; 81:211-221. DOI: 10.1016/j.bioorg.2018.08.018. **IF: 3.926**

VI. Török Ibolya, Seprényi György, Borbély Emőke, **Szögi Titanilla**, Hegyi Péter, Dobó Endre

Peroxidáz alapú technika alkalmazása nukleáris és citoplazmatikus antigének egymás melletti kimutatására fény- és fluoreszcens mikroszkópiában

A Magyar Anatómus Társaság XXI. kongresszusa, Debrecen, 2018. június 15-16.

VII. Gábor Olajos, Éva Bartus, Ildikó Schuster, Gergely Lautner, Róbert E Gyurcsányi, **Titanilla Szögi**, Livia Fülöp, Tamás A Martinek

Multivalent foldamer-based affinity assay for selective recognition of A β oligomers

ANALYTICA CHIMICA ACTA, 2017 Apr 1;960:131-137. DOI: 10.1016/j.aca.2017.01.013. **IF: 5.123**

VIII. Márta Kotormán, Mária L Simon, Attila Borics, Márton Richárd Szabó, Kitti Szabó, **Titanilla Szögi**, Livia Fülöp

Amyloid-like Fibril Formation by Trypsin in Aqueous Ethanol. Inhibition of Fibrillation by PEG

PROTEIN AND PEPTIDE LETTERS, 2015;22(12):1104-10. DOI:10.2174/0929866522666151002154324. **IF: 1.069**

IX. János Horváth, **Titanilla Szögi**, Géza Müller, Viktor Szegedi

The anxiolytic buspirone shifts coping strategy in novel environmental context of mice with different anxious phenotype

BEHAVIOURAL BRAIN RESEARCH, 2013 Aug 1;250:32-8. DOI: 10.1016/j.bbr.2013.04.014. IF: 3.391

Szcientometriai adatok:

Publikációk száma: 13 (2 elsőszerzős)

Kumulatív IF: 46.037

Független idézettség: 32

Hirsch index: 5

<https://m2.mtmt.hu/gui2/?type=authors&mode=browse&sel=10038001&view=pubTabl>

Bevezetés

Alzheimer kór

Az Alzheimer-kórt (AK), mely a demencia leggyakoribb típusa, időskorban kognitív hiányosságok és memóriazavarok jellemzik. A betegek nyelvi zavarokkal, magatartásbeli, fiziológiai tünetekkel, valamint memória deficittel küzdenek. Az AK legfőbb patológias jellemzői a β -amiloid ($A\beta$) peptidből álló amiloid plakkok, és a neurofibrilláris kötegek, amelyek abnormálisan hiperfoszforilált tau fehérjét tartalmaznak.

Az AK-t két altípusra oszthatjuk fel: familiáris AK (FAK) és sporadikus AK (SAK). A FAK-ot, mely 65 éves kor előtt jelenik meg, az amiloid- β prekursor protein (APP), a presenilin-1 (PS1), és a presenilin-2 (PS2) gének autoszómális, dominánsan öröklődő mutációja jellemzi. A nem-amiloidogén útvonalon az APP-t az α -szekretáz hasítja, ezáltal szolubilis APP ($sAPP\alpha$) és citoplazmikus terminális fragmens α ($CTF\alpha$ vagy C83) keletkezik. A γ -szekretáz a C83-at az APP intracelluláris doménre (AICD) és p3-ra hasítja. Az amiloidogén útvonalon, az APP-t a β -szekretáz hasítja, ennek eredményeként $sAPP\beta$ és $CTF\beta$ (C99) képződik. A C99-et a γ -szekretáz enzimatikusan emészt, ezáltal AICD és $A\beta$ keletkezik. A SAK-ra jellemző mutációk az amiloidogén útvonal irányába tolják el az APP szintézisét és feldolgozását.

Az $A\beta$ aggregátumok, plakkok jelenléte összefüggésbe hozható az AK-ban megjelenő neuroinflammációval, mivel az $A\beta$ bizonyítottan gyulladásozó válaszokat vált ki. A mikroglia és az asztrociták, amelyek a központi idegrendszer immunválaszáért felelős sejtípusai, fontos szerepet játszanak az AK patológiában. A neuroinflammációt az antiinflammatórikus és a proinflammatórikus folyamatok egyensúlyának felbomlása okozza. Az $A\beta$ képes a mikrogliaat aktiválni, ezáltal morfológiájuk és biológiai funkciójuk (például fagocitikus kapacitás, citokin expresszió) is megváltozik. Ezek a sejtek a plakkok körül csoportosulnak, hogy elősegítsék az $A\beta$ kiürülését, így lassítva az AK progresszióját. AK-ban az $A\beta$ az asztrocitákat is aktiválja. A reaktív asztrociták elősegíthetik a β - és a γ -szekretáz aktivitását, ezáltal növelve az $A\beta$ szintjét. A mikroglia és asztrociták kezdetben védő funkciót betöltő krónikus aktivációja idővel hátrányossá és károsná válik, mivel ez a gyulladásozó mediátorok állandó túlermeléséhez vezet, emiatt egy elhúzódó neuroinflammáció alakul ki. A mikroglia és asztrociták a korai fázisban történő aktiválódás miatt az AK biomarkereiként funkcionálhatnak, illetve mivel a gyulladásozó rendszer elemei, így potenciális célpontként szolgálhatnak a terápiás fejlesztésekben.

Felnőttkori hippokampális neurogenesis

Emlősökben (így az emberekben is) a neurogenesis az egész élet során észlelhető. Felnőttkorban neuronális sejtkepződés a laterális agykamra szubventrikuláris zónájában, illetve a hippokampuszban (HK), a gyrus dentatus (GD) szubgranuláris zónájában figyelhető meg. Ezek a neuronok kulcsfontosságúak a térbeli és epizódikus memória kialakításában, tanulási folyamatokban és más kognitív funkciók működése esetén is. Fiziológiásan a neurogenesis korfüggő hanyatlást mutat, de folyamatait befolyásolhatják neurodegeneratív betegségek, így az AK is. A felnőttkori hippokampális neurogenesis és az AK közötti kapcsolatot emberben, valamint az AK számos különböző egérmodelljében vizsgálják.

Az APP feldolgozás termékei bizonyítottan befolyásolják a neurogenézist. Az sAPP α pozitívan modulálja a neuronális progenitor sejtek proliferációját és túlélését. Ezzel szemben az AICD negatívan befolyásolja ezeket a folyamatokat. Az A β negatív hatást gyakorolt a felnőttkori neurogenesisre mind emberi sejtvonalakkal végzett kísérletekben, mind egérmodellekben, ami valószínűsíti az erős korrelációt az A β felgyülemelése és a károsodott neurogenesis között.

Az Fe65 szerepe az AK-ban

Az Fe65 család (Fe65, Fe65L1, and Fe65L2) kiemelt szerepet játszik az APP feldolgozásában, célhelyre jutásában, valamint a citoskeleton átrendeződésében, a sejtmozgásban, a nyúlványosodásban, a szinapszisok kialakulásában, a szinaptikus plaszticitás létrejöttében, illetve mindezek következtében a tanulási folyamatokban. Az Fe65 fehérje három doménnel rendelkezik, melyek a PTB1, a PTB2 és a WW domén. Az Fe65 képes a PTB2 doménjén keresztül az APP-hez kötődni, majd a Tip60-nal egy három tagú protein komplexet képezni. A komplex a nukleuszba transzlokálódik, ahol különböző gének (mint az APP) expresszióját szabályozza, ezáltal modulálva az APP-hez rendelhető molekuláris folyamatokat és az A β képződést. Az Fe65 aktivitásának sztereokémiai szabályozása prolinban gazdag szekvenciák segítségével a WW doménon keresztül új lehetőséget kínálhat az AK molekuláris folyamatainak kedvező irányban történő befolyásolására.

Egy másik WW domént tartalmazó fehérje, amely releváns az AK-ban, a Pin1 prolin-izomeráz. A Pin1 a pThr⁶⁶⁸-Pro motívumon keresztül képes az AICD-hez kötődni. Ez a neuronokban expresszálandó fehérje egészséges sejtekben neuroprotektív hatással bír, ezért fontos szerepet játszik a sejtciklus szabályozásában, emellett képes olyan proteinek működését szabályozni, melyek a neuronális funkcióért és túlélésért felelnek. Oxidatív

stressz vagy AK során a lecsökkent Pin1 szint hatására az APP feldolgozás eltolódik az amiloidogén útvonal felé.

Célkitűzések

Célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk egy kiterjedt időskálán az AK és a neurogenesis kapcsolatát. Kísérleteinkhez az APP_{Swe}/PS1_{dE9} (APP/PS1, Tg) transzgén FAK modellt használtuk, melynek egyedei túltermelik a kiméra egér/humán svéd mutációval (K595N/M596L) rendelkező APP-t (Mo/HuAPP695_{Swe}), és a 9. exon delécióját (PS1_{dE9}) hordozó humán PS1-et.

Ezekben az állatokban kívántuk feltérképezni a neurogenesis kapcsolatát a neuroinflammációval és az AK patológiával 1-12, és 18 hónapos korban, kontrollként C57BL/6J egereket használva. Ezen kívül detektáltuk a toxikus A β aggregátumok termelődésével összefüggő neuroinflammáció mértékét a transzgén egértörzsben, ezért megvizsgáltuk az APP képződés változásait az APP/PS1 állatokban.

Célunk volt egy specifikus PXP motívummal rendelkező molekula tervezése is, amely képes kötődni az Fe65 WW doménjéhez. A szelektivitás tesztelésére a kontroll kísérletekben a Pin1 WW doménjét is alkalmaztuk. Ezen kívül hosszú távú (6 hónapos) kezelésben teszteltük a P33 hatását a térbeli tanulásra, a memóriára és a hippocampális neurogenesisre. Feltételezésünk szerint a P33 megváltoztathatja a szinaptikus markerek szintjét és az amiloidogén útvonalon képződő termékek mennyiségét, valamint csökkentheti az A β által kiváltott neuroinflammációt az Fe65 működésének befolyásolása révén.

Anyagok és módszerek

A vegyületek szintézise és tisztítása

A P33 szintézisét MBHA x HCl gyantán, DCC/HOBt aktiválással végeztük standard Boc kémiával. Az acetyl-Fe65-WW, acetyl-Pin1-WW és a kontroll P33 szintézisét Rink Amid AM gyantán végeztük Fmoc kémiával HATU-val történő aktiválással. A peptideket RP-HPLC alkalmazásával analizáltuk és tisztítottuk.

ITC mérések

A P33 és az Fe65, illetve a Pin1 WW doménje közötti kötődési kölcsönhatásokat ITC mérésekkel határoztuk meg.

Állatok

A hosszú távú kísérlethez 1-12 és 18 hónapos hím és nőstény vad, illetve APP/PS1 állatokat használtunk. Tizenhárom, egyenként 5 egérből álló csoportot hoztunk létre (hím n=2; nőstény n=3). Az össejtek kimutatásához az állatokat intraperitoneálisan (i.p.) BrdU-val (100 mg/ttkg)

injektáltuk naponta egyszer, 6 egymást követő napon át. Az egereket az utolsó BrdU oltástól számítva két héttel később termináltuk.

A P33 kísérlethez a 3 hónapos vad és APP/PS1 állatokat négy csoportra osztottuk: vad-vehikulum (fiziológiás sóoldat) (hím n=4; nőstény n=6), vad-P33 (hím n=6; nőstény n=5), APP/PS1-vehikulum (hím n=3; nőstény n=5), és APP/PS1-P33 (hím n=6; nőstény n=2). Az egereket i.p. injektáltuk P33-mal 5 mg/ttkg dózisban heti öt napon keresztül, hat hónapon át.

MWM

A térbeli tanulást és memóriát MWM paradigmában elemeztük. A tesztek során meghatároztuk a platform eléréséig eltelt időt, az úszás sebességét, a megtett út hosszát, valamint a négy virtuális kvadránsban eltöltött idő százalékos arányát.

Immunreakciókon alapuló módszerek

A szolubilis A β koncentrációját enzim-kapcsolt immunszorpciós vizsgálattal (ELISA) határoztuk meg a gyártó utasításai szerint. Az APP, Fe65, pAPP, PSD95, SYN szintjét és a C99/C83 arányát western blot (WB) módszerrel mértük meg.

Az állatokat altatás után transzkardiálisan perfundáltuk. Az agyakat eltávolítottuk és utófixáltuk, majd szukróz oldatba tettük. Az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz 20 μ m vastagságú koronális metszeteket készítettünk, a szeleteket elsődleges, majd másodlagos antitestekkel inkubáltuk. A peroxidáz immunojelölést szobahőmérsékleten DAB oldattal (10 mM) végeztük. Kvantifikáláshoz a szeleteket metszetszkennerrel digitalizáltuk. Az állatokból származó összes agyszeletet elemeztük. Manuálisan berajzoltuk a vizsgált területeket (ROI) a cortex (KTX), GD és HK területén, meghatároztuk az őssejtek (BrdU+) és a neuroblasztok (DCX+) mennyiségét a szemcsesejt réteg és a hilus határán, melyet a GD/HK területre normalizálva adtunk meg (sejt/mm²). A neuronok (NeuN+), mikroglia (Iba1+) és asztrociták (GFAP+), és az A β plakkok denzitását egy kvantifikáló program segítségével határoztuk meg.

Statisztikai analízisek

A magatartásvizsgálatok eredményeit kevert ANOVA-val, majd Fisher-féle LSD *post hoc* teszttel analizáltuk. Mivel az adatok nem mutattak Gauss-eloszlást, így statisztikai analízisükre két új nem-paraméteres eljárást (permutációs teszt és bootstrap mintavételezés) dolgoztunk ki.

A P33 kísérletben a dendrittüske sűrűség adatait és az immunhisztokémiai eredményeket egy-utas ANOVA-val, majd Fisher-féle LSD *post hoc* teszttel analizáltuk. A hosszú távú kísérletben az immunhisztokémiai eredményeket páronként Student-féle t-próbával értékeltük ki. A WB és ELISA méréseket Kruskal-Wallis nem-paraméteres tesztekkel, majd Mann-

Whitney U-tesztel elemeztük a többszörös összehasonlításhoz. Az adatokat átlag \pm SEM-ként fejeztük ki. Az eltéréseket $p \leq 0.05$ esetén tekintettük szignifikánsnak.

Eredmények

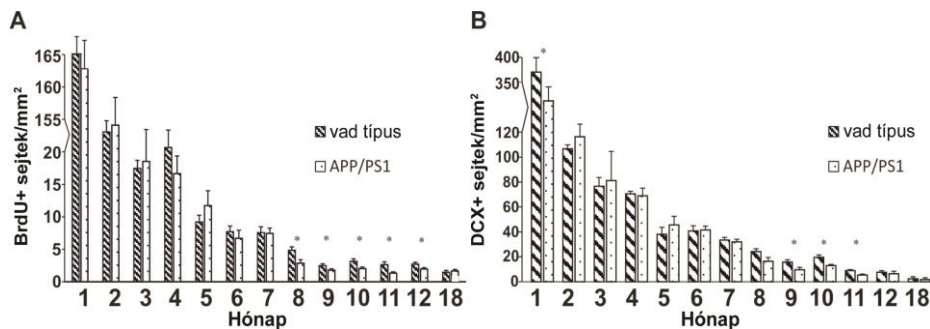
A neurogenesis, a neuroinflammáció és az AK patológia longitudinális vizsgálata

APP/PS1 transzgén egereken

A longitudinális vizsgálatban az APP_{Swe}/PS1_{dE9} transzgén és a C57BL/6J kontroll egereket vizsgáltuk szövettani módszerekkel 1-12, illetve 18 hónapos korban. Felmértük a hippocampális neurogenesis időbeli változásait, valamint ezek kapcsolatát a neuroinflammatorikus markerekkel és az A β patológiával.

A hippocampális neurogenesis károsodik az öregedés során APP/PS1 és vad típusú egerekben

Vad és Tg egerekben mind a BrdU+, mind a DCX+ sejtek sűrűségében csökkenő tendenciát figyeltünk meg a kor előrehaladtával. Az őssejtek és az éretlen neuronok mennyisége mindkét törzsből 1 hónapos korban magas volt, majd 2 hónapos kortól fokozatosan csökkent. Idősebb korban (8-12 hónap) szignifikáns különbségeket mértünk mindkét neurogenesis marker esetében (1A, B ábra). 18 hónapos korban nem volt szignifikáns eltérés a BrdU+ sejtek denzitásában a két törzs között. A DCX+ sejtek mennyisége kivételesen alacsony volt (<3 darab/mm²) a 12 és 18 hónapos állatokban, de ebben az életkorban a denzitás szignifikánsan nem különbözött a transzgén és vad csoportok között.



1. ábra: A BrdU (A) és DCX (B) festések kvantitatív eredményei a GD-ban.

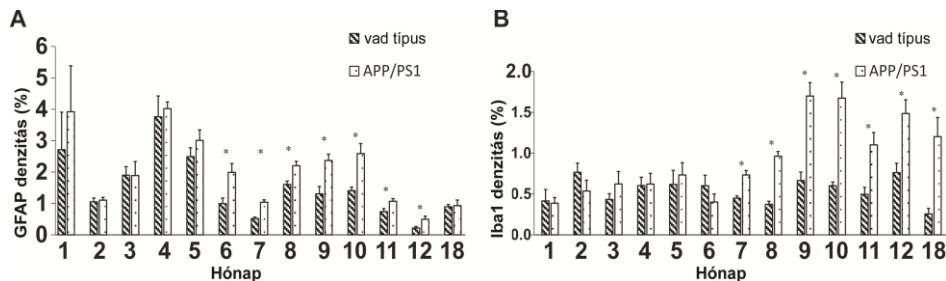
A neuronális nukleáris marker (NeuN) immunhisztokémiai analízise során nem tudtunk szignifikáns különbséget kimutatni a denzitásban a Tg és vad egerek között egyetlen életkorban sem.

A neuroinflammáció a kor előrehaladtával erősödik az APP/PS1 egerekben

Az első öt hónap során nem volt szignifikáns különbség a GFAP+ sejtek denzitásában a csoportok között. Ezzel szemben a 6-12 hónapos APP/PS1 egerekben szignifikánsan

magasabb GFAP+ sűrűséget figyelhettünk meg a kontroll csoporthoz képest. A 18 hónapos Tg és vad állatokban a GFAP+ sejtek sűrűsége közel hasonló volt (2A ábra).

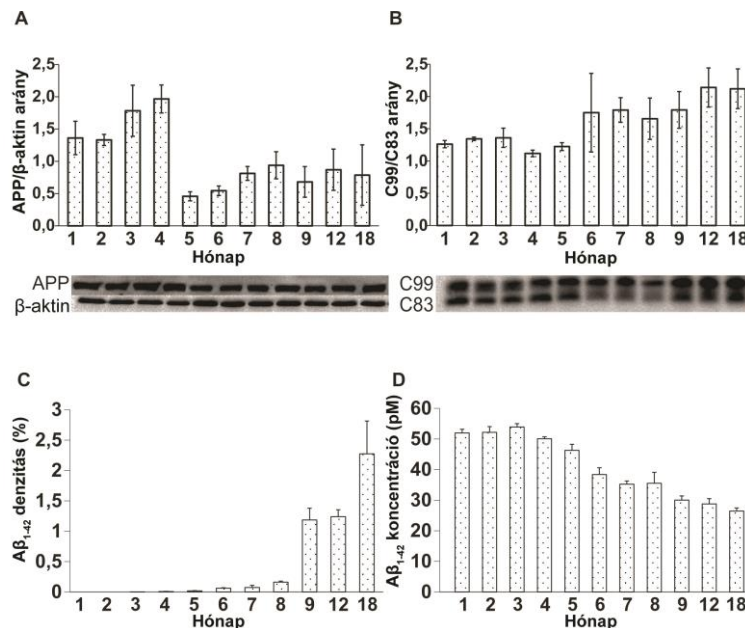
1-6 hónapos kor között nem volt szignifikáns különbség az Iba1+ sejtek denzitásában a Tg és vad csoportok között. Az Iba1+ sejtek denzitása 7-12 és 18 hónapos korban drasztikusan megnőtt a transzgén egerekben a kontrollokhöz képest (2B ábra).



2. ábra: GFAP (A) és Iba1 (B) festések kvantitatív eredményei a GD-ban.

Az APP feldolgozás útvonalainak korfüggő modulálása APP/PS1 egerekben

A neurogenesis és az AK kialakulása közötti összefüggés felmérésére megvizsgáltuk az APP feldolgozás útvonalainak változásait. WB vizsgálatokkal meghatároztuk az APP szintjét és a C99/C83 arányt, míg az oldható $A\beta_{1-42}$ frakció koncentrációját ELISA-val, az $A\beta$ plakkok sűrűségét pedig immunhisztokémiai módszerrel detektáltuk.



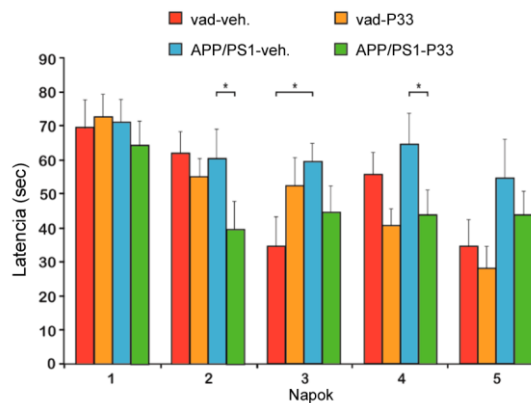
3. ábra: Az APP (A), a C99/C83 arány (B) mérése WB kísérletben, a plakk denzitás (C) detektálása immunhisztokémiai módszerrel, és a szolubilis $A\beta_{1-42}$ (D) mennyiségének meghatározása ELISA-val.

Az APP szint a Tg egerekben 1-4 hónapos korban megemelkedett, míg az 5-18 hónap között csökkent szintet mutatott (3A ábra).

Másrészt a Pin1-WW domén titrálása P33-mal 310 K-n sem vezetett jelentős kötődést bizonyító eredményre (4C ábra). Ezért feltételezhető, hogy a P33 szelektíven kötődik az Fe65-WW doménjéhez, ami alapján valószínűsíthető a P33/Fe65 kölcsönhatás elsődleges szerepe az APP feldolgozási folyamataiban.

A P33 hatása a térbeli memóriára MWM paradigmában

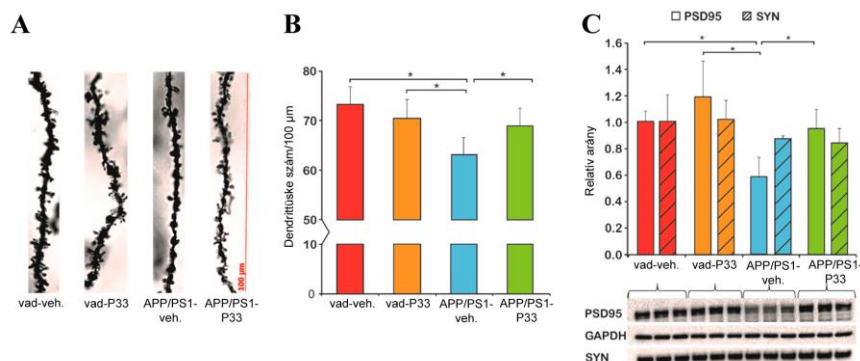
A P33 térbeli tanulásra és memóriára gyakorolt hatását egy 5 napos MWM tesztben vizsgáltuk. A statisztikai értékelés kevert ANOVA-val történt, amely szignifikáns különbségeket tárt fel az adatok között. A *post hoc* elemzés alapján az APP/PS1 vehikulummal injektált csoport szignifikánsan hosszabb idő alatt találta meg a platformot a többi csoporthoz képest, ami bizonyítja a tanulási képességek és a memória romlását a kezeletlen transzgen egerekben. A P33 kezelés viszont pozitív hatással bírt a tanulási képességekre (5. ábra).



5. ábra: A magatartás tesztek statisztikai elemzése. A latencia változása napokra lebontva az oszlopdiagramon.

A P33 kezelés hisztológiai és immunhisztológiai eredményei

Kilenc hónapos APP/PS1 vehikulummal kezelt állatokban a vad-vehikulum és a vad-P33-mal kezelt csoportokhoz képest szignifikáns különbséget detektáltunk a dendrittüske sűrűségben. A P33 injektálás hatására az APP/PS1 egerekben normalizálódott a csökkent dendrittüske sűrűség (APP/PS1-vehikulum vs. APP/PS1-P33, 6A, B ábra).

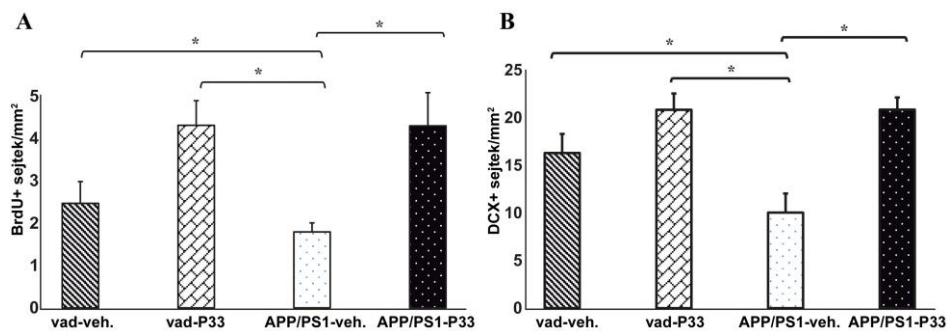


6. ábra: Dendrittüske sűrűség (A, B) mérése, PSD95 (C) és SYN (C) detektálása WB-tal.

A SYN szintjében nem találtunk szignifikáns különbséget a csoportok között. A PSD95 mennyisége szignifikánsan lecsökkent az APP/PS1 vehikulummal kezelt állatokban a másik három csoporthoz képest, ami a P33 kezeléssel helyreállítható volt, bizonyítva a P33 pozitív hatását a szinapszisokra (6C ábra).

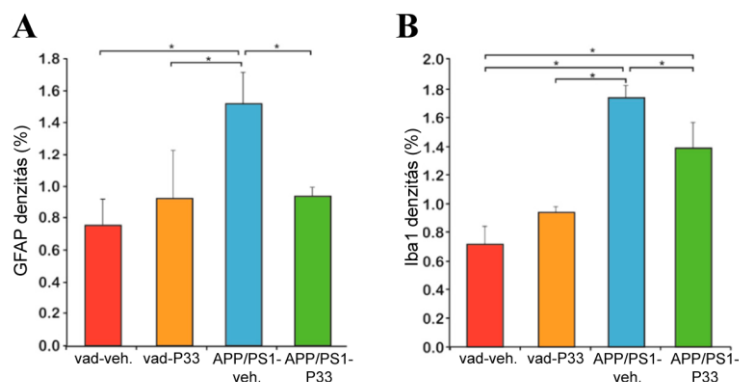
A 6 hónapos P33 kezelés hatását a neurogenesisre ismét annak két markerével, a BrdU-val és a DCX-szel jellemeztük. A BrdU+ sejtek denzitása szignifikánsan alacsonyabb volt a vehikulummal kezelt APP/PS1 állatokban összehasonlítva a vad-vehikulum és a vad-P33 csoportokkal. Ezzel szemben, a BrdU+ sejtek sűrűsége megnőtt az APP/PS1-P33 csoportban az APP/PS1 vehikulummal injektált egerekhez képest (7A ábra.)

A DCX+ sejtek denzitása az APP/PS1 vehikulummal kezelt állatokban szignifikánsan kisebb volt, mint a vad-vehikulum és a vad-P33 csoportokban. A P33-mal történő kezelés megemelte az éretlen neuronok sűrűségét az APP/PS1-P33 csoportban az APP/PS1 vehikulummal injektált állatokhoz képest (7B ábra).



7. ábra: BrdU (A) és a DCX (B) festések kvantitatív eredményei az állatok GD-ban.

A GFAP vizsgálata kimutatta, hogy a hiperreaktív asztrociták denzitása az egész HK és a KTX területén magasabb volt az APP/PS1-vehikulummal kezelt állatokban, mint a másik három csoportban (8A ábra). Az Iba1+ denzitás szignifikánsan magasabb volt az APP/PS1-vehikulummal injektált egerekben, mint a többi csoportban (8B ábra).



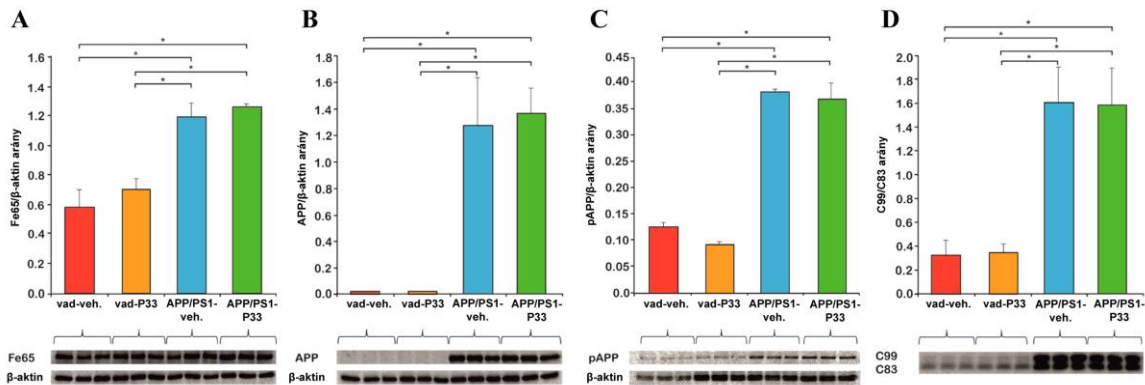
8. ábra: A GFAP (A) és az Iba1 (B) festések kvantitatív eredményei.

P33 kezelés hatása az APP feldolgozásra

A P33 kezelés az Fe65, APP, pThr⁶⁶⁸-APP szintre és a C99/C83 arányra gyakorolt hatását kilenc hónapos állatokban detektáltuk WB kísérletek keretében. Az endogén Fe65 szintben szignifikáns emelkedést találtunk a transzgen állatokban a vad egerekhez képest (9A ábra). Az A β detektálására alkalmazott 6E10 antitest kizárólag a humán APP-t ismeri fel, mivel nem tudtuk APP-t kimutatni a vad állatokban. A P33 kezelés hatására az APP mennyisége szignifikánsan nem változott az APP/PS1 állatokban (9B ábra).

Az irodalmi adatokkal megegyezően, a pThr⁶⁶⁸ foszforilációja szignifikánsan magasabb a transzgen egerekben, mint a vad társaikban, a P33 injektálásnak nem volt szignifikáns hatása a pThr⁶⁶⁸-APP szintre (9C ábra).

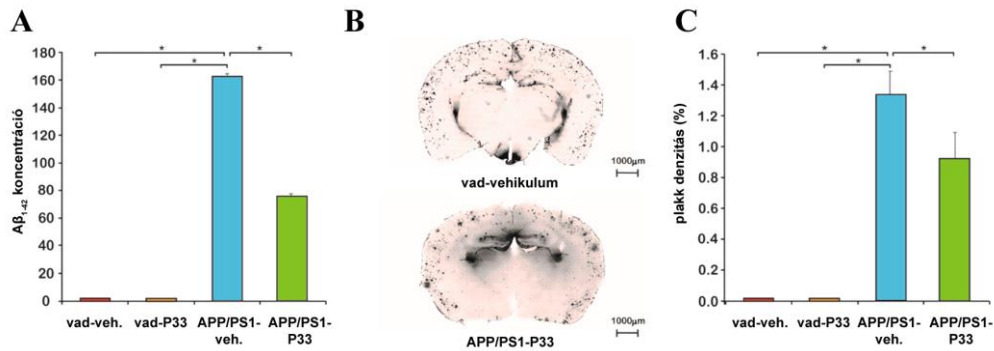
A transzgen állatokban fokozott az amiloidogén feldolgozás, így egy megemelkedett C99/C83 arányt figyeltünk meg, melyet a P33 kezelés számottevően nem befolyásolt (9D ábra).



9. ábra: Fe65 (A), APP (B), pThr⁶⁶⁸-APP (C) szint, és C99/C83 arány (D) eredményei WB-tal.

A vad egerekben nem tudtuk A β ₁₋₄₂ (0 pM) mennyiséget detektálni, ami azt bizonyítja, hogy az A β -felismerő 3D6 antitest kizárólag csak humán szekvenciát mér. Az APP/PS1-vehikulum csoportban szignifikánsan magasabb A β ₁₋₄₂ koncentrációt detektáltunk az APP/PS1-P33 társaikhoz képest. Az eredmények azt mutatják, hogy a P33 kezelés az A β ₁₋₄₂ szintjének csökkenéséhez vezet az APP/PS1 egerekben (10A ábra).

Az egyutas ANOVA szignifikáns különbséget mutatott ki az A β plakkok denzitásában a csoportok között. A vad állatok agyában nem tudtuk A β plakk lerakódást kimutatni. A *post hoc* elemzés bebizonyította, hogy a vegyület hosszú távú adagolása szignifikánsan csökkentette a plakk denzitást az APP/PS1-P33 csoportban az APP/PS1 vehikulum injektált egerekhez képest (10B, C ábra).



10. ábra: $A\beta_{1-42}$ szint detektálása ELISA-val (A), plakk denzitás mérése immunhisztokémiával (B, C).

Összefoglaló és konklúzió

Széleskörben elfogadott, hogy a neurogenesis fontos szerepet játszik a memória és a tanulási funkciók fejlesztésében és fenntartásában. Korábbi kísérletek kimutatták, hogy a neurogenesis csökken mind a normál öregedés során, mind a neurodegeneratív betegségekben, beleértve az AK-t is. Az eredmények szerint a felnőttkori hippocampális neurogenesis csökkenésének jelei egyértelműen megjelennek az AK-ban, ami kognitív diszfunkciót okozhat. A neurogenesis megváltozásában szerepet játszó molekuláris folyamatok feltérképezése elengedhetetlen lenne annak tisztázásához, hogy ez megelőzi-e az AK patológia jegyeinek megjelenését, vagy inkább annak következménye.

- Tudomásunk szerint, először írtuk le a neurogenesis, a neuroinflammáció és az AK patológia közötti az állatok hosszabb életszakaszán (1-12 és 18 hónapos korban) érvényesülő összefüggéseket APP_{Swe}/PS1_{DE9} transzgen és C57BL/6J kontroll egerekben.
- A neurogenesis markerek (BrdU, DCX) denzitásában életkortól függő csökkenést észleltünk mind a vad típusú, mind az APP/PS1 állatokban, utóbbiaknál a gyulladási folyamatok és az AK patológia további fokozódása mellett.
- Eredményeink azt igazolják, hogy a Tg egerekben a plakkok korai megjelenése, az amiloidogén útvonal egyes termékeinek mennyiségi változása, valamint az ezt követő neuroinflammáció kialakulása az öregedéssel együtt hozzájárulhat a neurogenesis fiziológiai hanyatlásához.
- Megterveztünk és előállítottunk egy pentapeptidet, a P33-at, amely az Fe65 WW doménjéhez kötődik. A hosszú távú (6 hónapos) kísérletben a P33 előnyös hatást fejtett ki a térbeli tanulásra, a memóriára, a dendritsűrűsége és a poszt-szinaptikus fehérjék (PSD95, SYN) szintjére transzgen egerekben. Szignifikánsan növelte a BrdU⁺ és a DCX⁺ sejtek denzitását. Képes volt

szignifikánsan csökkenteni a gyulladást (GFAP, Iba1), és pozitívan befolyásolta az APP amiloidogén feldolgozását. Ezért a P33 ígéretes, potenciális neuroprotektív gyógyszerjelölt vegyületnek bizonyult, amely enyhítheti az AK-ra jellemző kóros folyamatokat.

- Adataink alátámasztják azt a hipotézist, hogy az AK patológia előrehaladása molekuláris szinten nemcsak az AK klinikai tüneteinek megjelenéséért tehető felelőssé, hanem a neurogén folyamatok károsodásáért is. Ezért a korai és elnyújtott neuromodulátor terápia több úton is kedvezően befolyásolhatja az AK lefolyását.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Fülöp Líviának, aki lehetővé tette, hogy csatlakozhassak a kutatócsoportjához, és útmutatásai segítettek kísérleti projektjeim és tézisem megvalósításában.

Szeretném megköszönni az Orvosi Vegytani Intézet munkatársainak, Dr. Schuster Ildikónak, Dr. Bozsó Zsoltnak, Tüdös Dórának, Gyebrowszki Andreának, Papp Zita Ibolyának, Pataki Szilviának, Dénes Szilviának, Nagy Lídiának és Varga Viktóriának a segítséget.

Köszönettel tartozom kollégámnak és barátomnak, Borbély Emőkének, hogy iránymutatást, támogatást és bátorítást nyújtott ezekben az években.

Szeretném megköszönni Prof. Dr. Tóth Gábornak, Prof. Dr. Martinek Tamásnak és Prof. Dr. Penke Botondnak, hogy lehetővé tették, hogy az Orvosi Vegytani Intézetben dolgozzak.

Köszönöm Prof. Dr. Tiszlavicz Lászlónak, hogy lehetőséget adott és támogatja a Patológia Intézetben folyó munkámat.

Köszönetet mondok Dr. Oláh-Németh Orsolyának, Dr. Turkevi-Nagy Sándornak. Dr. Radics Bencének, Dr. Nyári Gergelynek és Németh Erikának a biztatásért és a folyamatos támogatásért.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném kifejezni köszönetemet férjemnek, Imrének. Családomnak és barátaimnak köszönöm a feltétel nélküli támogatásukat, szeretetüket, és a végtelen biztatásukat.