

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor : Fyziologie živočichů- neurobiologie



Bc. Patrícia Karkušová

**Vliv m6A dráhy na elektrofyzilogické koreláty prostorové
paměti v animálním modelu Alzheimerovy choroby**

The role of the m6A pathway on electrophysiological correlates of
spatial memory in animal model of Alzheimer's disease

Diplomová práce

Školitel: Mgr. Petr Telenský, Ph.D.

Praha, 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 11.8.2022

Poděkování

Na tomto mieste by som chcela poďakovať Mgr. Petrovi Telenskému, PhD. za vedenie diplomovej práce a súčasne aj MUDr. Karlovi Ježkovi, Ph.D. za možnosť pracovať na jeho oddelení experimentálnej elektrofyziológie a za trpezlivosť, ktorú so mnou počas písania práce mal.

Ďalej by som chcela veľmi poďakovať MUDr. Karlovi Blahnovi, Ph.D., za zaučenie do elektrofyziologického nahrávania so systémom Axona a za pomoc pri všetkých problémoch, ktorým som čelila počas tréovania, nahrávania a analýzy dát. Veľké ďakujem patrí aj MSc. Athire Nataraj, za pomoc pri behaviorálnych experimentoch a nahrávaní. Nakoniec ďakujem aj Lenke Sýkorovej za prípravu tetródových elektrofyziologických implantátov, bez ktorých by nahrávanie nebolo možné.

V neposlednom rade ďakujem aj mojej rodine, za psychickú podporu.

Abstrakt SK

Jednou z najdôležitejších kognitívnych funkcií je pamäť, ktorú delíme na dve rozdielne formy a to krátkodobú a dlhodobú. Dlhodobú pamäť ďalej delíme na **explicitnú (deklaratívnu)** pre fakty a udalosti a **implicitnú (nedeklaratívnu)** pamäť pre všetky zvyšné typy pamäti, ktoré nespádajú pod explicitnú. Významným ochorením u ktorého nastáva postupná strata deklaratívnej pamäti a s ňou priestorovej orientácie je Alzheimerova choroba. Ide o jednu z najčastejších príčin demencií a postihuje desiatky miliónov ľudí na celom svete.

Cieľom nášho experimentu bolo stanovenie vplyvu inhibície FTO demetylázy v potkanom modeli Alzheimerovej choroby (TgF344-AD) a kontrolnej skupine (F344-CT) na jednotkovú aktivitu neurónov u voľne sa pohybujúcich zvierat a na stabilitu priestorovej mapy. Pomocou tetród sme extracelulárne nahrali aktivitu neurónov v hipokampálnej podoblasti CA1 v dvoch rôznych podmienkach (známe, neznáme prostredie) pred a po podaní inhibítora. Následne sme analýzou signálu porovnávali zmeny jednotkovej aktivity princípálnych neurónov (stabilita mapy/ remapovanie mapy) súvisiace s aplikáciou farmakologického inhibítora FTO demetylázy MO-I-500.

V našej pilotnej štúdii sme zistili zvýšenie priemeru frekvencií akčných potenciálov u potkanov línie F344-CT v známom aj neznámom prostredí po podaní inhibítora, u potkanov línie TgF344-AD sa zmena priemerných frekvencií pálenia akčných potvrdila len v novom prostredí. Pozitívny vplyv inhibítora na stabilitu priestorovej mapy sme zistili u línie F344-CT a na remapovanie mapy sme nezískali žiadny štatisticky významný rozdiel ani u jednej z línií. Naše výsledky naznačujú pozitívny vplyv inhibítora RNA demetylázy FTO (MO-I-500) na stabilitu priestorovej mapy familiárneho prostredia u potkaních samcov línie F344-CT.

Kľúčové slová:

pamäť, FTO demetyláza, Alzheimerova choroba, neuróny miesta, Hipokampus

Abstrakt AJ

Memory is one of the vital cognitive functions and can be divided into two categories, short-term memory and long-term memory. Long - term memory is further divided into **explicit (declarative)** for facts and events and **implicit (non-declarative)** memory, covering all other types of long-term memory. Alzheimer's disease is well known for a gradual loss of declarative memory and spatial orientation. It is one of the most common causes of dementia and affects tens of millions of people worldwide.

The aim of our study was to determine the effect of inhibition of FTO demethylase on neuronal activity in a rat model of Alzheimer's disease (TgF344-AD) and a control strain (F344-CT), and evaluate the stability of spatial maps. We used tetrodes implanted in hippocampal CA1 subregion to record extracellular neuronal activity. Spiking activity was recorded in two spatially different conditions (familiar, unknown) twice, before and after applications of pharmacological inhibitor of FTO demethylase (MO-I-500). We have also evaluated remapping and map stability related to the application of MO-I- 500.

We found the average frequency of neuronal firing rate increased in F344-CT rats in both familiar and novel environments after inhibitor administration, whereas increase in TgF344-AD rats was detected only in the novel environment. Next we found a positive effect of MO-I-500 for spatial map stability in F344-CT rats, and we did not obtain any statistically significant differences for remapping. Our results indicate a positive effect of the FTO inhibitor (MO-I-500) on F344-CT male rats map stability.

Key words:

memory, FTO demethylase, Alzheimer's disease, place cells, Hippocampus

Obsah

1	Úvod.....	16
2	Anatómia hipokampu.....	19
2.1	Hipokampus primátov a ľudí	19
2.2	Hipokampus potkana	20
2.2.1	Vlastnosti neurónov v hipokampe a ich obsadenie v podoblasti CA1	22
3	Vznik akčného potenciálu v neuronálnych bunkách schopných excitácie	26
3.1	Iónové kanály.....	26
3.2	Napäťovo riadené kanály pre ióny sodíka	27
3.3	Napäťovo riadené kanály pre ióny draslíka	27
3.4	Napäťovo riadené kanály pre ióny vápnika	27
3.5	Sodno-draselná pumpa.....	27
3.6	Chemický prenos informácie medzi neurónmi	28
3.7	Narušenie synaptickej komunikácie v patológii Alzheimerovej choroby.....	30
4	Formovanie deklaratívnej, explicitnej pamäti.....	32
4.1	Neuróny miesta „place cells” , navigačný systém a priestorová orientácia u zvierat a ľudí....	34

4.2	Testovanie deklaratívnej pamäti zvierat formou orientácie v priestore experimentálneho bludiska.....	38
4.2.1	Najčastejšie využívané testy priestorovej orientácie.....	38
4.2.2	Iné bludiská využívané pre testovanie priestorovej orientácie.....	41
4.3	Zmeny priestorovej orientácie v patológii Alzheimerovej choroby.....	42
5	FTO demetyláza m6A dráhy.....	44
5.1	Metylácie a demetylácie m6A dráhy a ich vplyv na pamäťové mechanizmy na synaptickej úrovni a v patológii Alzheimerovej choroby	45
6	Experimentálna časť	48
6.1	Ciele experimentálnej časti	48
6.2	Materiál a metodika	49
6.2.1	Model použitých experimentálnych zvierat	49
6.2.2	Experimentálne zvieratá.....	49
6.2.3	Prístroje a nástroje.....	50
	Chemikálie	50
	Pomôcky	50
6.2.4	Metodika tréningu	52
	Tréning.....	52

6.2.5	Metodika implantácie.....	52
6.2.6	Metodika elektrofyziologického nahrávania.....	54
6.2.7	Metodika aplikácia inhibítora FTO demetylázy (MO-I-500)	56
6.2.8	Metodika analýzy elektrofyziologických dát.....	56
6.2.9	Metodika hodnotenia kvality klastrov.....	57
6.2.10	Metodika tvorby place fields.....	60
7	Výsledky	65
7.1	Analýza priemernej aktivity pálenia akčných potenciálov principálnych neurónov, pred a po podaní inhibítora FTO demetylázy (MO-I-500) u potkanov línie F344-CT a TgF344-AD vo familiárnom a novom prostredí.....	65
7.2	Priestorové korelácie neurónov miesta pred a po podaní inhibítora FTO demetylázy (MO-I-500) u samcov línie F344-CT a TgF344-AD.....	69
7.2.1	Korelačné koeficienty pred a po podaní inhibítora FTO demetylázy (MO-I-500)	73
8	Diskusia	78
8.1	Analýza priemernej aktivity pálenia akčných potenciálov principálnych neurónov, pred a po podaní inhibítora FTO demetylázy (MO-I-500) u potkanov línie F344-CT a TgF344-AD vo familiárnom a novom prostredí.....	79
8.2	Priestorové korelácie neurónov miesta pred a po podaní inhibítora FTO demetylázy (MO-I-500) u samcov línie F344-CT a TgF344-AD.....	79
9	Záver	82

10	Literatúra.....	84
11	Prílohy.....	93
11.1	Zoznam obrázkov.....	93

Zoznam skratiek

- 1D – 1 dimenzia
- 1-meA- 1-metyl-Adenín
- 2D- 2 dimenzie
- 2-OG- 2-oxoglutarate
- 3-meC- 3-metyl-Cytozín
- 5-HT – serotoninový receptor
- AD - Alzheimerova choroba
- ADP - vlna po depolarizácii
- AHP – vlna po hyperpolarizácii
- AlkB – skupina proteínov alfa-ketoglutarát-dependentnej hydroxylázy
- ALKBH1-9 - AlkB skupina proteínov
- AMPA – receptor α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionové kyseliny
- ApoE- Apolipoprotein Epsilon
- ApoE4- 4. alela Apolipoproteínu E
- APP- amyloidový prekursor- proteín
- Arc - skorá forma génovej transkripcie
- ATP - Adenozíntrifosfát
- BBB- mozgovo-cievna bariéra
- BDNF - brain derived neurotrophic factor
- C57BL/6- línia experimentálnych myší
- CA1- podoblasť hipokampálnej štruktúry
- CA2- podoblasť hipokampálnej štruktúry
- CA3- podoblasť hipokampálnej štruktúry
- CaMKII - calmodulin-závislá proteinkináza II
- cAMP – cyklický adenosín monofosfát
- CCF-STTG1- humánnej astrocytárnej línie
- Cpu- caudate putamen
- CREB1 - cAMP responsive element binding protein 1
- CRISPR/Cas9 – HSV- pomenovanie vírusového vektora vytvoreného technikou CRISPR
- deltaE9 pomenovanie mutácie génu
- DNA – deoxyribonukleová kyselina
- Epo- erytropoetínu
- EPSP - Excitací postsynaptický potenciál
- ERK - Extracellular signal-regulated kinases
- GABA - Kyselina gama-aminomaslová
- GFAP - glialny fibrilárny kyslý proteín
- GPCR - Receptor sridružený s G proteinem
- hnRNP C- proteín v mechanizme m6A switch
- LTD- synaptická depresia
- LTP – synaptická potenciácia
- MAP- kináz - Mitogen-activated protein kinase
- MAPK - mitogenem aktivovaná proteinkináza

- MCI- mierny kognitívny deficit (mild cognitive impairment)
- METL14- katalytický proteín m6A dráhy
- METTL3- katalytický proteín m6A dráhy
- mGluR I. – III – glutamátový GPCR
- mRNA – messengerová RNA
- mV – mili volt, jednotka napätia
- Nacc- nucleus accumbens
- napr.- napríklad
- NFTs – neurofibrilárne kľbká Tau proteínu
- NMDA - N-metyl-D-aspartát receptor
- NR2b - podjednotka NMDA receptoru
- PHD- prolyl-4-hydroxyláza
- PKA - proteinkináza A
- PKC - proteinkináza C
- PKC β – proteinkináza C beta
- PS1- označenie mutácie presenilinu 1
- PS2- označenie mutácie presenilinu 2
- PSD- post synaptic density
- PSD-95 – pomenovanie proteínu patríceho do skupiny s membranou-associovaných guanylát kináz, lokalizovaných na PSD
- PSEN1 – pomenovanie mutácie génu
- RNA - Ribonukleová kyselina
- Ser396- na pozícii serotonín 396
- SH-SY5Y- názov ľudľanej bunkovej ľnie
- Tau- pomenovanie proteínu, ktorá sa hromadí intracelulárne pri AD
- TAU - skupina proteínov viažúcich sa na mikrotubuly
- VGSC – napäťovo závislé sodíkové kanály
- VTA- PN- podoblasť paranigral nucleus ventrálnej tegmentálnej oblasti
- YTH- väzobné proteíny rozpoznávajúce priamo metylované sekvencie
- WTAP – proteín – regulačná podjednotka m6A dráhy
- α - alfa
- α -KG - α -ketoglutarát
- β - beta
- γ - gama
- δ – delta

Experimentálna Časť

- Fam1 – prostredie lineárnej dráhy
- Fam2 - prostredie lineárnej dráhy
- Nov1 - prostredie lineárnej dráhy
- Nov2 - prostredie lineárnej dráhy
- FAM - označenie priemerných hodnôt z Fam1 a 2
- NOV – označenie priemerných hodnôt z Nov1 a 2
- ANOVA- štatistický test
- SEM- štandardná chyba priemeru
- TgF344-AD – potkany transgénnej línie
- F344-CT – potkany kontrolnej línie
- FTO-MO-I-500 – farmakologický inhibítor
- FTO - Fused toes
- Hz- jednotka frekvencie signálu
- PN1 – počet potkanov N línie F344-CT
- PN2 – počet potkanov N línie TgF344-AD
- n1 – počet neurónov z línie F344-CT
- n2 – počet neurónov z línie TgF344-AD

Anglické výrazy

- Aging- starnutie
- alveolus - dutinka nad hipokampálnou štruktúrou
- anterior- predný
- antero- inferiornej – štruktúry v prednej časti hlavy v spodnom kvadrante
- antero- predno
- assembly- skupina
- border cells – neuróny hranice
- bursting – označenie špecifickej aktivity pyramídálnych neurónov
- caudate putamen – oblasť mozgu
- dendritic inhibitory – charakteristické pomenovanie košíčkových buniek
- error rate - chybovosť
- excitatory postsynaptic potentials – excitačné postsynaptické potenciály
- freezing – zmeravenie, behaviorálny prejav pri strachovom podmieňovaní
- Fused toes - mutácii génu, zodpovedného za fenotyp zlúčených prstov u myší
- grid cells – neuróny mriežky
- gyrus- závit
- head direction cells – neuróny polohy hlavy
- Hippocampus – hipokampus
- inferiornej- dolnej
- knock-out - pomenovanie experimentálnej línie s vyradeným génom
- landmarks – orientačný bod
- messengers - poslovia
- mild cognitive impairment – mierny kognitívny deficit
- mossy fibers- mechové vlákna ,axóny vedúce z gyrus dentatus do CA3
- multimodálny- mnohovstupový
- nucleus accumbens - oblasť mozgu
- parahipocampal- ležiaci medzi hipokampálnym a kolaterálnym sulkom
- paranigral nucleus – podoblasť ventrálnej tegmentálnej oblasti
- path integrator - integrátor dráhy
- pattern completion – proces ukončenia
- pattern separation – proces separácie
- place cells – neuróny miesta
- place field – miesto poľa, určité miesto priestoru (receptívna zóna)
- postero – inferiornej - štruktúry, ktoré sú v zadnej časti hlavy v spodnom kvadrante
- Q-time – meraný parameter pri teste MWM
- raw - surový
- review -prehodnotenie, preskúšanie
- second messengers – ióny vápnika (Ca^{2+}), sekundárny poslovia
- Schaffer collaterals- Schafferovy kolaterály, axóny vedúce z CA3 do CA1
- soma- telo neurónu
- speed cells – neuróny rýchlosti
- spines- trne na dendritoch
- subcallosal- pod oblasťou corpus callosum

- thorny excrescences – špecifická forma dendritických trňov
- tufts – charakteristické distálne dendritické zakončenia
- voltage clamp – napäťový zámok
- voltage gated sodium channels – napäťové kanály pre ióny sodíka

Latinské výrazy

- *amygdala*- mozgová štruktúra
- *antero- inferior* – vpredu dolu
- *cornu ammonis*- hipokampus
- *gyrus dentatus*- podoblasť hipokampu
- *hilus* –štruktúra apatriaca k parahipokampálnemu gyru
- *in vitro* – štúdie v prostredí simulujúcom prirodzené prostredie
- *in vivo* – štúdie v prirodzenom prostredí
- *indusium griseum*- tenká membránová vrstva v kontakte s korpus kalosum
- *locus ceruleus* - Oblasť mozgu charakteristická produkciou noradrenalínu
- *ncus*- mozgová štruktúra patriaca do parahipokampálneho gyru
- *nucleus Raphe magnus* mozgová štruktúra so serotonínovými jadrami
- *pars basalis telencephali* - basal forebrain, mozgová štruktúra charakteristická cholinergnými neurónmi
- *postero – inferior* – vzadu dolu
- *stratum granulosum*- vrstva v hipokampálnej formácii, konkrétne v GD
- *stratum lacunosum-moleculare*- vrstva v hipokampálnej formácii
- *stratum oriens*- vrstva v hipokampálnej formácii
- *stratum pyramidale*- pyramidálna vrstva v hipokampálnej formácii
- *stratum radiatum* - vrstva v hipokampálnej formácii
- *subiculum*- mozgová štruktúra
- *Superior* – nad
- *supracallosalny* – nad štruktúrou corpus callosum

LITERÁRNY PREHLAD

1 Úvod

Pamäť odzrkadľuje súbor veľkého množstva procesov prebiehajúcich medzi neurónmi na rôznych úrovniach neuronálnych sietí. V tých nižších úrovniach ide o základné fyziologické procesy, často reflexné oblúky, ktoré sú dlhodobo študované na známom modelovom organizme *Aplysia* (napríklad Kandel et al., 1981; Carew, 1989). V tých vyšších odzrkadľuje vyššie kognitívne funkcie, ako sú procesy komplexného učenia, na základe spektra impulzov zo senzorického systému. U ľudí pamäť delíme na dve rozdielne formy, krátkodobú a dlhodobú. Dlhodobú pamäť ďalej delíme na **explicitnú (deklaratívnu) pamäť** pre fakty a udalosti, miesta, objekty, ľudí. Je asociovaná s úplným vedomím a následne ju môžeme špecifikovať na epizodickú, sémantickú. Explicitne si vieme zapamätať detaily, ktoré spolu dávajú jasnú predstavu, alebo spomienku na daný moment, niekde, s niekym v určitom čase. Kde presne je táto pamäť uložená, je stále nezodpovedaná otázka vedy. Z doterajších štúdií, primárne štúdií s léziami rôznych mozgových oblastí, je zrejmé, že jej umiestnenie je pravdepodobne v oblastiach hipokampálnej štruktúry a exterohipokamálnych, k hipokampu prilahlých oblastí, čo predstavuje oblasti medio-temporálneho laloka mozgu (Smith & Milner, 1981, Rempel-Clower et al., 1996, Petrides, 1985). **Implicitnú (nedeklaratívnu) pamäť**, ktorá pokrýva ostatné typy pamäti, nezávislé od vedomia. Sú to mechanizmy, ktoré nám umožňujú automatizáciu pohybov (chodenie, jazda na bicykli) alebo odpovedajú na stimuly (podmieňovanie, habituácia). Vedome sa jednotlivé zručnosti a zdatnosti učíme no pri ich používaní nemusíme uvažovať, napríklad, kedy počas chôdze použiť ľavú a pravú nohu. Od istého momentu, sa stane chôdza automatickou. Pojem nedeklaratívna teda znamená, že jej obsah nevieme verbálne deklarovať. U zvierat predpokladáme, že disponujú oboma typmi pamäti, no nedefinujeme ich rovnako.

Eric Kandel vo svojej knihe, „Principles of Neural Science“ popisuje učenie ako postupný proces, ktorým získavame informácie o okolitom svete a pamäť je spôsob, ako si získané informácie uchováme na to, aby sme ich neskôr mohli opäť využiť (Kandel et al., 2000). Úmerne so získavaním informácií akýkoľvek živý organizmus mení správanie ako odpoveď na získanú informáciu.

Najznámejším popísaným princípom učenia je Hebbov princíp, ktorý hovorí o synaptickom posilnení spoluaktivovaných neurónov (Hebb, 1949). Jednotlivé okruhy posilnených synapsí vytvárajú základ pre vznik pamäťových asociácií. Štúdie v oblasti hipokampu a tvorby pamäťových okruhov poukazujú na mechanizmus synaptickej potenciácie (LTP) a depresie (LTD), sprostredkovanú iónovými a receptorovými kanálmi, primárne kanálmi pre

ióny Ca^{++} a receptormi typu AMPA a NMDA (Bekkers & Stevens, 1989). Mechanizmus umožní vtok Ca^{++} iónov (známych aj ako second messengers) do neuronálnej bunky, ióny aktivujú kaskádu reakcií, ako sú aktivácia PKA, CaMK, MAPK s cieľom aktivácie jadrových transkripčných faktorov, ako je CREB a transkripcie okamžitých ranných génov. Transkripciou génov sa na synaptických zakončeníach syntetizujú proteíny, napríklad BDNF (Patterson et al., 1992) podporujúce rast a zosilnenie synapsií. Navzájom prepojené neuróny s posilnenými synapsiami vytvárajú neuronálne zostavy, ktorých synchronizovaná aktivita kóduje napríklad priestor. Priestorovo aktívne bunky nazývame neuróny miesta („place cells“), ktorých synchronizovaná zvýšená aktivita poukazuje na konkrétne miesto priestoru, označované ako receptívna zóna bunky, nazývané place field (O'Keefe & Dostrovsky, 1971; McNaughton et al., 1996). U laboratórnych zvierat sú vlastnosti týchto buniek zaužívaným prostriedkom v oblasti štúdia hipokampu, pamäti, neuronálnych sietí a neurodegeneratívnych ochorení, spôsobujúcich pamäťové deficity rôzneho rozsahu (Galloway et al., 2018).

Významným ochorením, u ktorého nastáva postupná strata pamäti, je Alzheimerova choroba (AD). AD je jedna z najčastejších foriem demencií, ktorá postihuje široké vekové spektrum ľudí, na celom svete. Pri dedičnej familiárnej forme AD, je príčina vzniku ochorenia známa, pričom príznaky ochorenia začínajú pri skoršej forme od 30 roku života, a pri neskoršej forme od 50.-60. roku života (Brickell et al., 2006). Spúšťacím mechanizmom je genetická mutácia amyloidového prekursorového proteínu (APP) a mutácia génov presenilinu PS1 a PS2 s následným hromadením β -amyloidových plakov v extracelulárnom priestore (Haas, 1997) a proteínu Tau vo forme neurofibrilárnych kĺbkov (NFTs) v intracelulárnom priestore (Medeiros et al., 2011). Výsledkom hromadenia nerozpustných foriem proteínov je postupný zánik neuronálnych buniek v danej oblasti s následnou atrofiou. Pri sporadickej forme je spúšťací mechanizmus stále neznámy, no medzi rizikové faktory patrí napríklad dedičná forma ApoE, konkrétne jeho 4 izoforma, ApoE4 (Saunders et al., 1993). Príznaky v prípade neskoršej formy sporadickej AD začínajú formou mierneho kognitívneho deficitu (mild cognitive impairment „MCI“) okolo 65. roku života (Schellenberg, 2006), s postupným progresívnym zhoršením príznakov. V závislosti od priebehu môže ochorenie následne skončiť predčasnou smrťou.

Ochorenie postihuje primárne mozgové centrá spájané s pamäťou, čo vedie k vážnym pamäťovým deficitom a strate kognitívnych vlastností, napríklad priestorovej orientácie. Jednou z najpreskúmanejších oblastí vo vzťahu k AD je preto hipokampus (De Leon et al., 1990).

V rôznych experimentálnych štúdiách zameraných na Alzheimerovu chorobu, experimentátori pracujú s modelovými organizmami, ktoré sú nositeľmi mutácií rovnakých

génov, aké sú spájané s AD. Tieto organizmy predstavujú vhodný spôsob pre štúdium ochorenia a sú dlhodobo akceptované vedeckou komunitou. Najčastejším organizmom v štúdiách sú hlodavce, pre ich krátku dĺžku života (cca 2 roky), ktorá je vhodná pre štúdium ochorenia *in vivo*, v relatívne krátkom čase. Okrem analýzy rôznych biochemických parametrov, signálnych dráh alebo génov umožňujú testovanie behaviorálnej odpovede, použitím rôznych kognitívnych testov. Iným modelovým organizmom sú bunkové línie, ktoré slúžia primárne na *in vitro* štúdie vhodné pre sledovanie metabolických procesov a signálnych dráh v prostredí jednej bunky. Využitie jednotlivých modelových organizmov závisí od typu experimentu a vedeckej otázky (hypotézy), ktorú chce vedecká skupina experimentom zodpovedať.

2 Anatómia hipokampu

Jeden z popredných experimentátorov 16. storočia, známy anatóm Julius Caesar Arantius, dbal na porozumenie anatómie. Svoje osobné skúsenosti a poznanie vyučoval formou anatomických pitiev na Bolonskej univerzite v Taliansku. V tej dobe bol hipokampus popisovaný len zbežne. Profesor Arantius sa stal prvým anatómom, ktorý odkryl a charakterizoval štruktúru hipokampálnej formácie. Najskôr ju menoval rôzne, mytologickými a zoologickými znameniami, no neskôr, vo svojej práci z roku 1579, použil slovo „Hippocampus“. Hipokampálna formácia nadobúda vzhľad morského koníka práve z ventrálnej strany po odstránení parahipokampálnej kôry a okolitej bielej hmoty (Bir et al., 2015).

2.1 Hipokampus primátov a ľudí

Hipokampus je súčasťou limbického systému, obklopený dvomi záhybmi. Prvý, vonkajší je z postero – inferiornej strany ako parahipokampálny gyrus. Superiorne je nazvaný ako gyrus cinguli a z antero- inferiornej strany je ním subcallosálny gyrus. Druhý, vnútorný, limbický záhyb vytvára hipokampálnu formáciu, ktorú je možné rozdeliť na základe jej tvaru na tri nasledujúce segmenty: 1. hlava (*bulbus anterior*), nazývaný aj *pes* alebo noha, 2. telo a posledný je 3. posteriorne zbiehajúci, úzky chvost. Gyrus následne pokračuje ako zmenšený, supracallosálny gyrus (*indusium griseum*). Hipokampálna formácia je formáciou troch oblastí, *cornu ammonis*(CA), *gyrus dentatus* a *subiculum*. Anteriorne sú v hipokampálnej formácii dominujúce podoblasť CA1 a *subiculum*, posteriorne sú podoblasti CA2, CA3 a *gyrus dentatus* (Hayman et al., 1998).

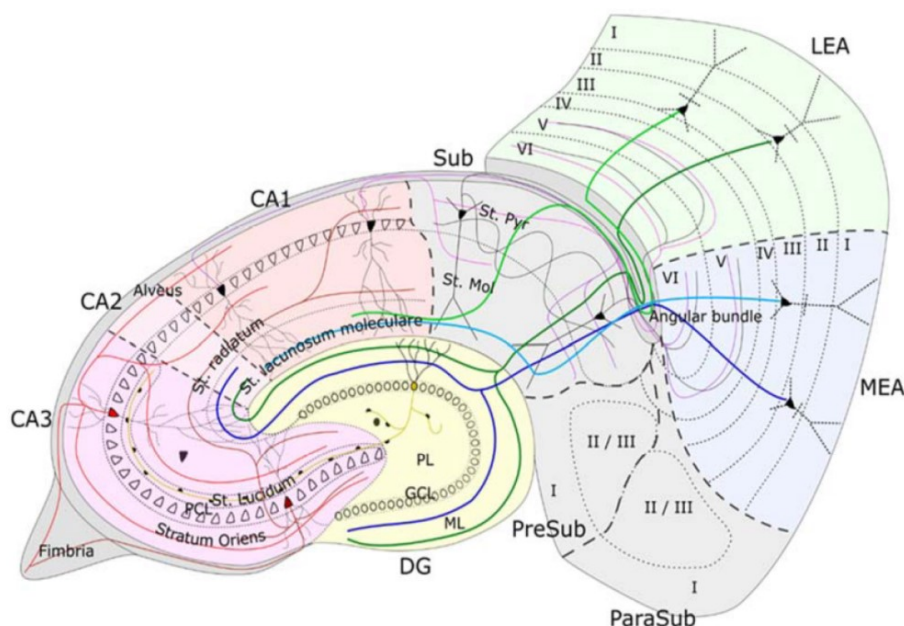
Z hľadiska prepojenia jednotlivých podoblastí, aferentné dráhy vychádzajúce z entorinálnej kôry vedú do oblasti *gyrus dentatus*, odkiaľ ďalej vychádzajú aferentné dráhy do hipokampálnych podoblastí CA1, CA2, CA3 a *subiculum*. Podoblasť CA1 a *subiculum* následne projektujú do entorinálnej kôry. Prepojenia prechádzajúce cez *gyrus dentatus* do CA3 sú pomenované, ako machové vlákna „mossy fibers“. Dráhy vedúce z CA3 do CA1 sú známe, ako Schafferovy kolaterály „Schaffer collaterals“ (Kondo et al., 2009).

Napriek tomu, že je hipokampus medzidruhovo veľmi podobný, niektoré podoblasti sú u niektorých cicavcov vyvinuté viac. Príkladom je parahipokampálna oblasť *uncus*, ktorá je veľmi dobre vyvinutá u primátov. Zeidman a Maguire vo svojom review poukazujú na problém medzidruhového anatomického a funkčného porovnania. Nedostatok a komplikovaný zber

informácií z ľudských mozgových štruktúr (napr. elektrofyziológiou) vytvára bariéru pre porovnávanie oblastí a charakterizáciu medzidruhových rozdielov . Stále s istotou nevieme povedať, či rovnaké mozgové oblasti, ktoré vykonávajú charakteristickú funkciu u ľudí, vykonávajú rovnakú funkciu aj u zvierat, ak nimi disponujú a opačne (Zeidman & Maguire 2016).

2.2 Hipokampus potkana

Hipokampálna oblasť, alebo formácia, je u potkanov charakteristicky ohnutá do tvaru písmena C, zostupujúca v kaudálno – dorzálnom smere. Rovnako ako u ľudí, aj u hlodavcov ju delíme na 3 hlavné segmenty, ktorými sú *Gyrus dentatus*, *Subiculum* (pre- , post- subiculum) a hlavný hipokampus, ďalej rovnako delený na podoblasti CA1, CA2 a CA3. Formácia má vzhľad trojvrstvy, z ktorej prvá vrstva obsahuje množstvo dostredivých (aferentných), odstredivých (eferentných) vlákien a interneurónov. V oblasti CA1 ju nazývame *stratum oriens*, v *gyrus dentatus* vytvára *hilus*. Superficiálne od *stratum oriens* sa nachádza vrstva, ktorá je bohatá na princípálne bunky a interneuróny. V CA ju označujeme ako *stratum pyramidale*, v oblasti *gyrus dentatus* je pomenovaná ako *stratum granulosum*. Ak sa pozeráme na oblasti CA, nad *stratum pyramidale* leží vrstva *stratum lucidum* a v *gyrus dentatus* sa nad *stratum granulosum* nachádza vrstva *stratum moleculare*. V oblastiach CA sa ďalej superficiálne nachádza vrstva *stratum radiatum*, ktorá obsahuje apikálne dendrity neurónov vychádzajúce zo *stratum pyramidale* a vrstva *stratum lacunosum moleculare*, v ktorej sú lokalizované najvrchnejšie výbežky apikálnych dendritov. V CA1 a CA2 oblasti chýba vrstva *stratum lucidum* (Van Strien et al., 2009)(Obrázok 1)



Obrázok 1: prepojenie hipokampu s anatomickým zobrazením polohy pyramidálnych neurónov v jednotlivých podoblastiach formácie. **CA1, CA2, CA3:** podoblasti hipokampálnej formácie, **LEA:** later. entor. kôra, **MEA:** medial. entor. kôra, **Sub:** subikulum (pre/Para), **DG:** gyrus dentatus, **st. Pyr:** stratum pyramidale, **St. Mol:** stratum moleculare, **GCL:** stratum granulosum, **ML:** stratum moleculare, **modré dráhy:** machové vlákna, **červené dráhy:** Schafferové kolaterály (<http://www.martinpyka.de/neurosvg/>).

Ako je spomenuté v predchádzajúcej kapitole, jednotlivé podoblasti hipokampálnej formácie sú navzájom prepojené charakteristickými dráhami, rovnako ako u ľudí. Dráhy vychádzajúce z *gyrus dentatus* smerujúce do oblasti CA3 sú pomenované ako machové vlákna, následné dráhy vychádzajúce z CA3, ktoré postupujú ďalej do oblasti CA1 sú pomenované, ako „Schaffer kollaterals“ (Laurberg, 1979).

Zaujímavé je tiež prepojenie týchto dvoch oblastí a to tým, že distálna časť podoblasti CA3 projektuje do proximálnej časti podoblasti CA1, proximálna časť podoblasti CA3 projektuje svoje dráhy do distálnej časti CA1 (Ishizuka et al., 1990). Proximálna časť CA1 posiela informácie do distálneho subicula, distálna časť CA1 do proximálneho subicula a tieto dráhy sú jednosmerné, dostredivé, nie sú recipročné. Podoblast CA1 tiež projektuje aj do entorinálnej kôry (Swanson et al., 1981).

Van Strien so spoluautormi vo svojej popisnej práci odpublikovanej časopisom *Nature*, detailne zhrnuli všetky poznatky a charakterizáciu potkanieho hipokampu s podrobnou charakterizáciou prepojení medzi hipokampom a parahipokampálnymi štruktúrami (Van Strien et al., 2009).

2.2.1 Vlastnosti neurónov v hipokampe a ich obsadenie v podoblasti CA1

V úlohe formovania či už krátkodobej, dlhodobej deklaratívnej, alebo emocionálnej pamäti má hipokampus dôležitú úlohu, ak nie najdôležitejšiu. Komunikácia jednotlivých neurónov a podoblastí celého hipokampu je tvorená systémom veľkých a malých komunikačných okruhov/ jednotiek, ktoré sú pomenované ako „assembly“ (funkčná zostava). Komunikácia týchto neurónov vzniká špecifickým jazykom rôznych synchronizovaných oscilácií, ktoré sa šíria jednotlivými štruktúrami mozgu, nielen hipokampom. Je teda známe, že veľké komunikačné okruhy, obsahujú vo svojej zostave neuróny, ktorých lokalizácia je v inej, pridruženej štruktúre, napr. amygdale. Ich hlavnou úlohou je dynamická odpoveď na vstupnú informáciu s následnými procesmi využitia/konsolidácie a poprípade degradácie pamäťových stôp (Holtmaat & Caroni, 2016).

Stratum pyramidale je bohatá na pyramidálne neuróny s dendritickými výbežkami, ktoré sú hlavným prijímačom informácií z integrovanej siete neuronálnych komunikačných jednotiek (Szabadics et al., 2006). Na svojich apikálnych a bazálnych dendritických výbežkoch prijímajú signály cez GABAergné synapsie z hipokampálnych podoblastí a priľahlých štruktúr. Excitačné prúdy vychádzajúce z rôznych lokálnych zdrojov, ako sú Schafferovy kolaterály alebo z okruhov blízkeho okolia, vstupujú do jednotlivých neurónov najčastejšie cez proximálne apikálne dendrity, excitačnými synapsiami v *stratum radiatum*. Apikálne distálne dendritické zakončenia (tufts) prijímajú signály cez glutamatergné synapsie z entorinálnej kôry, thalamu a iných vzdialenejších štruktúr (Klausberger & Somogyi, 2008; Spruston, 2008; Druckmann et al., 2014). Inhibičné GABAergné synapsie sa k jednotlivým neurónom pripájajú cez somu a axóny jednotlivých pyramidálnych buniek (Spruston, 2008). Hustota dendritických výbežkov a synapsií v pyramidálnych neurónoch sa v jednotlivých vrstvách líši. V *stratum radiatum* a v *stratum oriens* je vyššia v porovnaní s vrstvou *stratum lacunosum-moleculare*. Približne 54% všetkých excitačných synapsií na apikálnych dendritických výbežkoch sú v *stratum radiatum* (Spruston & McBain, 2007).

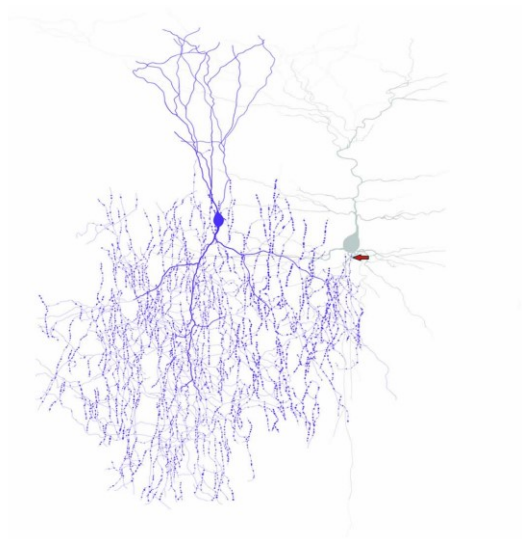
Rôzne morfológické merania naznačujú rozdiely medzi dĺžkami dendritických výbežkov a ich vzhľadom. Na základe charakteristického morfológického vzhľadu by sme mohli pyramidálne neuróny rozdeliť na tie, ktorých apikálny dendritický koniec prechádza bez zmeny, celou vrstvou *stratum radiatum* a bifurkácia nastáva vo vrstve *stratum lacunosum-moleculare* a tie, ktorých bifurkácia nastáva už vo vrstve *stratum radiatum* (Bannister & Larkman, 1995; Amaral & Lavenex, 2007). Na základe funkčných vlastností vytvárajúcich akýsi fenotyp neurónu vieme neuróny hipokampu charakterizovať ako inhibičné (interneuróny)

a excitačné (principálne) neuróny. Principálne neuróny sa sústreďujú vo vrstve *stratum granulosum* a *stratum pyramidale*, interneuróny sa nachádzajú v priebehu celého hipokmapu (Freund & Buzsaki, 1996).

Z morfológicko-anatomickeho hľadiska, rozdelili Freund a Buzsáki inhibičné interneuróny do 3 hlavných skupín.

1. „Lustrové bunky“, „Axo-axonic cells“

Ich základnou charakteristikou je objemný bazálny dendrit, lokalizovaný v *stratum oriens* a rastúci smerom k alveolu. Neuróny vytvárajú 2-30 paralelných synaptických zakončení (Szentagothai, 1975) na axóne principálnej alebo granulárnej bunky v *stratum oriens* v prípade CA1 oblasti, alebo v *hile* dentálneho gyru. Bunky sú lokalizované v blízkosti pyramidálnej vrstvy (Freund & Buzsaki, 1996).

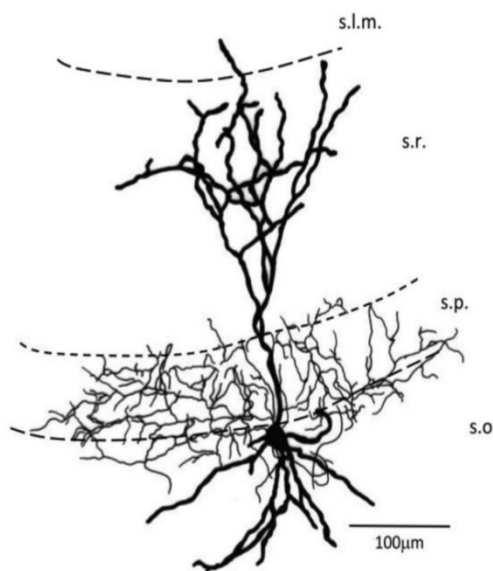


Obrázok 2: Lustrový interneurón (Wang et al., 2016)

2. Košíčkové bunky

Neuróny charakteristického vzhľadu označované ako obojstranne chocholaté. Dendritický strom je na apikálnom aj distálnom konci husto prerastený do pyramidálneho tvaru. Synaptické spojenia vytvárajú zásadne len na some a proximálnych dendritických výbežkoch (perisomatický región) principálnych neurónov (Cobb et al., 2005). Dendrity týchto

neurónov sú bez výbežkov (tŕňov) a inhibujú excitačné aferentné dráhy, vrátane machových vlákien a Schafferových kolaterálov. Podieľajú sa na inhibícii entorinálnych aferentných vstupov a okruhov, ktoré sú vytvárané lokálnymi principálnymi neurónmi v *stratum oriens* (Freund & Buzsaki, 1996).



Obrázok 3: Košíčkové bunky (Zemankovics et al., 2013)

3. Interneuróny inhibujúce principálne neuróny cez dendritické výbežky

Charakteristická vlastnosť týchto buniek, podľa ktorej majú prívlastok „dendritic inhibitory“, je inhibovanie principálnych alebo granulárnych neurónov výhradne (existujú výnimky) cez dendritické koruny. Neuróny sú ďalej rozdelené podľa charakteristických neuronálnych prepojení na:

O-LM interneuróny. Ich axóny prerastajú do *stratum lacunosum-moleculare* a ich dendritická koruna zasahuje do oblastí, v ktorých prechádzajú lokálne dráhy principálnych buniek. O-LM interneuróny sú rozdielne medzi CA1 a CA3 podoblasťou. V CA1 ich dendrity siahajú do vrstvy *stratum oriens*, v ktorej prechádzajú lokálne pyramídálne okruhy. V CA3 oblasti dendrity buniek prechádzajú takmer do všetkých vrstiev (okrem *stratum lacunosum moleculare*), ktoré obsahujú okruhy pyramídálnych buniek. Niektoré vetvy týchto neurónov prerastajú do *stratum oriens* (Silk et al., 1995)

Dvojvrstvové a trilaminárne neuróny. Somy týchto buniek sa nachádzajú v *stratum pyramidale* a v *stratum oriens*, získavajú vstupy zo Schafferových kolaterálov. **Dvojvrstvové**

bunky majú multipolárne dendrity bez dendritických výbežkov a axóny siahajúce cez *stratum oriens* až do časti *stratum radiatum* (Buhl et al., 1996).

Dendrity trilaminárnych neurónov zasahujú do *stratum oriens* a dominantnejšie sú dendrity distálneho segmentu. Ich soma je charakteristicky veľká a axóny prechádzajú cez *stratum pyramidale* smerom k proximálnej vrstve, *stratum radiatum*. Trilaminárne neuróny sú aktivovateľné stimuláciou fimbrií (Freund & Buzsaki, 1996)

Neuróny s axónmi a dendritmi v *stratum radiatum*. Telá týchto neurónov sú lokalizované v *stratum radiatum* a s. *pyramidale*, z ktorých niekoľko dendritov prechádza do *stratum radiatum*. Morfológia neurónov môže nadobudnúť multipolárny, hviezdicovitý vzhľad. S pyramidálnymi bunkami vytvárajú symetrické synapsie na proximálnych a distálnych dendritických výbežkoch (Freund & Buzsaki, 1996).

Interneuróny v *stratum lacunosum moleculare* , telá neurónov týchto buniek, ako aj vyplýva z ich pomenovania, sú lokalizované vo vrstve *stratum lacunosum moleculare*, no môžu sa objaviť aj v hraničnom pásme s vrstvou *stratum radiatum*. Dendritickú korunu majú z pohľadu morfológie dvojito vetvenú a husto prerastenú. Niektoré dendrity môžu zasahovať až do *stratum moleculare* v *gyrus dentatus*. Dendritické koruny neurónov, sú bez dendritických trňov, s charakterom křčovitého vzhľadu. Axóny buniek vychádzajú z tela neurónu alebo proximálneho dendritu. Podobne, ako dendrity, môžu zasahovať až do oblasti *gyrus dentatus*. S pyramidálnymi neurónmi formujú symetrické synapsie vo vrstvách *stratum lacunosum-moleculare* a *stratum radiatum* (Freund & Buzsaki, 1996) .

V rôznej literatúre sa často uvádzajú rozdelenia na základe expresie určitých typov proteínov a tiež sa môžu používať rovnaké názvy, pre rôzne typy interneurónov. O pomenovaní rozhoduje aj autor článku a preto, klasifikácia hipokampálnych neurónov môže byť nejasná a rôznorodá (Wheeler et al., 2015).

3 Vznik akčného potenciálu v neuronálnych bunkách schopných excitácie

Dôležité experimenty, ktoré popisujú elektrofyziológické vlastnosti neuronálnych buniek vykonali známi experimentátori Hodgkin a Huxley technikou „voltage clamp“, ktorá im umožnila charakterizovať napät'ové zmeny na neuronálnej membráne. K svojej práci využili gigantický axon, pochádzajúci z Kalamára obyčajného (*Loligo forbesi*) (Häusser, 2000 ;Schwiening, 2012). S rozvíjajúcimi sa technikami sa otvárali možnosti pre experimentátorov aj v iných oblastiach. Johan F. Storm v roku 1987 popísal elektrofyziológickú aktivitu pyramídálnych neurónov v hipokampálnej oblasti CA1 a charakterizoval jednotlivé neuróny podľa ich fenotypových vlastností.

Kľudový membránový potenciál neurónov v CA1 sa pohybuje v rozmedzí od -60 až -70mV, hodnota prahu akčného potenciálu je pri -40 až -50 mV a amplitúda akčného potenciálu je v okolí 100mV. Jednotlivé akčné potenciály nervovej bunky vznikajú ako dôsledok sumácie určitého počtu EPSP (excitačné postsynaptické potenciály) prichádzajúcich zo synapsíí dendritických trňov ako „high threshold bursting“ alebo priamo zo somy bunky somatickým aktivačným prúdom ako „low threshold bursting“ potenciály. Súčasťou akčného potenciálu sú charakteristické vlny hyperpolarizácie („AHP – after – hyperpolarisation“) a depolarizácie („ADP – after – depolarisation“). Vlna AHP môže nadobudnúť charakter rýchly, priemerný a pomalý. Na repolarizácii a hyperpolarizácii sa podieľa niekoľko rôznych Ca-dependentných a prechodných K^+ prúdov/kanálov. Storm rozdelil K^+ kanály do 3 skupín: **1. rýchlo sa aktivujúce, neinaktivovateľné I_K , 2. rýchlo prechodné prúdy a 3. pomalé, neinaktivovateľné prúdy I_{ahp}** (Storm, 1987).

Expresia rôznych typov kanálov v neurónoch, je jeden z faktorov, ktoré následne ovplyvňujú aktivitu jednotlivých neurónov (O'Keefe & Lynn Nadel, 1978).

3.1 Iónové kanály

Vlastnosť neurónov udržať si kľudový membránový potenciál je umožnená expresiou konkrétnych typov iónových kanálov a Na/K- ATPázovej pumpy, čím má bunka zabezpečený vtok a výtok iónov pre udržanie „steady state“ módu. Membrána vytvára pre ióny odpor a vzťah, ktorý zohľadňuje odpor membrány a prestup iónov vo forme elektrického prúdu je vyjadrený Ohmovým zákonom:

$$V = I \times R$$

V= rozdiel napätia medzi intra a extracelulárnym prostredím

I= elektrický prúd generovaný iónmi presúvajúcimi sa cez membránu

R= odpor membrány

Prechod bunky zo stavu kľudového membránového potenciálu do stavu pálenia akčných potenciálov je umožnený expresiou primárne sodíkových, draslíkových a vápnikových kanálov.

3.2 Napät'ovo riadené kanály pre ióny sodíka

V angličtine pomenované, ako voltage gated sodium channels (VGSC) sú typy kanálov, ktoré obsahujú vo svojej štruktúre pór, prestupný len pre ióny Na^+ . Sú exprimované na povrchu všetkých excitabilných buniek a zodpovedné za transport Na^+ iónov do bunky. Radia sa medzi najdôležitejšie kanály, ktoré sú nevyhnutné pre fungovanie neurónov a prispievajú tak k správnej fyziologickej funkcii bunky (Corry & Thomas, 2012).

3.3 Napät'ovo riadené kanály pre ióny draslíka

Nachádzajú sa vo všetkých žijúcich organizmoch. Sú vysoko selektívne a nachádzajú sa vo všetkých bunkách, vrátane neurónov. Vysoká selektivita pre ióny draslíka je najdôležitejšia pre zachovanie rovnovážneho membránového potenciálu a to z pohľadu vstupujúcich aj vystupujúcich iónov, medzi intracelulárnym a extracelulárnym prostredím. Selektivita kanálu je zachovaná špecifickým aminokyselinovým zložením, ktoré formuje iónový selektívny filter v iónovom póre (Kim & Nimigean, 2016).

3.4 Napät'ovo riadené kanály pre ióny vápnika

Vápnikové kanály majú dôležitú funkciu v prepúšťaní iónov do intracelulárneho prostredia. Ióny vápnika následne v intracelulárnom prostredí umožňujú množstvo dôležitých funkcií ako sekundárny poslovia a spolupodieľajú sa na riadení fyziologických funkcií, ako je napr. uvoľnenie neurotransmiterov. Participujú aj na zmenách synaptickej aktivity, vývoji neurónov, génovej expresii a ovplyvňujú senzitivitu, kinetiku, aktiváciu /inaktiváciu a rôzne ďalšie vlastnosti vlastného kanálu (McCormick, 2014).

3.5 Sodno-draselná pumpa

Dôležitým faktorom pre následné udržanie kľudového membránového potenciálu, je udržovanie gradientu pre K^+ a Na^+ ióny. Gradient iónov je zabezpečený činnosťou Na/K-

ATPázy, primárnej aktívnej iónovej pumpy, ktorá je ubiquitne exprimovaná v plazmatickej membráne všetkých buniek (Wright, 2004).

Práca pumpy je stimulovaná intracelulárnou koncentráciou sodných iónov, ktoré prenáša do extracelulárneho priestoru a ióny draslíka späť do bunky. Práca je umožnená za pomoci hydrolýzy ATP (adenozíntrifosfát). Na 2 ióny K^+ je schopná preniesť 3 ióny Na^+ . Z dôvodu nerovného transportu iónov práca pumpy generuje hyperpolarizujúci prúd a teda má schopnosť byť elektrogénna. Na / K-ATPáza pozostáva z dvoch podjednotiek, α a β , ktoré sú vo forme tetraméru 2 ($\alpha\beta$). Pracuje v dvoch stavoch, ktoré sú zodpovedné za odkrývanie väzobných miest do intra a extra celulárneho priestoru. Konformačné zmeny umožňuje fosforylácia a defosforylácia proteínu (Skou & Esmann, 1992).

3.6 Chemický prenos informácie medzi neurónmi

Prechod signalizačných molekúl, ako sú neurotransmitery, medzi nervovými bunkami, umožňujú chemické synaptické spojenia medzi neurónmi. Na jednotlivých synapsiách vzniká spevnená proteínová mriežka (post synaptic density, PSD), ktorá vo svojej štruktúre organizuje množstvo receptorov, iónových kanálov, enzýmov a signalizačných molekúl, husto koncentrované a fixované v danom mieste synapsie (Pawson & Scott, 1997).

Hlavným excitačným neurotransmitterom v CNS je aminokyselina glutamát. Glutamát je zodpovedný za aktiváciu glutamátových receptorov, ktoré delíme na dva typy, a to ionotropné a metabotropné. Hlavné excitačné ionotropné receptory sú NMDA, AMPA a Kainátové. Metabotropné receptory delíme do troch skupín, mGluR I. - III. Tieto receptory sú difúzne rozmiestnené po povrchu neurónových buniek (Tanabe et al., 1992).

Vlnou depolarizácie dochádza k výlevu neurotransmitterov z presynaptického na postsynaptický neurón. Aktiváciou Kainátových a AMPA receptorov na synaptických spojeniach neurónov vznikne rýchla odpoveď neurónu vo forme depolarizácie a rýchleho pálenia akčných potenciálov. Odpoveď NMDA receptorov na glutamát je pomalšia v porovnaní s AMPA a kainátovými receptormi. NMDA receptory majú v napäťovo senzitívnom iónovom póre Mg – blokádu, no ich priepustnosť pre ióny vápnika je podstatne vyššia v porovnaní s AMPA a Kainátovými receptormi. Receptory sa otvárajú približne 10 ms po uvoľnení glutamátu do synaptickej štrbiny a ostávajú otvorené približne 400ms, kým glutamát disociuje od receptoru (Béhé et al., 1999; Scannevin & Huganir, 2000).

Aktiváciou mGluR I metabotropných glutamátových receptorov je aktivovaná signalizačná dráha G-protein receptorov (GPCR). Signalizačná kaskáda zahrňujúca enzymatické reakcie pomocou proteinkinázy CB (PKC_β) a inozitoltrisfosfát (IP_3) sprostredkuje

výlev iónov vápnika z endopolazmatického retikula. Signalizácia metabotropnými receptormi je najpomalšia. (Hermans & Challiss 2001).

Hlavným inhibičným neurotransmitterom v CNS je kyselina GABA, ktorá sa primárne viaže na receptory ionotropného typu GABA_{A,C} a metabotropného typu GABA_B.

Aminokyselina glycín sa viaže na pentamérny ionotropný receptor zložený z podjednotiek α a β . Dlhé nervové dráhy vychádzajúce zo septa alebo entorinálnej kôry smerom do hipokampu sa podieľajú na inhibícii hipokampálnych pyramidálnych neurónov (Melzer et al., 2012).

GABAergné neuróny v oblasti hipokampu, sú navzájom prepojené v priebehu celej oblasti.

Niektoré typy interneurónov, ako sú napríklad basket cells, bistratified cells, ale aj neuroglie, dokážu inhibovať samé seba cez autapsie (Kunkel et al., 1988; Pawelzik et al., 2003).

Zaujímavé na GABA_A receptoroch je, že pravdepodobne, ako AMPA receptory, cirkulujú formami endocytózy, exocytózy a prechádzajú signalizačnými dráhami medzi synapsiou a vnútorným prostredím bunky. GABA_A receptory, podobne ako AMPA, podliehajú fosforylácii receptora za pomoci enzýmov PK (proteínkináz) a môžu sa priamo viazať s PKC (proteínkináza C). PKC je zodpovedná za fosforyláciu podjednotky β , ktorá má pre receptor modulačnú funkciu (Moss & Smart 2001).

3.7 Narušenie synaptickej komunikácie v patológii Alzheimerovej choroby

Medzi hlavné patologické znaky Alzheimerovej choroby patrí intracelulárna a extracelulárna akumulácia nerozpustných proteínov. Prvým je rozpustná a nerozpustná forma β -amyloidových peptidov, ktoré sa hromadia do formy extracelulárnych plakov. Druhým je hyperfosforylovaná forma Tau proteínu, ktorý agreguje do formy neurofibrilárnych kľbiek (NFTs, „neurofibrillary tangles“) (Braak & Braak, 1991).

Dôsledkom nadmerného hromadenia oboch nerozpustných foriem proteínov, je úbytok neuronálnych buniek a narušená synaptická aktivita. Ochorenie je charakterizované primárne stratou kortikálnych a hipokampálnych cholinergných neurónov, ale pozorovaný bol tiež úbytok magnocelulárnych neurónov v oblasti *pars basalis telencephali* (Whitehouse et al., 1982), degenerácia serotonergných neurónov (5-HT) v *nucleus Raphe magnus* a noradrenergných (NA) neurónov v *locus ceruleus* (Marcyniuk et al., 1986; Grudzien et al., 2007).

Predpokladá sa, že hromadením β -amyloidových oligomérov nastáva znižovanie množstva dendritických výbežkov s následným narušením glutamátergnej signalizácie pyramidálnych neurónov (Hsieh et al., 2006). Pravdepodobne sa ako kompenzačný mechanizmus zníženia synaptickej aktivity, aktivuje zvýšená sekrécia glutamátu s nadmernou aktiváciou NMDA receptorov, čo vedie k excitotoxickému efektu (Rudy et al., 2015) s následnou internalizáciou glutamátových NMDA a AMPA receptorov, čím dochádza k redukcii dendritických výbežkov a zníženiu synaptického prenosu (Almeida et al., 2005; Snyder et al., 2005; Hsieh et al., 2006).

Na zvieracích modeloch pre Alzheimerovu chorobu bolo zistené, že neuróny v blízkosti β -amyloidových plakov vykazujú zvýšenú až masívnu hyperaktivitu. Hyperaktivita je definovaná ako zvýšená incidencia pálenia akčných potenciálov. U transgénnych myší s mutáciou APP, sa priamo v hipokampálnej podoblasti CA1 mení pomer tichých a hyperaktívnych pyramidálnych neurónov v blízkosti plakov. Dendrity hyperaktívnych neurónov dosahujú zníženú denzitu dendritických výbežkov, sú kratšie a ich povrchová veľkosť je menšia (Busche et al., 2012; Busche et al., 2015).

Predpokladá sa, že práve redukcia plochy bunkového povrchu má vplyv na elektrickú kapacitu, zmenu vodivosti a zväčšenie dendritickej konštanty. Morfologickými zmenami sa teda prenos signálu stáva efektívnejší a dendritický synaptický input je menej náchylný k narušeniu. Neuróny kompenzujú zvýšený odpor tým, že zvýšia frekvenciu pálenia akčných

potenciálov, aby dokázali vytvárať „bursting“ frekvencie aj napriek nižšiemu počtu aktivovaných synapsií (Šišková et al., 2014).

K zvýšenej neuronálnej aktivite dochádza pravdepodobne skôr, ako sa plaky formujú. Injekčnou aplikáciou inhibítora γ -secretázy sa znížila incidencia pálenia akčných potenciálov tým, že sa znížili množstvá solubilných oligomérov β -amyloidu. V prípade lokálnej aplikácie solubilného β -amyloidu kontrolným myšiam bez patológie bol potvrdený nález hyperaktívnych neurónov práve v oblasti aplikácie (Busche et al., 2015).

Detailný vzťah medzi formami proteínu Tau a rôznymi formami β -amyloidu nieje dostatočne preskúmaný, no rovnako ako β -amyloid aj Tau svojou prítomnosťou alebo neprítomnosťou ovplyvňuje signalizačné dráhy formovania rôznych typov pamäti. Expresia skrátených foriem Tau proteínu v myšacom modeli pre AD, zlepšila priestorovú orientáciu v teste T bludiska. Mechanizmus zlepšenia pravdepodobne súvisí so zníženou fosforyláciou NR2b podjednotky receptora NMDA a anti-excitotoxickým efektom navodeným proteínom Fyn. Pri skrátenej forme Tau proteínu sa zredukovalo množstvo Fyn, čím sa znížila fosforylácia receptora a nastala destabilizácia medzi NR2b a PSD-95 (Ittner et al., 2010).

Narušené synapsie a internalizované glutamátové receptory, ktoré sú nevyhnutné pre prenos informácie a zvyšujúce sa množstvo oligomérov β -amyloidu a Tau, majú za následok chronickú aktiváciu signalizačných dráh pre LTD. Tá sa stáva patofyziologickým mechanizmom pre zníženie množstva synapsií v hipokampe (Selkoe, 2008).

4 Formovanie deklaratívnej, explicitnej pamäti

Explicitná pamäť znamená na hipokampe závislé učenie pre fakty (v prípade sémantickej pamäti) alebo situácie (v prípade epizodickej), ktoré vyžadujú plné vedomie. Hipokampus je multimodálny (napríklad, hipokampálno- entorinálna slučka (Iijima et al., 1996)) a prijíma informácie z príľahlých štruktúr, s ktorými je anatomicky prepojený. Prijaté informácie sú následne využité pre vznik asociovaných neuronálnych sietí.

Pomocou rôznych elektrofyziologických prístupov, ako sú napríklad technika extracelulárneho nahrávania neurónov alebo technika patch clamp je možné experimentálne vyhľadať konkrétne neuróny, ktoré sú súčasťou asociačných sietí a študovať zmenu ich aktivity. Z experimentálnych pozorovaní aktivít neurónov následne skladáme vedecké hypotézy o tvorbe a fungovaní neuronálnych sietí a ich správaní, ktoré nám dávajú základ pre zložitejšie predpoklady, ako je vznik a formovanie rôznych foriem pamäti.

Tvorba asociovaných neuronálnych sietí súvisí s procesmi učenia a synaptickou plasticitou. Jedným z najviac popísaných princípov synaptického učenia je učenie na základe Hebbovho princípu, ktorý hovorí o potenciácii synapsií, medzi aktívnym presynaptickým neurónom a silne depolarizovaným postsynaptickým neurónom. A preto skupiny synapsií, ktoré sú koordinovane aktívne v rovnakom čase a prispievajú spoločne k depolarizácii konkrétneho postsynaptického neurónu, budú zosilnené. Hebbov princíp poskytuje podporný mechanizmus pre spájanie neuronálnych ansámblov (zostava konkrétnych neurónov) a tým pre formovanie pamäťových engramov, ako je aj napríklad, reprezentácia prostredia (Hebb, 1949; Kandel et al., 2014).

Fyziologickým pokladom Hebbovho princípu je dlhodobá synaptická potenciácia LTP, široko akceptovaná teória učenia a formovania pamäti na synaptickej úrovni. Počas potenciácie hrajú dôležitú rolu AMPA a NMDA receptory na glutamátergných postsynaptických neurónoch (Collingridge et al., 1983; Collingridge et al., 1998) . Experimentálnym vyblokováním receptorov vzniká deficit vo formovaní pamäťových engramov (Kessels & Malinow , 2009; Mitsushima et al., 2011).

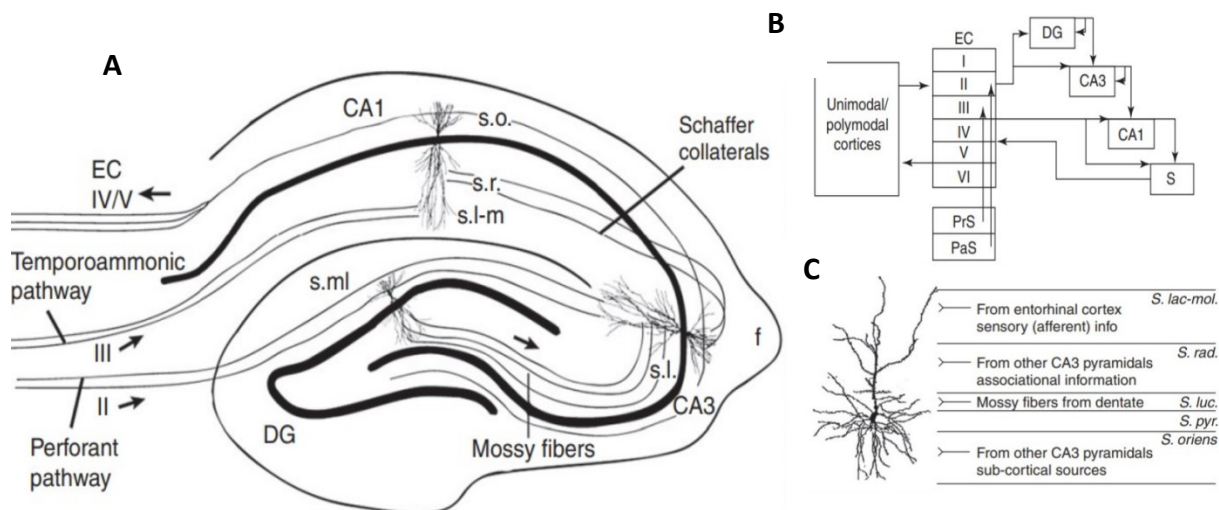
Aktiváciou NMDA receptorov, uvoľnením Mg^{+} blokády v iónovom kanáli, dochádza k silnému postsynaptickému influx Ca^{++} iónov označovaných ako „second messengers“, ktorých úlohou je aktivovať širokú paletu signálnych dráh s účasťou aktívnych foriem enzýmov. Z pohľadu enzymatickej aktivity sú najčastejšie spomínané napríklad, calmodulin-závislá proteinkináza II(CaMKII)(Lisman et al., 2012), proteinkináza C (PKC) (Hu et al., 2007), proteinkináza A (PKA), mitogénom aktivovaná proteinkináza (MAPK) (Adams & Sweatt,

2002). Reťazovými procesmi sa posilňuje LTP a jej stabilita. Aktivované signalizačné dráhy môžu byť ovplyvnené modulačnými mechanizmami, ktoré vyvolávajú látky, ako sú napríklad dopamín (Frey et al., 1991) alebo serotonín (Chain et al., 1995; Schmidt et al., 2017).

Potenciácia synapsií nieje závislá len na kaskádovom mechanizme NMDA-dependentnom LTP. Napríklad v prípade machových vlákien je mechanizmus NMDA-nezávislý, postavený na stimulácii expresie synaptických proteínov (rast „thorny excrescences“) a zväčšovaní synapsií na proximálnych dendritoch (otestované po farmakologickej inhibícii, benzodiazepínmi) (Lee et al., 2013).

Synaptickú aktivitu a jej potenciáciu je možné experimentálne odsledovať pomocou vyhľadávania skorých foriem génových transkripcií, ako sú napríklad gény c-Fos (Greenberg et al., 1986) a Arc (Lyford et al., 1995), patriacich do skupiny okamžitých ranných génov. Gény svojou expresiou poukazujú na zvýšenú neuronálnu aktivitu v danom momente, ktorá sa využíva ako marker aktívnych synapsií. Ich expresia je aktivovaná signálnou dráhou pomocou mediátorov Ca^{++} , cAMP (cyklický adenosín monofosfát) (Gilman, 1995), MAP-kináz, ERK a s plasticitou spájaný BDNF (brain derived neurotrophic factor) (Kang & Schuman, 1995) a transkripčný faktor CREB1 (cAMP responsive element binding protein 1) (Kenedy, 1989). Zložitú kaskádu génových aktivácií vo svojej popisnej práci spracovali Steven Flavell a Michael Greensberg z Harvardskej univerzity (Flavell & Greenberg, 2008).

Pomocou funkčnej zobrazovacej techniky bolo zistené, že významná úloha hipokampu vo vzťahu k epizodickej pamäti a vytváraniu pamäťových engramov nieje časovo regulovaná len pre nové engramy. Hipokampus sa priamo zúčastňuje vytvárania, reaktivácie spomienok, ako aj ich opätovnej konsolidácie (Cabeza & Jacques, 2007). Jeho poškodením, následne dochádza k narušeniu pamäti, či už retrográdnej alebo anterográdnej, v závislosti od veľkosti poškodenia (McClelland et al., 1995). Hypoteticky, na základe doterajších zistení predpokladáme, že opätovne vybavená spomienka je posilnená vytvorením novej, hipokampálnej kódujúcej siete. Na základe teórie o konsolidácii by mohlo byť pravdepodobné, že vytvorenie posilnených sietí už neprebíha len v hipokampe ale aj v oblastiach neokortexu. Takto posilnené (znásobené) engramy, by mohli byť preto menej náchylné na narušenie alebo poškodenie, ak by nastalo poškodenie hipokampu, v porovnaní s novými. Teórie by mohli byť podložené existenciou retrográdnej a anterográdnej amnézie (Zola-Morgan et al., 1986), prípadne experimentami s hipokampálnymi léziami u potkanov (Goshen et al., 2011; Einarsson et al., 2015). Narušením hipokampálnej štruktúry a exterohipokampálnych oblastí vzniká rovnako, ako v prípade hipokampu, pamäťový deficit rôzneho rozsahu v závislosti od poškodenia.



Obrázok 4:(A) Prepojenie hipokampálnej štruktúry z entorinálnej kôry(EC) do hipokampálnej podoblasti dentálneho gyru(DG), ďalej cez machové vlákna do podoblasti CA3 a následne cez Schafferovy kolaterály do CA1. (B) grafické znázornenie prepojenia hipokampálnej štruktúry s konkrétnymi podoblasťami entorinálnej kôry.(C)Princípálny neurón hipokampálnej podoblasti CA3 s vrstvami (stratum lacunosum-moleculare; stratum radiatum; stratum oriens; stratum lucidum) do ktorých vedú prepojenia z DG, EC a CA3 (Vago et al., 2014).

4.1 Neuróny miesta „place cells”, navigačný systém a priestorová orientácia u zvierat a ľudí

Na rozdiel od ľudí, experimentálnych zvierat sa nevieme opýtať na ich spomienky o udalostiach z rôzneho miesta a času. Preto pre štúdium epizodickej pamäti u zvierat, využívame ich priestorovú orientáciu, ktorá sa najviac podobá na epizodickú pamäť ľudí. Pre štúdium kontextovo závislého učenia využívame neuróny hipokampu pomenované ako neuróny miesta („place cells“), ktorých aktivita je viazaná na konkrétne miesto v priestore. Prvé zmienky o neurónoch miesta pochádzajú z práce J. O'Keefa a J. Dostrovského, ktorí v roku 1971 operačne zaviedli elektródové implantáty experimentálnym potkanom s cieľom extracelulárneho nahrávania signálu (jednotkovej aktivity neurónov) z hipokampálnej podoblasti CA1. Z nahraného záznamu následne popísali aktivitu jednotiek (neurónov). Experimentom spozorovali, že aktivita niektorých jednotiek bola u potkanov priestorovo modulovaná a úzko súvisela s polohu potkana v testovacej aréne. Aktivita jednotiek teda reprezentovala vnútornú kognitívnu mapu, o ktorej predpokladáme, že umožňuje priestorovú orientáciu (O'Keefe & Dostrovsky, 1971). Prirodzená vlastnosť týchto buniek je preto dlhodobo využívaná pre výskum dynamických neuronálnych sietí a priestorových reprezentácií. Ich lokalizácia je v oblasti hipokampu, ale aj v extrahipokampálnych oblastiach,

ktoré sú s hipokampom úzko prepojené, napríklad subikulum (Barnes et al., 1990) mediálny a laterálny entorhinálny kortex (Quirk et al., 1992) oblasti neokortexu (Esteves et al., 2021), vizuálnej kôry (Saleem et al., 2018), jadrá rostrálneho talamu (Jankowski et al., 2015) a v striate (Wiener, 1993). Vstupné informácie formujúce komplexnú hipokampálnu reprezentáciu priestoru sú zložené z aktivít neurónov so špecifickými vlastnosťami. Medzi tieto neuróny ďalej radíme neuróny smeru hlavy („head direction cells“)(Ranck, 1984), mriežkové neuróny („grid cells“)(Fhyn et al., 2004), neuróny rýchlosti („speed cells“)(Kropff et al., 2015), neuróny hranice („border cells“)(Saveli et al., 2008) a iné. Aktivita neuronálneho systému formuje našu schopnosť navigácie a vytvorenie epizodickej pamäti (Burgess et al., 2002). Hipokampus umožňuje spracovanie mnohodoménových informácií, ako sú napríklad pohyby tela alebo končatín s aktivitou buniek miesta v danom mieste určitého priestoru (place field). Rovnako sa hipokampom utilizuje informácia o vzdialenosti od konkrétneho bodu v priestore a rýchlosti vykonaného pohybu. Vytvorená priestorová orientácia nám ponúka kontext, na základe ktorého meníme naše správanie. Na daný priestor si vytvárame kontextuálnu spomienku, resp. mapu prostredia, uloženú ako pamäťová stopa (McNaughton et al., 1996).

Pomocou utilizovaných informácií, ktoré hipokampus a jeho prepojené štruktúry spracovávajú opakovane, v čase, bez ohľadu na statické, alebo dynamické prejavy tela, vzniká integrovaná sieť, ktorá dáva základ pre teóriu tzv. integrátora dráhy „path integrator“. Samsonovich spolu s McNaughtonom vo svojej práci definujú integrátor ako koncept, ktorý zahŕňa niekoľko nevyhnutých informácií. Sú nimi fyzická, referenčná lokalizácia vo vzťahu k priestoru, smer k referenčnému bodu, vzdialenosť, čas a výpočet rýchlosti prejdenej trasy, od referenčného bodu. Pre pocitové „precítenie“ získaných informácií vo svojej práci, ďalej popisujú nevyhnutnosť dvoch základných vlastností organizmu, ktorými sú 1. interná reprezentácia planárnych koordinátov získavaných pomocou exteroceptívnych stimulov a 2. mechanizmus ich neustálej kontroly a obnovy aktivovaný spomenutou idiotetickou informáciou (Samsonovich & McNaughton, 1997). Pre idiotetickú navigáciu sú exteroceptívnymi stimulmi vizuálne (optický tok), vestibulárne a proprioreceptívne. Pomocou senzorov vnímame vzdialenosť, hĺbku, zvuk prostredia, rotáciu, akceleráciu, povrch, pohyby končatín (Etienne & Jeffery, 2004). Zmysly sú preto nevyhnutným prostriedkom slúžiacim k orientácii.

Komunikácia neuronálnych buniek, vytváranie veľkých a malých komunikačných jednotiek, vedie k teórii atraktorovej neuronálnej siete. Akým spôsobom si vieme priestorovú mapu zapamätať a opätovne vyvolať v priestore, ak doň vstúpime opätovne? Dynamická sieť komunikačných jednotiek - neurónov, posilnená Hebbovým princípom, vytvára atraktor, ktorý

je modelom komunikácie neuronálneho systému a predstavuje integrovaný okruh. Integrované okruhy majú energeticky stabilnú aktivitu v ich bazálnom stave, takýto stav je významný pre efektívnosť komunikácie, bez väčšej spotreby energie (Hopfield, 1982). Výhodné prostredie udržania informácie sa pripisuje špecifickej architektúre neuronálnej siete, v ktorej sú jednotlivé neuróny prepojené tzv. synaptickými kolaterálmi. Pozorujeme ju v oblastiach neokortexu a hipokampálnej podoblasti CA3. Architektúra umožňuje reaktiváciu uloženého vzorca a opätovné vyvolanie spomienky (Hasselmo et al., 1995). V teórii atraktorov sa popisujú dva typy atraktorových sietí. Prvým typom je diskretná atraktorová sieť, ktorá je schopná odolať malým zmenám senzorických vstupov, ale na veľké stimuly reaguje koherentne. Druhým typom je neustále sa meniaci sieť, ktorej zmena aktivity je neustála, pomalá a postupná, závislá od času a polohy v priestore. (Samsonovich & McNaughton, 19997). Ak opätovne vstupujeme do prostredia, ktoré nám je známe, nastane situácia, kedy sú exteroceptívne stimuly spracované a hipokampom prijaté informácie aktivujú neuróny atraktorových sietí. Predpokladáme, že následne dochádza k dvom hypotetickým procesom. Prvý je pomenovaný ako proces separácie „pattern separation“, ktorý je primárne viazaný na bunky v oblasti *gyrus dentatus*. Podoblasť hipokampálnej štruktúry je charakteristická riedkym zastúpením granulórných neurónov a s podoblasťou CA3 je prepojená riedkou sieťou machových vlákien (Leutgeb et al., 2007). Mapa prostredia by pravdepodobne mohla byť najskôr dekodovaná bunkami *Gyrus dentatus* a ak je mapa prostredia známa, granulórne bunky cez sieť machových vlákien aktivujú neuróny v CA3, kde následne dochádza k procesu, pomenovanom ako proces ukončenia „pattern completion“, ktorým sa reaktivuje už nadobudnutá priestorová mapa, kódovaná atraktorovou sieťou v CA3 (Rolls & Treves, 1998; Rolls, 2013).

Priestorová aktivita neurónov miesta je pomenovaná ako place field, ktorý vyjadruje frekvenčnú závislosť k receptívnej zóne bunky. Aktivovaná populácia buniek následne vyjadruje reprezentáciu priestoru. Aktivita buniek je maximálna v približnom strede receptívnej zóny a klesá úmerne so vzdialenosťou od potenciálneho stredu. Aktivita jedného neurónu je teda v danom mieste place field rozdielna (Muller, 1996). Hipokampálne neuróny niesú topograficky rozmiestnené ako neuróny senzorickej alebo motorickej kôry. Vzťah medzi hipokampálnymi bunkami a ich place fields je závislý od faktorov, ktoré zatiaľ niesú úplne objasnené, no neuróny miesta označujúce určitú prvú place field a neuróny miesta, ktoré označujú druhý, susedný place fields nemusia byť susediacimi neurónmi v hipokampe (Dombeck et al., 2010).

Zaujímavosťou je pálenie neurónov miesta na lineárnej dráhe. Aktivita buniek, vyhodnotená na základe analýz pre jednotlivé place fields vykazuje smerovú rozdielnosť. Znamená to, že aktivita neurónov miesta označujúcich pozície, ktoré reprezentujú priestor len v jednom smere a to pozdĺž trajektórie z bodu A do bodu B, je do určitej miery rozdielna v porovnaní s aktivitou opačného smeru z B do A (McNaughton et al., 1983). Smerová špecificita ale nie je podmienkou každého neurónu a každého prostredia. Smerovo špecifické neuróny musia vykazovať stabilnú aktivitu počas celej doby pobytu na lineárnej dráhe. V inom prostredí, napríklad kruhovom, sa smerová špecificita nevytvára.

Rola hipokampu v procese tvorby kognitívnej mapy a navigácie bola a aj je skúmaná viacerými prístupmi- inaktiváciou, stimuláciou a nahrávaním (Eichenbaum, 2017). U zvierat je štúdium priestorovej orientácie a vytvárania či degradácie pamäťových engramov, zamerané na zmeny ich správania použitím vhodných behaviorálnych metód, ktoré sú následne korelované s ich aktivitou neurónov. Najčastejšia využívaná paradigma, pre testovanie orientačných vlastností, je test otvoreného poľa, v ktorom experimentálne zvieratá vyhľadávajú odmeny vo forme chutného jedla. Hľadanie odmeny môže byť uskutočnené rôznymi spôsobmi, ktorých cieľom je motivovať zviera k pohybu. Zviera následne náhodne pobehuje v priestore, kým sa k odmene nedostane, alebo hľadá odmeny senzoricky, napríklad podľa zraku či čuchu. Pre elektrofyziológické merania sa využíva minimalistický prístup, formou otvoreného poľa a lineárne dráhy.

V najväčšej miere sú pre analýzu priestorovej orientácie a testovanie pamäti využívané neuróny miesta. Dôležité je ale spomenúť, že špecifická aktivita neurónov miesta nemusí signalizovať len polohu v priestore. Emma Wood vo svojej práci z roku 1991 jednoduchým diskriminačným pokusom (matching/non-matching) zistila, že určitá populácia nahraných neurónov z podoblastí CA1 a CA3 počas behaviorálnej úlohy signalizovala súčasne aj polohu (zmena pozície pohárika) aj vôňu (zmena vône v pohárik). Experimentom poukázala na paralelnú aktivitu neurónov, ktorých aktivita nebola špecifická len pre polohu v priestore (Wood et al., 1991).

Ko-aktivita neurónov, ktoré reagujú na rôzne senzorické vstupy, ako sú vôňa či textúra povrchu, konkrétne polohy v priestore, alebo smer, či rýchlosť pohybu, vytvára komplexnú reprezentáciu o priestore a jeho súradnicovej kvalite a ďalších vlastnostiach. Všetky senzorické vstupy sú nápomocné pre vytvorenie mapy prostredia, za účelom získania všetkých potrebných detailov, pre presnú orientáciu v ňom.

4.2 Testovanie deklaratívnej pamäti zvierat formou orientácie v priestore experimentálneho bludiska

Počas navigácie priestorom, sú najčastejšie využívané dva spôsoby, akými sa rozhodujeme pri navigácii z bodu A do bodu B. Prvý z nich je alocentrický, tiež popisovaný ako priestorová navigácia, resp. navigácia priestorom. Ide o spôsob, počas ktorého sú využívané vzdialené nápomocné orientačné značenia (landmarks). Tým druhým spôsobom je egocentrická navigácia, ktorá nieje závislá od vizuálneho senzorického vstupu, no využívaný je napríklad hmat. Počas egocentrickej navigácie je pre orientáciu využívaná propiocepcia, vestibulárny systém, uhlové zmeny (idiotetické vstupy). Navigácia je preto primárne riadená pohybmi tela, no môže byť využitý aj sklon cesty alebo jej povrch. Vyhľadávanie a pamätanie si tých správnych ciest je pre zvieratá dôležité pre prežitie, či už to je cesta k zdroju potravy, alebo pre pamätanie si nebezpečenstva vo voľnej prírode. Vlastnosti sa využívajú v kognitívnych testoch pre modelové organizmy rôznych neurodegeneratívnych ochorení, ako je aj Alzheimerova choroba (Vorhees & Williams, 2014).

Počas testovaní sa využívajú rôzne technické prostriedky, či už materiály na zostavenie bludísk, vytvorenie orientačných značiek alebo rôzne typy svetiel. Využívajú sa aj rôzne formy vôní a jedla, ako chutnej odmeny, ktorými sú zvieratá motivované sa v bludisku neustále pohybovať. Na zaznamenanie správania zvierat a pohybov je kamera pripojená k softvérovým aplikáciám, ktoré sú dnes programované na špecifické požiadavky laboratória. Celý nahrávací setup je zostavený z niekoľkých modulov, ktoré je možné meniť a prispôbovať podľa potreby pre jednotlivé experimenty.

4.2.1 Najčastejšie využívané testy priestorovej orientácie

Prvým z najčastejšie využívaným testom pre otestovanie zníženia/zlepšenia kognitívnych vlastností zvierat, je Morrisove vodné bludisko. Bludisko bolo navrhnuté Morrisom v roku 1981 a využívané je dodnes. Bludisko má tvar kruhového bazéna naplneného vodou a platformy, ktorá je ponorená do vody. Platforma môže byť polohovateľná do viacerých svetových strán, jej poloha môže byť označená dobre viditeľným predmetom. Zvieratá sa v bludisku prejavujú únikovým chovaním, ktoré je riadené použitím rôznych stratégií pre vyhľadanie platformy. Prvou je alocentrická navigácia s využitím vzdialených vizuálnych značiek, umiestnených na viditeľných miestach. Zvieratá dokážu vnímať a spracovať ucelené priestorové konštalácie, definujúce daný priestor. Konšteláciu priestoru následne aplikujú do procesu rozhodovania. Ďalším spôsobom, menej efektívnym, je navigácia

na základe zapamätaných pohybov tela, podobne ako pri egocentrickej navigácii. Zviera si následne pamätá, koľkokrát zatočilo vpravo alebo vľavo a zapamätané pohyby mu umožňujú vyhládať platformu. Počas testu preto využívame striedanie štartovacej pozície (západ, východ, sever, juh bazéna) aby sme zabránili egocentrickej navigácii, inak by bol test nezávislý od hipokampu. Počas testu sa porovnávajú rôzne parametre, najčastejšie to môžu byť čas, za aký bola objavená platforma (Q-time) ktorý podá informáciu o časovej dobe, ktorú hlodavec strávil hľadaním platformy len v určitom kvadrante bazéna, celkový čas strávený vo vode, smer natočenia hlavy a plávania, počet preplávania ponad platformu, dĺžka doby počas ktorej zviera nejaví znaky vyhládavania platformy, rýchlosť plávania (Morris, 1981; Brandeis et al., 1989).

Alternatívou vodného bludiska je suché, Barnesovej bludisko. Pozostáva z kruhovitej platformy, ktorá disponuje 16, 18 až 40 kruhovitými otvormi po obvode platformy. S rastúcim počtom otvorov narastá aj náročnosť bludiska. Zviera je trénované na vyhládanie únikovej cesty vo forme tunelu vychádzajúceho z jedného kruhovitého otvoru platformy. Cieľom testu je nájsť a zapamätať si lokalitu tunelu na základe vzdialených vizuálnych značiek a využiť ho ako únikovú cestu z platformy, za najkratší možný čas (Barnes, 1979). Výhodou bludiska je menšia stresová záťaž pre zvieratá v porovnaní s vodným bludiskom a často je využívané pre staršie jedince, ktoré majú limitovanú mobilitu. Nevýhodou môže byť absencia únikovej reakcie vzhľadom k tomu, že zvieratá nie sú pod stresom a môžu prejavovať zvýšené exploratívne správanie, ktorým zvyšujú čas strávený na platforme (Sunyer et al., 2007). Naopak, vďaka únikovej reakcii, ktorá sa v teste nemeria, je možné porovnať staršie jedince s mladšími, čo MWM neumožňuje. Pri porovnaní sa počíta množstvo chybovosti (Error rate).

Rozdielny test, ktorý je často používaný pre testovanie neurodegeneratívnych ochorení v animálnych modeloch je T a Y bludisko pre testovanie spontánneho rozhodovania. Bludisko, ako je už z názvu jasné, má charakteristický tvar písmena T alebo Y, na ktorého okrajoch pravého a ľavého ramena sa umiestňuje odmena. Cieľom testu je využiť exploratívne chovanie zvierat a sledovať proces rozhodovania sa. Počas testu, je experimentálne zviera vypustené do stredovej dráhy bludiska, z ktorej sa rozhoduje, či odbočí doprava alebo doľava. Prirodzeným správaním hlodavcov je pravidelné striedanie pravého a ľavého ramena, resp. navštívenie iného ramena ako toho, v ktorom bolo v predchádzajúcom kole. Využívajú prirodzené exploratívne správanie. Zvieratá sú v teste úspešné, ak pravidelne striedajú ramená bludiska a majú nízku tendenciu opakovane navštevovať ramená, ktoré navštívili v predchádzajúcom kole (Deacon & Rawlins, 2006; Kraeuter et al., 2019). Zámerom týchto typov bludísk je otestovanie priestorovej, pracovnej a dlhodobej pamäti zvierat a najčastejšie sa využívajú pre myšie modely. Počas testu majú zvieratá dve rozhodovacie alternatívy. V prípade, že zohľadňujú

lokalizáciu odmeny v predchádzajúcom kole, využívajú priestorovú stratégiu rozhodovania a v následnom kole zvolia iné rameno. Tento typ stratégie je pravdepodobne založený na aktivite hipokampu a mediálnych spánkových lalokov. Rozhodnutie, ktoré je založené na egocentrickej navigácii, kedy zviera volí rovnaký smer ako v predchádzajúcom kole, je pravdepodobne závislé na aktivite bazálnych ganglií, konkrétne, nucleus caudatus (Packard et al., 1989). Jednou z modifikácií testu je otáčanie bludiska o 180° a sledovanie zatáčania. Bludiská sa využívajú aj pri toxikologických skúškach zvierat, kde sa hodnotí vplyv drogy na rôzne typy pamäti.

Náročnejšou verziou T/Y bludiska je mnohoramenné, radiálne bludisko. Návrh a počet použitých ramien závisí od metodiky experimentu, používajú sa napr. 8, 12 až 17 ramenné bludiská, ktorých obtiažnosť je úmerná početnosti ramien. Bludisko má tvar „slnka“.

Trénované zviera je umiestnené do prostriedku bludiska zväčša kruhovitého tvaru, z ktorého následne exploratívne navštevuje všetky ramená. Na konci každého z nich, je prichystaná odmena. Cieľom testu je návšteva všetkých ramien, bez opätovnej návštevy tých, ktoré už navštívené boli počas jedného kola. Ak v rámci jedného kola zviera opätovne vbehne do niektorého z ramien, zaznamená sa chyba. Bludisko sa od T/Y bludiska odlišuje aj tým, že zvieratá nie sú nútené zapamätať si, ktoré ramená navštívili v predchádzajúcich kolách. Dôležité sú navštívené ramená v danom kole (Olton & Samuelson, 1976). Bludisko je využívané na testovanie krátkodobej alebo pracovnej pamäte a zvieratá s obojstrannými hipokampálnymi léziami dosahujú v bludisku vysokú chybovosť (Olton & Paras, 1979). Bludisko sa tiež využíva na testovanie starnutia zvierat (aging). Staršie zvieratá potrebujú dlhodobejší tréning a s vekom v teste dosahujú horšie výsledky (Bernstein et al., 1985).

Bludiská sa využívajú nielen na testovanie rôznych patofyziologických procesov spojených s pamäťou, ale tiež pri experimentálnom skúmaní fyziologických procesov pomocou elektrofyziologických techník. Lineárna dráha predstavuje jedno z bludísk, v ktorých sa experimentálne sleduje vnímanie a rozpoznávanie priestorových konštalácií v 1D priestore. Pozostáva z úzkej chodby rôznej dĺžky ohraničenej vysokými stenami. Výhodou takéhoto bludiska je pohyb experimentálnych zvierat, najčastejšie potkanov v priestore, ktorý umožňuje jednoduchú reprezentáciu určenú dvomi smermi (z A do B, a z B do A). Priestor bludiska je zostavený pomocou vizuálnych orientačných bodov, napríklad rôznym umiestnením jedného alebo viacerých svetiel alebo znakov, či symbolov. Priestor môže byť zostavený aj pomocou rôznych foriem podlahy pre rozdielny taktilný stimul. Lineárna dráha umožňuje napríklad štúdium jednosmerne páliacich neurónov preferujúcich len jeden smer na lineárnej dráhe (z A do B alebo opačne), fenomén sa v inom prostredí nezávislom na smere, ako je napríklad

otvorená aréna, nevyskytuje. Test otvoreného poľa je ďalším prostredím pre testovanie priestorovej orientácie, ide o 2D priestor, do ktorého je zviera voľne vypustené a v priestore sa orientuje pomocou vzdialených vizuálnych bodov alebo svetiel, rôzne rozmiestnených priamo v aréne alebo aj mimo nej. Veľkosť aj tvar priestoru nieje špecifikovaný a závisí od technického vybavenia laboratória alebo vedeckej hypotézy, ktorú by mal test zodpovedať. Najčastejšie sa využívajú kruhové alebo štvorcové tvary.

Prostredie, či už 1D alebo 2D, sa často využíva v experimente viac ako jedno, často to sú napríklad dve striedajúce sa prostredia. Prvé býva vo forme známeho a druhé vo forme neznámeho prostredia. V závislosti od experimentálneho protokolu sú následne zvieratá testované a experimentálne nahrávané v oboch prostrediach počas protokolom stanoveného času. Testom otvoreného poľa boli napríklad objavené neuróny miesta. Analýzou jednotlivých place field v arénach zodpovedáme vedecké otázky týkajúce sa napríklad fungovania hipokampu a jeho prepojení.

4.2.2 Iné bludiská využívané pre testovanie priestorovej orientácie

Pre kognitívne testovanie sa využívajú rôzne formy komplexného bludiska, pozostávajúce z viacerých dráh, ktoré vzhľadom pripomínajú reálne bludiská. Vyhľadáním správnej cesty, sa zviera dostane k odmene. Tvar a zloženie bludiska môže byť rôzny a jeho komplexnosť je úmerná náročnosti. Zviera je umiestnené do startboxu a v systéme uličiek a prechodov, sa snaží vyhľadať najrýchlejšiu možnú cestu k odmene. Komplexnosť bludiska je nemenná, čo znamená, že medzi jednotlivými sedeniami sa nemení. Využitie nemenného prostredia umožňuje testovanie pracovnej pamäti a procesu učenia s pribúdajúcimi návštevami bludiska. S väčším počtom kôl sa znižuje čas, za aký zviera prebehlo bludiskom až k cieľovej odmene (Ingram, 1988).

Iný prístup otestovania priestorovej pamäti zvierat, ako prístup navigácií a hľadania unikových ciest je umiestňovanie rôznych predmetov do známeho priestoru. V procese habituácie na určitý priestor, je zviera umiestnené do behaviorálneho boxu, v ktorom sa nachádzajú predmety rôzneho tvaru, vône alebo z rôznych materiálov. Po niekoľkých kolách učenia, ktorých počet závisí od metodiky experimentu, je počas testovacieho kola poloha jedného alebo viacerých predmetov vymenená s polohou iného predmetu, alebo je predmet úplne odstránený a jeho pozícia je prázdna, alebo môže byť nahradený úplne novým predmetom. Následne sa pomocou kamier a programového vybavenia meria čas a správanie zvierat v priestore. Prírodný prejav zdravých jedincov je zvedavosť voči novému pridanému

objektu a znížená preferencia pre známy predchádzajúci objekt. V prípade výmeny objektov na ine pozície v aréne sa sleduje, či túto zmenu zviaza postrehlo a prejavuje sa zvedavosťou pri oboch predmetoch. Zvedavosť sa popisuje ako prehnaný záujem, ovoniavanie a dotýkanie sa objektu. Meraná hodnota je čas, ktorý pri „inom“ objekte strávia v porovnaní s časom, ktorý venujú známemu objektu. Úlohou zvierat je zapamätať si pôvodné a objaviť nové objekty v testovacom prostredí. Počet a tvar objektov je rôzny, čím sa vytvára obtiažnosť testu. Test tak umožňuje množstvo modifikácií, pre prispôsobenie náročnosti experimentu (Chapillon & Rouillet, 1997).

4.3 Zmeny priestorovej orientácie v patológii Alzheimerovej choroby

Hipokampus je považovaný za najdôležitejšiu štruktúru pre formovanie epizodickej pamäti a akékoľvek narušenie jeho štruktúry, či už v prenatalnom období alebo postnatálne, spôsobí deficit vo vytváraní integrovaných okruhov. Každá, či už malá zmena na synapsiách, napríklad ich zmenšením alebo znížením počtu receptorov, je viditeľná formou narušenej plasticity s pozorovateľnou zmenou chovania. S formujúcimi sa plakmi β -amyloidu následne úmerne narastá deficit v udržateľnosti dlhotrvajúcej plasticity (Chapman et al., 1999). Experimenty in vivo dokazujú, že nielen dlhodobá potenciácia, ale aj depresia synapsií je vplyvom akumulácie patologických proteínov narušená. Nízko-frekvenčnou stimuláciou navodená LTD je inhibovateľná účinkom intracerebrovaskulárne aplikovaných solubilných agregátov Tau. Inhibícia bola preukázaná aj s časovo predĺženou intenzitou nízko-frekvenčnej stimulácie. Obdobným spôsobom, aplikáciou agregátov Tau proteínu a následnou vysoko-frekvenčnou stimuláciou, inhibovali LTP v hipokampálnej podoblasti CA1 (Ondrejčák et al., 2019; Ondrejčák et al., 2018).

Elektrofyziológické nahrávania z neurónov hipokampálnej oblasti, zamerané na epizodickú formu pamäti, odhalilo deficit v priestorovej reprezentácii, narušenie stability priestorovej mapy a zníženie frekvencií pálenia akčných potenciálov. Menia sa aj rytmické modulácie akčných potenciálov diktované vlnením theta a gama. Narušenie priestorovej mapy je pozorované stabilitou place fields. Stabilita je pozorovateľná v rámci jedného nahrávania, použitím stáleho známeho prostredia s následným prestriedaním s neznámym prostredím. V rámci stability sa môže zmeniť lokalizácia place fields, alebo frekvencia pálenia akčných potenciálov neurónu pre konkrétny place field. Zmeny v theta moduláciách ovplyvňujú opätovné vybavenie konsolidovanej priestorovej mapy, ktorá môže byť narušená (Mably et al., 2017). V inej štúdii bolo elektro-fyziológickým nahrávaním z myši s APP mutáciou, preukázané zhoršenie globálneho remapovania. Priemerná frekvencia pálenia akčných potenciálov a

veľkosť a počet place fields sa v porovnaní s kontrolami zmenili len mierne. Spozorovaný deficit v remapovaní medzi známym a neznámym prostredím, bol pravdepodobne spôsobený zníženou stabilitou place fields (Jun et al., 2020).

5 FTO demetyláza m6A dráhy

Analýzou množstva transkriptov bolo zistené, že *N*⁶-metyladenosin (m⁶A) je široko rozšírenou modifikáciou messengerovej RNA (mRNA), ktorá pozmeňuje 1-2% všetkých adenoínových nukleotidov v mRNA. Modifikácia je esenciálna pre vývoj a prežitie eukaryotických buniek a má nenahraditeľnú úlohu v expresii génov a ich regulácii. (Dominissini et al., 2012; Fu et al., 2013).

Hladina a lokalizácia m6A dráhy v RNA transkriptoch je riadená koordinovanou aktivitou m6A metyltransferázového komplexu a m6A demetyláz. Metyltransferázový komplex m6A obsahuje katalytické proteíny (medzi ktoré patrí napr. METTL3, METTL14) a regulačné podjednotky (napr. protein WTAP) (Ping et al., 2014).

Vplyv m6A na modifikácie a metabolizmus RNA je sprostredkovaný množstvom „čítajúcich proteínov“, ktoré buď rozpoznávajú priamo metylované sekvencie (napríklad rodina s YTH doménou) (Xu et al., 2014), alebo je ich väzba na RNA transkripty umožnená mechanizmom „m6A switch“ a teda pomocou uvoľnenia vláskovitej (hairpin) štruktúry mRNA, ku ktorej dochádza vplyvom metylácie (napríklad protein hnRNP C) (Liu et al., 2015). Súbor mechanizmov, ktoré ovplyvňujú RNA metabolizmus prostredníctvom m6A sa označuje ako m6A epitranskriptomika alebo m6A dráha.

Demetyláza FTO bola identifikovaná výskumným tímom pod vedením Franka van der Hoevena v roku 1994, technikou pozičného klonovania na 8 chromozóme animálneho modelu experimentálnych myší C57BL/6, ako jedna z mutácií génu zodpovedného za „Fused toes“ („Ft“) fenotyp myší (van der Hoeven et al., 1994; Peters et al., 1999). U homozygotných Ft mutantov bolo zistených množstvo malformácií v oblasti hlavy, tváre, krku a CNS. Mláďatá myší umierali, často už v prenatálnom období, medzi 10. – 12. dňom embryonálneho vývoja, disponovali charakterom zlúčených prstov na predných končatinách a hyperpláziou týmusu. (Anselme et al., 2007; Peters et al., 1999). Neskôr bolo zistené, že niektoré jednonukleotidové polymorfizmy génu pre FTO demetylázu sú asociované s obezitou, čo vyvolalo zvýšený záujem o štúdium mechanizmov účinku FTO (Scuteri et al., 2007).

Demetyláza FTO patrí do skupiny nehémových Fe^{II} kofaktorovo závislých a α -KG-dependentných dioxygenáz AlkB skupiny proteínov. Do tejto rodiny spadajú AlkB homológne proteíny ALKBH1-ALKBH8 a ALKBH9 je známe ako FTO (Gerken et al., 2007; Ueda et al., 2017). AlkB skupina proteínov sú 2-oxoglutarate (2-OG) a Fe(II) dependentná oxygenáza, ktoré sú u baktérií *Escherichia coli* (*E. Coli*), priamo katalyzujúce oxidatívnu demetyláciu 1-meA

(Adenín) a 3-meC (Cytozin). Majú teda dôležitú úlohu v regulácii opravno-reparačných metylácii DNA a RNA dráh (Aas et al., 2003).

Ovplyvnenie reparačných mechanizmov môže byť spôsobené inhibíciou demetyláz. Vedeckému tímu Zheng et al., sa podarilo v roku 2014 nasyntetizovať produkt, ktorého aktivitou dochádza k inhibícii FTO demetylázy. Pôvodne bola syntéza inhibítora smerovaná k inhibícii prolyl-4-hydroxylázy (PHD) a potenciálnemu zvýšeniu erytropoetínu (Epo) v mozgových oblastiach postihnutých hypoxiou. Význam drogy teda spočíval v antikonvulzívnom účinku. Testovaním tiež zistili, že látka je schopná prechádzať cez hematoencefalickú bariéru („BBB“) no jej antiepileptická aktivita sa potvrdila jedine pri 6Hz nízkofrekvenčnom teste, zatiaľ čo väzba na PHD s jej následnou inhibíciou sa nepotvrdila (Zheng et al., 2014).

V čase vytvárania pamäťových engramov je nevyhnutná správna koordinácia zmien, ktoré vznikajú počas génovej transkripcii a expresii proteínov (Davis & Squire, 1984). Dochádza k reparačným mechanizmom, ktoré následne ovplyvňujú kognitívne funkcie a reguláciu pamäťových procesov.

5.1 Metylácie a demetylácie m⁶A dráhy a ich vplyv na pamäťové mechanizmy na synaptickej úrovni a v patológii Alzheimerovej choroby

Jedným z možných prístupov štúdia mechanizmov signálnych dráh a ich vplyvov na organizmus je cielené vyblokovanie určitých súčastí dráhy, najčastejšie syntézy proteínov pomocou vypnutia príslušnej mRNA pre daný proteín. Takýto prístup bol zvolený pri štúdiách metylácií m⁶A dráhy a ich vplyvu na mechanizmy pamäti.

Widagdo a Anggono v roku 2016 experimentálne, pomocou vírusového vektora, vytvorili FTO-deficitné myši čím zvýšili celkovú m⁶A metyláciu v prefrontálnom kortexe. Následne pomocou behaviorálneho testu, testu strachového podmieňovania, namerali zvýšenú strachovú odozvu u myši s inhibovanou FTO-demetylázou (Widagdo et al., 2016). Podobné výsledky dosiahli o rok neskôr v experimente pod vedením Brandona Waltersa a jeho spoluautorov. Zistili, že FTO interferuje s tvorbou pamäťových okruhov, znižovaním množstva m⁶A - modifikácií na mRNA. Následne pomocou CRISPR/Cas9 - HSV vírusového vektora, vytvorili FTO- deficitné myši s deficitom génu špecificky v CA1 oblasti hipokampu. Myši s potlačenou expresiou génu, dosiahli lepšie výsledky v behaviorálnom teste strachového podmieňovania v porovnaní s kontrolami, ktoré deficit nemali (Walters et al., 2017).

The Nature v roku 2018 odpublikoval prácu v ktorej autori popisujú, že v hipokampálnej oblasti dochádza ku transkripcii mRNA m⁶A dráhy pomocou väzobných

proteínov YTHDF1. Po ich vyblokovaní (knock-out génu) sa u deficientných myší objavujú zmeny správania, naznačujúce pamäťové deficity a poruchy učenia (Shi et al., 2018).

V rovnakom roku výskumná skupina Zhang et al., odpublikovala článok v The Nature, kde popisujú, že na hipokampe závislá konsolidácia pamäti je pravdepodobne regulovaná pomocou METTL3 proteínov, patriacich do skupiny metyltransferázového komplexu m6A dráhy. Proteíny napomáhajú k translácii tzv. neuronálnych okamžitých ranných génov a znížením množstva týchto proteínov (knock-out) dochádza k zníženiu pamäťovej konsolidácie. Množstvá METTL3 proteínov sú pozitívne korelované so schopnosťou rýchleho učenia a ich zvýšená expresia signifikantne zvyšuje konsolidáciu dlhodobej pamäti (Zhang et al., 2018). Han et al. následne zistili, že gény zodpovedné za metylácie na m6A dráhe, boli primárne lokalizované na presynaptických a postsynaptických membránach hipokampu a mozgovej kôry (Han et al., 2020).

Zaujímavý pohľad na synaptickú aktivitu a m6A dráhu, mal Hess et al. ktorí v experimente využili drogu kokaín, o ktorom je známe, že posilňuje synaptickú aktivitu ovplyvnením mechanizmov učenia na synaptickej úrovni. Potvrdili, že injekčne podávaný kokaín aktivoval expresiu mRNA génu pre Fos proteín z rodiny okamžitých ranných génov, v dopamínových neurónoch ventrálnej tegmentálnej oblasti. Konkrétne išlo o oblasti paranigral nucleus (VTA- PN), caudate putamen (Cpu) a nucleus accumbens (Nacc). Behaviorálnym testom tiež potvrdili, že kokaín zvýšil pohyblivosť u týchto zvierat. Následne, keď podali kokaín FTO deficitným myšiam (knock-out), bola behaviorálna aj synaptická odozva na drogu slabá. U myší bolo zistené, že kokaín bez prítomnosti FTO nedokáže vyvolať silnú aktiváciu mRNA pre Fos proteín a rovnako aj pohyblivosť myší bola nižšia. V experimente ďalej demonštrovali, že FTO neovplyvňuje všetky mRNA zúčastňujúce sa m6A dráhy. Primárne ovplyvňuje len tie, ktoré súvisia s prenosom signálu medzi nervovými bunkami (Hess et al., 2013).

Ako by FTO demetyláza mohla ovplyvniť mechanizmy pamäti u pamäťovo deficitných organizmov, otestovali vo viacerých štúdiách na modelových organizmoch pre Alzheimerovu chorobu. Množstvo štúdií podporuje úzku spojitosť medzi FTO demetylázou a Alzheimerovou chorobou. V 9 ročnej štúdii genómových asociácií sa Lina Kellner et al., zamerala na súvislosť FTO genotypu s genotypom pre AD. V centre ich záujmu, okrem iných parametrov, bol gén APOE pre expresiu apolipoproteínu E. ApoE je súčasťou lipoproteínového metabolizmu, lipidových transportných procesov a je produkovaný rôznymi bunkami tela, od hepatocytov až po neuronálne, astrocytárne bunky (Boyles et al., 1985). V štúdii objasnili priamu súvislosť s genómom pre FTO demetylázu. Gén FTO-AA označili ako zvýšený rizikový faktor pre vznik

AD a v prípade, že bol jedinec nositeľom aj génu pre APOE4, riziko sa pre vznik ochorenia zvýšilo viac (Kellner et al., 2011).

Ako už bolo uvedené vyššie, ApoE je tvorený veľkou populáciou buniek, vrátane astrocytov, ktoré sú súčasťou ochranného, obranného a detoxifikačného systému mozgu. V práci Zuzany Čočkovej sa zamerali práve na astrocyty a sledovali úlohu enzýmov m6A dráhy na streptozotocinovom modeli AD u humánnej astrocytarnej línie CCF-STTG1. V astrocytoch inkubovaných so streptozotocínom objavili zvýšené množstvá m6A demetylázy FTO a YTHDF1 väzobných proteínov. Následne podávaním inhibítora FTO demetylázy MO-I-500 do bunkovej línie, zistili významnú odolnosť astrocytov proti streptozotocínu. Farmakologickou inhibíciou docielili zníženie apoptotických faktorov, tvorbu GFAP (glial fibrillary acidic protein), znížili mitochondriálnu dysfunkciu a bioenergetické výkyvy (Čockova et al., 2021).

Huaje Li et al., sa v *in vivo* štúdií zamerali na expresiu génu FTO demetylázy u pamäťovo deficitných myši 3x Tg-AD. Zistili, že u myši dochádza k zvýšenej expresii génu pre FTO demetylázu a rovnako aj k zvýšenej syntéze proteínu pre FTO demetylázu. Následne pomocou vírusového vektora, narušili syntézu FTO demetylázy v izolovaných neurónoch a následne v *in vitro* štúdií zistili, že v neurónoch s inhibovanou syntézou FTO demetylázy dochádza k inhibícii tvorby hyperfosforylovaného Tau proteínu, no syntéza β -amyloid proteínu ovplyvnená nebola (Li et al., 2018). Pitman et al., v experimente zameranom na Tau patológiu už v roku 2013 zistili, že FTO deficitné bunky línie SH-SY5Y, mali signifikantne znížené množstvá hyperfosforylovaného Tau na pozícii Ser396, ktorá je priamo spájaná so vznikom Alzheimerovej choroby. Primárne je preto v centre záujmu vplyv FTO demetylázy na rôzne cesty hyperfosforylácií Tau proteínu, ktorý je popisovaný, ako jeden z ďalších mechanizmov príčiny vzniku Alzheimerovej choroby (Pitman et al., 2013).

Výskumy teda naznačujú, že FTO demetyláza je proteín, ktorý sa zúčastňuje, či už pozitívnym, alebo negatívnym spôsobom na synaptickej plasticite. V spomenutých experimentoch Walters et al., 2017 a Han et al., 2020 potvrdili, že k syntéze FTO demetylázy a zvýšeným metyláciám m6A dráhy dochádza v blízkosti synaptických zakončení, čo teóriu synaptickej plasticity aj podporuje.

6 Experimentálna časť

6.1 Ciele experimentálnej časti

Cieľom experimentu bolo overenie hypotézy, či sa po podaní inhibítora RNA demetylázy FTO v potkaňom modeli Alzheimerovej choroby prejavia zmeny na úrovni jednotkových aktivít neurónov u voľne sa pohybujúcich zvierat, súvisiace so zlepšenou priestorovou orientáciou. Hypotéza vychádzala jednak z dostupných vedeckých publikácií, no nadviazali sme aj na predchádzajúce výsledky nášho tímu. V diplomovej práci Petry Pohanovej (Pohanová, 2019) bolo zistené, že farmakologickou inhibíciou RNA demetylázy FTO, pomocou látky FTO-MO-I-500 sa zlepšili výsledky v teste priestorového učenia u transgénneho modelu TgF344-AD. V experimente Walters et al., 2017 tiež zistili, že myši so zníženou expresiou génu pre FTO demetylázu dosiahli lepšie výsledky v teste strachového podmienovania. Pre dosiahnutie cieľa hypotézy sme sa v našej experimentálnej práci zamerali na korelácie aktivít neurónov miesta, ktorých aktivita sa využíva pri testovaní pamäťových vlastností u experimentálnych zvierat. Elektrofyziológickým prístupom extracelulárneho nahrávania sme nahrali aktivitu neurónov v dvoch rôznych podmienkach a následne sme analýzou signálu porovnávali zmeny jednotkovej aktivity pred podaním inhibítora RNA demetylázy FTO a po podaní inhibítora u potkanov línií TgF344 -AD a F344-CT. Zistená zmena by mohla súvisieť so zlepšením, alebo zhoršením pamäťových vlastností, po farmakologickej inhibícii FTO demetylázy. Výsledkami by sme chceli priniesť nové zistenia o vplyve inhibície FTO demetylázy na aktivitu neurónov hipokampu.

6.2 Materiál a metodika

6.2.1 Model použitých experimentálnych zvierat

Experimentálna línia TgF344-AD je charakteristická ľudským amyloid-precursor proteínom (APP) so švédskou mutáciou a PSEN1 s deltaE9 mutáciou. Potkany majú o 2.6 x vyššiu expresiu ľudského APP génu a 6,2 x vyššiu expresiu génu PSEN1. Hodnoty rozpustného a nerozpustného A- β 40 a A- β 42 sú vekovo špecifické a ich pomer sa s vekom mení. Z hľadiska neuropatologického hľadiska je akumulácia amyloidových plakov zvýšená vo veku 16-26 mesiacov, primárne v oblastiach hipocampu a kortexu no plaky je možné nájsť aj v striate a cerebele. U potkanov bola od 16 mesiacov potvrdená Tau patológia a prítomná štruktúra neurofibrilárnych klobiek. Rovnako bola vo veku 16 mesiacov potvrdená strata neurónov v oblasti hipocampu a cortexu a to až o 40 % v porovnaní s kontrolnými zvieratami. Behaviorálne experimenty týchto zvierat potvrdili narušenie kognície v teste Morisovho vodného bludiska už v období 6 mesiacov a v Barnsovej bludisku vo veku od 15 mesiacov. Rovnako sa potvrdil deficit aj v teste Novel objekt recognition a to vo veku 24 mesiacov (Cohen et al., 2013).

6.2.2 Experimentálne zvieratá

Na experiment som celkom použila 10 potkanov (samcov) vekovej kategórie 11 mesiacov, z ktorých bolo 4 laboratórnych potkanov transgénej línie TgF344-AD a k nim 4 kontrolných potkanov F344-CT. Potkany boli uchovnené v experimentálnom zverinci Biomedicínskeho centra v Plzni, bez výživových reštrikcií, s prísunom kvalitného chovného krmiva a vody *ad libitum*. Svetelný režim a teplota prostredia boli zabezpečené podľa štandardných chovných podmienok zverinca a počas dĺžky experimentu sa nemenili. Uchovnenie potkanov v boxoch bolo štandardné, so 4 až 5 jedincami (súrodencami jedného pohlavia) na 1 box, pričom veľkosť chovných boxov je v súlade s platnými nariadeniami EÚ, pre chov experimentálnych zvierat. Potkany, ktoré boli vybrané do experimentu sa následne po operácii oddelili do samostatných boxov, aby sme zabránili poškodeniu implantátu a aby si potkany neublížili.

6.2.3 Prístroje a nástroje

Chemikálie

Chirurgická dezinfekcia:

3% peroxid vodíka, Betadine

Analgetiká:

Nalbuphini-hydrochloridum (Nalbufin 10mg/ml)

Carprofenum (Rimadyl 50mg/ml)

Anestetiká:

Dexmedetomidine 0,5mg/ml (Dexmedetomidin)

Isofluranum (Isoflurin 1000mg/g)

Antibiotiká:

Marbofloxacinum (Marbocyl 100mg/ml)

Očná masť:

VIDISIC gel oph 1x10 g

Dentálny cement:

dvojzložková súprava (rozpušťadlo a prášok) (Meliodent Rapid Repair (Kulzer GmbH) 500ml/

Meliodent Rapid Repair (Kulzer GmbH) 1kg)

Vehikulum na rozriedenie inhibítora:

Metylcelulóza (M0262)

Inhibitor RNA-demetylázy FTO (MO-I-500):

(poskytol Dr. Mark Olsen z Midwestern University, Glendale, AZ, USA)

Pomôcky

Na chirurgiu:

sterilné chirurgické nástroje, nožnice, skalpelové čepielky, pinzety, trepany, vrtáky, kostné skrutky, bavlnené sacie tampóniky, sterilný šicí materiál

Na fixáciu počas implantácie:

stereotaxický aparát (Kopf instruments)

Na inhalačnú anestéziu:

Inhalátor ASA isoflurane

Na trepanáciu:

zubárska vŕtačka (Foredom)

pre elektrofyziologické nahrávanie :

Elektrofyziologický drive (MDR-64CSS1lid 16-screw microdrive, Axona
/http://www.axona.com/)

headstage (HS-132H3 32-ch headstage with dual-LED stick)

konektory (Axona /http://www.axona.com)

káble (HS32-CAB3 Litz cable,)

na klastrovanie, kontrolu klastrovania

Kilosort 1.0/ klastrovací algoritmus

phy-GUI/ vizualizačné prostredie pre kontrolu klastrovania

Matlab/Matworks/licencia

pre behaviorálne testovanie

infračervené svetelné diódy pre sledovanie pohybu potkanov počas nahrávania

Kamera určená na nahrávanie zvierat na lineárnej dráhe/

6.2.4 Metodika tréningu

Behaviorálne testovanie prebiehalo v laboratóriu Biomedicínskeho centra v Plzni. Laboratórium je priestorovo aj vybavením prispôsobené na vykonávanie behaviorálnych experimentov so zabezpečenými nemennými podmienkami a potrebami pre všetky experimenty a aj zvieratá. Behaviorálny experiment sa uskutočnil počas obdobia 7 mesiacov.

Tréning

Na behaviorálne otestovanie potkanov som použila test lineárnej dráhy. Podstatou testu je naučiť a habituovať zviera v prostredí, na ktoré bude zvyknuté a toto prostredie bude vnímať ako svoje domáce prostredie. Následne bol potkan trénovaný tak, aby prebehol na lineárnej dráhe aspoň 20- krát, pričom jedno prebehnutie z bodu A do bodu B a späť do bodu A bolo rávané, ako 1 Trial. Potkany boli motivované sladkou odmenou, vo forme cereálnych keksov, na ktoré boli zvyknuté a ktoré sa nachádzali na protiľahlých stranách arény.

Zvieratá boli trénované na dve familiárne prostredia (označované ako Fam1 pred podaním inhibítora FTO demetylázy, Fam1 po podaní inhibítora FTO demetylázy), po dobu nevyhnutnú na to, aby v prostredí behali samostatne a nevykazovali známky strachu a úzkostného správania (chvenie, apatia, freezing). Počet dní, ktoré boli nevyhnutné pre natrénovanie potkana sa líšili od jedinca k jedincovi, no dvojica Tg-kontrola bola trénovaná vždy spolu, v rovnakom čase, s rovnakým počtom tréningových dní a v rovnakom prostredí. Doba tréningu, nevyhnutná pre 1. známe prostredie (Fam1 pred podaním inhibítora FTO demetylázy), bola 1-3 týždne. Doba tréningu pre 2. známe prostredie (Fam1 po podaní inhibítora FTO demetylázy) bola 3-4 dni, nakoľko nebola potrebná dlhodobá habituácia a potkany boli naučené, ako majú v prostredí pracovať. V nevyhnutných prípadoch bol niektorým potkanom vytvorený dvojfázový tréning, ktorý pozostával z dvoch trénovaní v jeden deň, medzi ktorými bola časová prestávka 3h.

Po tréningu bol potkanom implantovaný elektrofyziologický implantát (Drive) a po implantácii a rekonvalescencii sa s potkanmi opätovne vykonal tréning v známom prostredí.

6.2.5 Metodika implantácie

Implantácia jednotlivých zvierat bola vykonaná rovnakým protokolom. Pred implantáciou boli potkany odvážené a podľa hmotnosti boli pripravené analgetiká a anestetiká (Nalbufin s koncentráciou 0,1mg/kg a Dexmedetomidin s koncentráciou 0,5 ml/kg). Po odvážení bol potkan umiestnený do inhalačného boxu, kde mu bola pustená inhalačná anestézia

(Isofluran s 1,5% koncentráciou). Po uspaní potkana a intraperitoneálnej aplikácii medikamentov sme potkana zafixovali v stereotaxickom aparáte, v ktorom bol cez inhalačný nástavec naďalej zabezpečený prívod inhalačného anestetika počas celej dĺžky operácie. Potkany boli v stereotaxickom aparáte fixované pomocou ušných fixátorov, následne bolo miesto implantácie vyholené v parietálnej a frontálnej oblasti hlavy tak, aby počas operácie nedochádzalo ku zavedeniu infekcie do operačného poľa. Oči boli ošetrené a prekryté očnou masťou a sterilným materiálom. Vyholené operačné pole, bolo tesne pred nastrihnutím očistené dezinfekčným roztokom. Operácia začínala nastrihnutím vyholenej kože čím bola vytvorená operačná rana a skalpelom odstránené podkožné väzivo a spojivo. Po vyčistení bolo miesto opäť dezinfikované 3% peroxidom vodíka. Odhalená lebečná kosť bola zdrsnená mriežkovým narezaním pomocou čepele sterilného skalpela a opäť bolo miesto vyčistené a vydezinfikované peroxidom vodíka. Koordináty lokalizácie oblasti CA1 (AP: 0,38 mm, ML: 0,32 mm) boli vymeriavané v závislosti od Bregmy a lokalizácia bola označená jemným navŕtaním lebečnej kosti. V oblasti nad mozočkom boli trepanáciou vytvorené, dva otvory pre uzemňovacie skrutky, zvyšných 5-6 podporných skrutiek bolo rozmiestnených pozdĺž odhalenej lebky na rôznych miestach tak, aby vytvárali dostatočné spevnenie implantátu. V označenom mieste nad oblasťou CA1 bola vytvorená malá kraniotómia, cez ktorú boli následne zavedené tetródy, pripojené na implantát. Dentálnym cementom sa následne implantát zafixoval, do požadovanej stabilnej polohy. Po zatuhnutí dentálneho cementu, bola celá rana očistená od hrubých nečistôt, vydezinfikovaná roztokom jódu (Betadine) a podľa potreby zašitá jedným až dvomi stehmi.

Pooperačná starostlivosť zvierat bola zabezpečená podaním analgetík (Rimadyl v koncentrácii 50mg/kg), antibiotík Marbocyl v koncentrácii 100mg/kg) a premiestnením potkanov do čistého boxu, vystlaného narezanou vatou a hrejúcou podložkou. Tesne po operácii sa pre zabezpečenie aspoň malého príjmu potravy a tekutín pripravovala ľahko stráviteľná vodnatá kaša.

Nasledujúce 4 dni boli potkanom podávané analgetiká(Rimadyl v koncentrácii 50mg/kg) a antibiotiká (Marbocyl v koncentrácii 100mg/kg). Ak si to stav potkanov vyžadoval, doba podávania analgetík sa predĺžila na 5-7 dní.

Rekonvalescencia zvierat po operácii trvala približne 10 dní, počas ktorých sa s potkanmi nepracovalo a neboli stresované. Počas rekonvalescencie sa postupne posúvali tetródové vlákna pomocou skrutiek na implantáte, ktoré sa zahľbovali cez oblasť kôry smerom k hipokampálnej oblasti CA1.

6.2.6 Metodika elektrofyziologického nahrávania

Elektrofyziologické nahrávanie bolo vykonané v laboratóriu Biomedicínskeho centra v Plzni. Všetky zvieratá použité v experimente boli nahrané rovnakým protokolom. Na metodiku elektrofyziologického nahrávania som použila nahrávací set-up Axona(Ltd.). Doba nahrávania trvala približne 6-10 hodín a v jednom dni bol nahrávaný len jeden potkan. Všetky nahrávania sa začínali procesom ladenia, počas ktorého sa tetródové vlákna zasúvali pomalými posunmi do vrstvy *stratum pyramidale* v CA1. Počas posúvania jednotlivých tetródových vlákien sa neustále sledovali vlny EEG na osciloskope. Pre posúdenie správne naladenej tetródy sa najskôr sledovala prítomnosť rýchlych oscilácií („Sharp waves ripples“) a následne veľkosť jednotlivých akčných potenciálov (AP) neurónov zachytených na tetródach. Takýmto postupom bolo vykonané ladenie všetkých 16 tetród. Po procese ladenia boli zvieratá umiestnené na 1h späť do domáceho boxu. Počas tejto doby boli zvieratá v kľudnej miestnosti a bez zvukov, ktoré by ich mohli stresovať. Poloha potkanov bola monitorovaná počas vykonávania úlohy v lineárnej dráhe. Kamera nahrávala dve infračervené svetelné diódy, ktoré boli umiestnené v oblasti konektorov, na vrchnej strane implantátu. Poloha diód zabezpečila zreteľný signál s minimálnou stratou.

6.2.6.1 1. Elektrofyziologické nahrávanie pred aplikáciou inhibítora FTO demetylázy (MO-I-500)

Protokol použitý na test lineárnej dráhy pred podaním inhibítora FTO demetylázy (MO-I-500) pozostával z jedného domáceho prostredia, v ktorom boli potkany habituované a trénované predchádzajúcich niekoľko týždňov a nového prostredia, ktoré bolo odlišné od domáceho prostredia a ktoré nepoznali a ani nevideli. Prostredia sa počas nahrávania 2x zopakovali a medzi prostrediami boli spánkové prestávky.

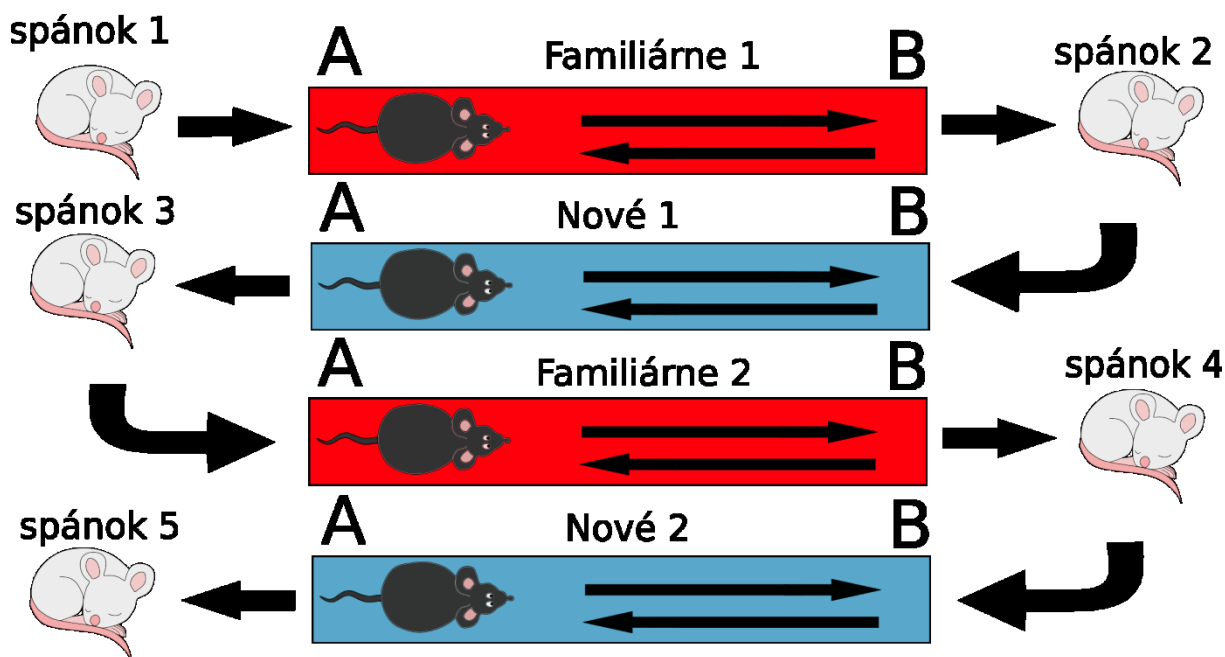
Zvolený protokol pre experimentálne testovanie bol použitý pre všetky zvieratá rovnako.

Protokol bol otestovaný a používaný aj v minulosti na iné experimentálne nahrávania, ktoré už laboratórium uskutočnilo.

Protokol pozostával z nasledujúcej postupnosti:

1. Spánok1, 1h
2. **Familiárne 1** / známe prostredie (aspoň 10 trials)
3. Spánok2 (45 minút)
4. **Nové 1** / neznáme prostredie (aspoň 10 trials)
5. Spánok3 (45 minút)

6. **Familiárne 2** (aspoň 10 trials)
7. Spánok 4 (45 minút)
8. **Nové 2** (aspoň 10 trials)
9. Spánok 5 (45 minút)



Obrázok 5: Grafický návrh protokolu nahrávania použitého počas prvého a druhého nahrávania

Po nahrávaní boli zvieratá umiestnené späť do zverinca a po dobu 2-3 dní sa s nimi nepracovalo. Následne bol zvieratám aplikovaný inhibítor FTO demetylázy (MO-I-500).

6.2.6.2 2. Elektrofyzilogické nahrávanie po aplikácii inhibítora FTO demetylázy (MO-I-500)

Elektrofyzilogické nahrávanie po aplikácii prebiehalo rovnako, ako elektrofyzilogické nahrávanie pred aplikáciou inhibítora. Rozdiel bol vo vzhl'ade prostredí, v ktorom sa potkany pohybovali. Ako domáce známe, bolo použité druhé familiárne prostredie, ktoré bolo odlišné od familiárneho prostredia použitého počas 1. elektrofyzilogického nahrávania. Na druhé domáce prostredie boli zvieratá trébované, po dobu 3-4 dní a ako nové

prostredie, bolo opäť použité úplne neznáme prostredie. Pripravené, natrénované potkany, boli nahrávané rovnakým protokolom, aký bol použitý počas nahrávania pred podaním inhibítora FTO demetylázy nasledujúci deň po poslednej dávke inhibítora.

6.2.7 Metodika aplikácia inhibítora FTO demetylázy (MO-I-500)

Všetkým potkanom bol nasledujúci deň po 1. elektrofyziologickom nahrávaní aplikovaný inhibítor FTO demetylázy (MO-I-500). Inhibítor bol predpripravený ako roztok v metylcelulóze (viskozita 400cP) s koncentráciou 5mg/ml. Doba podávania inhibítora, bola stanovená na 6 dní v dávke 1mg/100g, intraperitoneálne. Potkany boli počas celej doby aplikácie uchovnené v prostredí zverinca a v ich vlastných boxoch.

Prvé 3 dni aplikácie inhibítora sa s nimi nepracovalo ani zásadne nemanipulovalo, aby neboli stresované. Následne boli počas nasledujúcich 3-4 dní, trénované, na 2. známe prostredie (Fam1 po FTO). Po 6 dňoch aplikácie inhibítora, boli potkany nahrávané v nasledujúci deň, po poslednej aplikačnej dávke.

6.2.8 Metodika analýzy elektrofyziologických dát

Elektrofyziologické dáta zaznamenané pomocou systému Axona(Ltd.), pred aplikáciou inhibítora FTO demetylázy a po aplikácii inhibítora FTO demetylázy boli následne spracované pomocou klastrovacieho algoritmu (Pachitariu et al., 2016). Na základe charakteristických vlastností akčných potenciálov produkovaných jednou bunkou, algoritmus vytvoril vzor akčného potenciálov pre každú bunku. Následne porovnával AP v raw signále s vytvorenými vzormi. AP, ktoré mali veľmi podobné charakteristiky ako vzory jednotlivých buniek, boli zatriedené do klastrov, špecifických pre každú bunku. Algoritmus klastrovania pozostáva z niekoľkostupňovej filtrácie. Prvým krokom je využitie „high-pass“ filtra pre odstránenie nízkych frekvencií signálu. Štandardne je filter prednastavený na 300 Hz. Filter je použitý na všetky kanály súčasne. V nasledujúcom kroku algoritmus odstráni prebytočný šum v rozsahu frekvencií typických pre akčné potenciály neurónov. Amplitúdy týchto akčných potenciálov sú príliš nízke pre klasické detegovanie a proces čistenia umožňuje separovanie šumu, čo zabezpečí vysokú výťažnosť a zníži straty. Následne sa vytvoria a porovnajú dve matice dát pre každý kanál, matica surových dát a matica po prečistení. Po vytvorení matíc, následuje vytvorenie modelu už vyššie spomenutého vzoru vlny akčného potenciálu. Algoritmus vytvára vzor priemerného akčného potenciálu, na základe singulárnych dekompozičných hodnôt každého akčného potenciálu. Metóda je v porovnaní s klasickou tvorbou princípálnych komponentov z priestoru s nižšou dimenzionalitou precíznejšia. Algoritmus následne vytvára

masky (vzory) akčných potenciálov pre vlny, zachytené na jednotlivých kanáloch. Následne je kanál očistený od identifikovaného elektromagnetického a biologického šumu a pre každý klaster je vytvorená identita akčného potenciálu. Klastre vytvorené algoritmom sú interpretované ako neuróny. Pomocou generovaných modelov vln akčných potenciálov algoritmus spracuje podobnosť vln a vytvorí normalizovanú vlnu pre konkrétny klaster. Následne je pre každý akčný potenciál vypočítaná amplitúda a v prípade posunu tetród počas nahrávania alebo v prípade rýchleho vypálenia („bursting“) viacerých akčných potenciálov jedným neurónom, je v algoritme zakomponovaná rovnica na kompenzáciu variability amplitúdy pochádzajúcej z jedného neurónu. Algoritmom spracované dáta sú následne uložené v textových (python.npy) súboroch s názvami parametrov, ktoré obsahujú (spike_templates.npy, spike_times.npy, amplitudes.npy, channel_map.npy, ...) (Pachitariu et al., 2016).

6.2.9 Metodika hodnotenia kvality klastrov

Spracované dáta boli následne skontrolované vizualizačným prostredím Phy-GUI, ktoré umožňuje vizualizáciu jednotlivých parametrov celého dátového súboru. Proces kontroly klastrovania je riadený intuitívnym zhodnotením posudzovateľa a rôzni posudzovatelia nemusia získať rovnaké výsledky z rovnakých dát. Postup kontroly je teda heuristickým postupom.

V prostredí phy, boli všetky klastre skontrolované a vyhodnotené podľa ich kvality do troch tried: *Good*, *MUA*, *Noise*. Prvá kategória reprezentuje klastre, ktorých kvalita naznačuje, že signál pochádza z jedného neurónu. V skupine *MUA* (“multi-unit activity”) sú zatriedené parametre, ktoré bolo náročné zhodnotiť spoľahlivo a s určitosťou. A v skupine *Noise* sú zaradené ťažko hodnotiteľné klastre a šum. Počas zhodnocovania boli sledované nasledovné parametre:

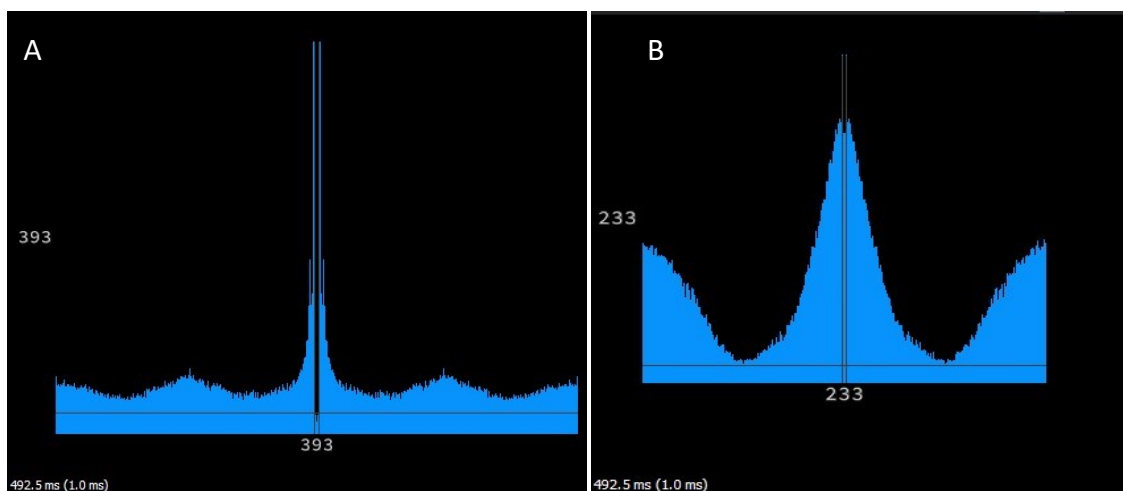
1. **Počet spajkov:** každý klaster, obsahoval určitý počet spajkov, ktoré do klastra zatriedil klastrovací algoritmus. Čím väčší objem klastra, tým lepšia dôveryhodnosť.

id	ch	sh	depth	fr	amp	n_spikes ▼
155	32	0	9.00	15.60	384.50	15673
156	5	0	2.00	13.19	335.83	13250

Obrázok 6 : Náhľad do vizualizačného prostredia phy-GU v ktorom bolo kontrolované klastrovanie. Okno zobazuje detailné informácie o identifikačnom

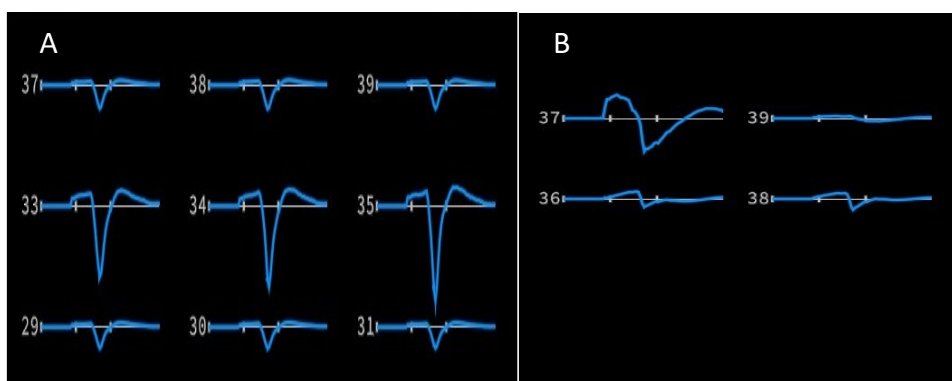
čísla klastra(id), jeho amplitúde(amp),intenzite pálenia AP (fr), číslo kanálu, na ktorom bol klaster nahraný(ch) a počet spajkov v danom klastri(n_spikes). Zelená farba vyznačuje klastre vyhodnotené ako good, sivá ako noise.

2. **Autokorelogram:** umožňuje vyhodnotiť časovú súvislosť medzi jednotlivými spajkami klastra a tak odhadnúť napr. refraktérnu fázu neurónu. U neurónov je refraktérna fáza menšia ako 2 ms nepravdepodobná a klastre, ktorých autokorelogram ukazuje refraktérnu fázu dlhšiu než 2 ms boli identifikované ako neuróny.



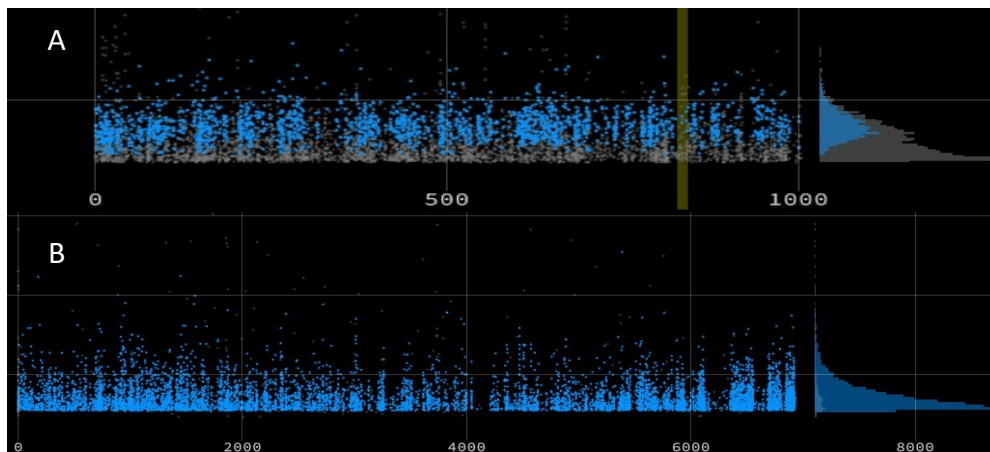
Obrázok 7: (A) autokorelogram pyramidálneho neurónu v časovom úseku 492.5 ms, ktorý zobrazuje histogram vzdialeností medzi akčnými potenciálmi (os y) jedného klastra (os x) čas 0 je v prostriedku.. Veľkosť jedného binu je 1 ms. (B) autokorelogram šumu, bez refraktérnej fázy.

3. **Vzhľad vlny akčného potenciálu pre daný klaster:** posúdenie vlny pohľadom je dôležité pre rýchle oddelenie šumu. Vlna šumu má nepravidelný charakter, väčšinou neurčitého tvaru.



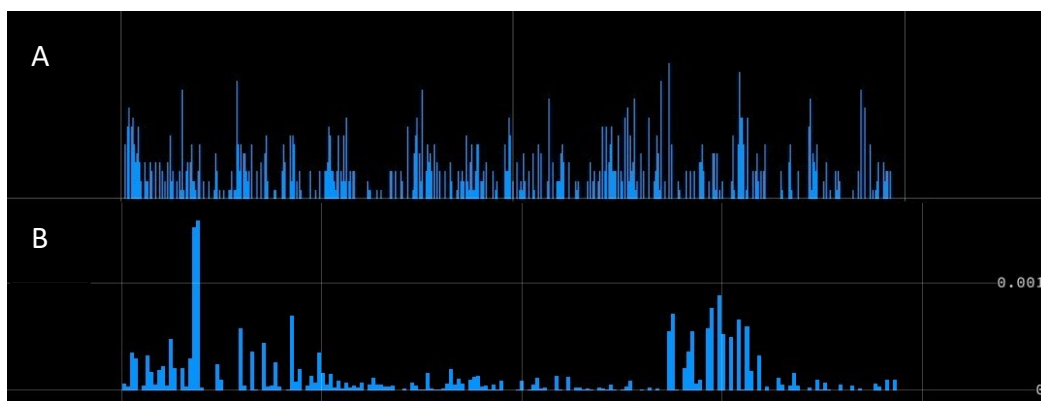
Obrázok 8: (A) príklad vlny pyramidálneho neurónu na kanáloch 33,34 a 35. (B) vlna šumu

4. **Amplitúda a jej distribúcia:** súbor amplitúd akčných potenciálov by mal mať vzhľad Gaussovho rozdelenia (tvar zvonu na pravej strane obrázku).



Obrázok 9: (A) náhľad na pozície akčných potenciálov patriace pod jeden klaster(modré zvýraznenie) a ich aktivita počas celej dĺžky nahrávania. Dobrý klaster má mať vzhľad amplitúdy gaussovho rozdelenia,(B) negaussovo rozdelenie amplitúdy klastra reprezentujúceho šum.

5. **Rýchlosť pálenia akčných potenciálov:** posudzuje sa veľmi vysoké, alebo veľmi nízke pálenie akčných potenciálov. Klaster, ktorých pálenie akčných potenciálov, bolo príliš nízke, boli označené, ako šum.



Obrázok 10: náhľad na frekvenciu pálenia akčných potenciálov klastra klasifikovaného ako bunka (A) a klastra reprezentujúceho šum (B).

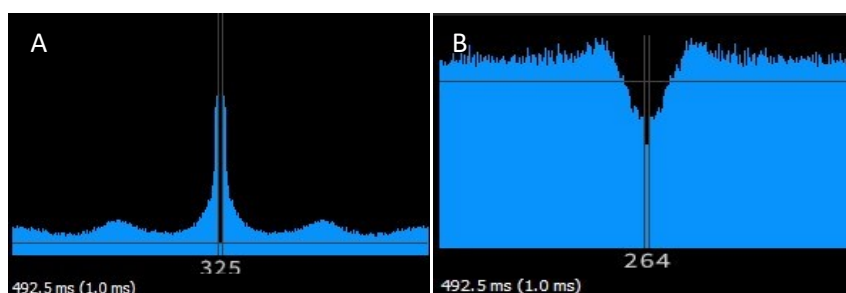
6. **Posúdenie podobnosti vzhľadu medzi rôznymi klastrami:** podobnosť je definovaná hodnotami na škále 0– 1, pri veľmi vysokej podobnosti medzi klastrami je vysoká

pravdepodobnosť, že dané klastre patria rovnakému neurónu a v takom prípade sa klastre spájajú do samostatného nového klastra. Spájanie klastrov je proces, ktorému predchádza zhodnotenie podobnosti na viacerých úrovniach, primárne podobnosť medzi vlnami klastrov, ich prekryv, výskyt na rovnakých tetródach, rovnaké amplitúdy s Gaussovým rozdelením, podobnosť autokorelogramu, krosskorelogramu. Po zhodnotení základných parametrov sa môžu posúdiť aj detailnejšie parametre, no väčšinou je týchto 7 spomenutých postačujúcich pre adekvátne zhodnotenie podobnosti a spojenie podobných klastrov do jedného.

id	ch	sh	depth	fr	amp	n_spikes	similarity ▼
25	35	0	9.00	2.00	297.75	2010	0.892
4	33	0	9.00	0.78	267.71	779	0.835
155	32	0	9.00	15.60	384.50	15673	0.781

Obrázok 11: Okno s náhľadom na detaily klastra a jeho podobnosť (similarity) s iným klastrom. Podobnosť klastra je definovaná hodnotami 0 (žiadna) až 1 (veľmi vysoká)

7. **Klasifikácia pyramídálnych neurónov a interneurónov :** rozdelenie neurónov prebiehalo na základe vzhľadu autokorelogramov, interneuróny sme do analýz nezahrnuli



Obrázok 12: (A) pyramídálny neurón, (B) interneurón

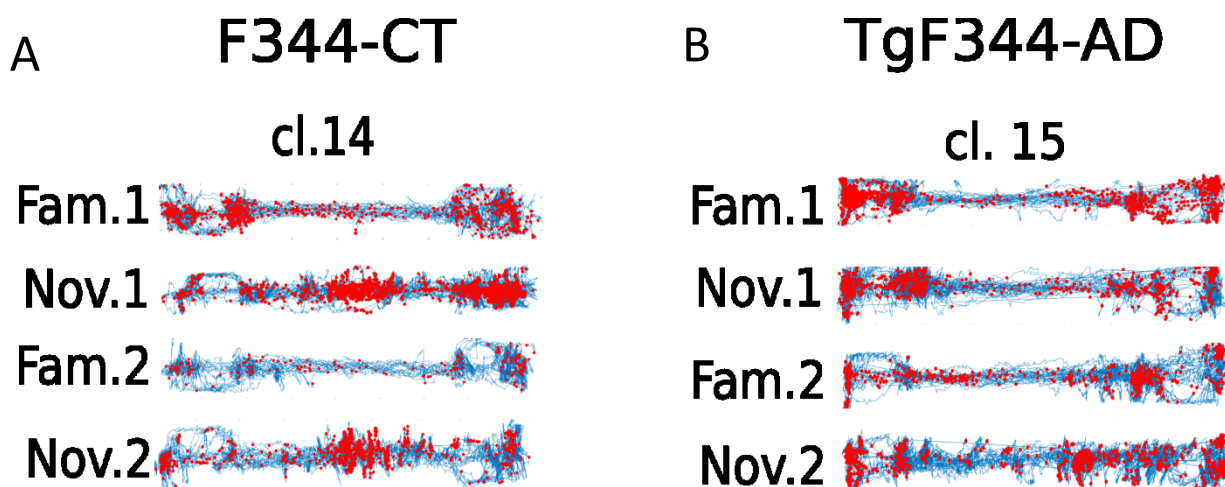
6.2.10 Metodika tvorby place fields

Po kontrole klastrovania v programe phy-GUI sa jednotlivé klastre analyzovali programom Matlab (MathWorks). V prvom kroku boli extrahované časy jednotlivých spajkov patriacich pod jeden klaster. Extrakcia prebiehala zo súboru dát, ktorý obsahoval časy všetkých zaznamenaných spajkov (akčných potenciálov) celej nahrávky (dátový súbor spike_times.npy predvytvorený klastrovacím algoritmom kilosort). V nasledujúcom kroku bola z pôvodnej nahrávky extrahovaná trajektória pomocou skriptov v prostredí Matlab.

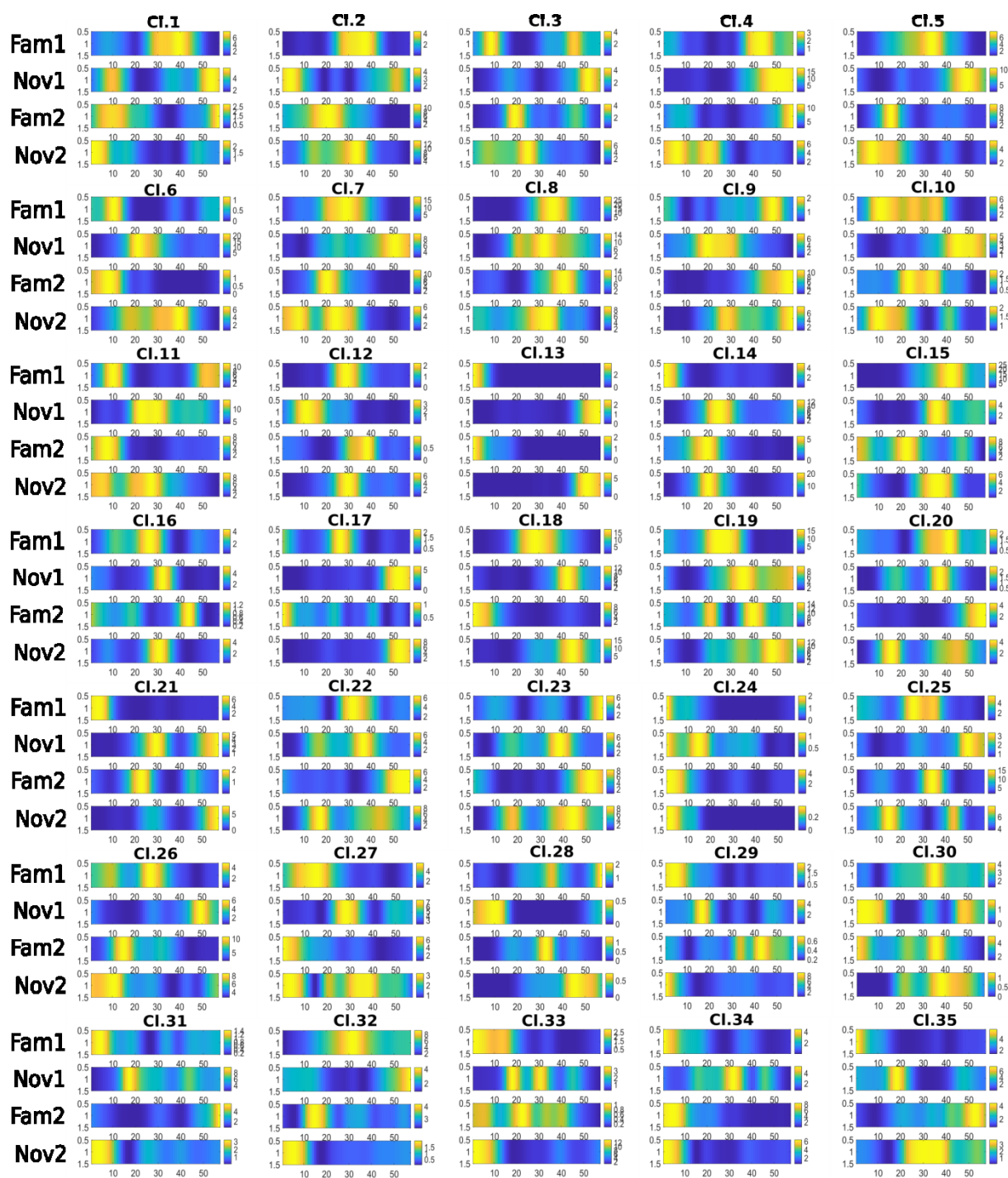
Pre vytvorenie priestorovej reprezentácie v lineárnej dráhe boli použité populácie neurónov. Pre párovanie neurónov a trajektórie sa použili časy počas aktívneho pohybu

s filtrom pre rýchlosť pohybu. Filter bol použitý pre odfiltrovanie trajektórií, v ktorých rýchlosť pohybu, nedosahovala 5 cm/s. Trajektória a časy spajkov pre jednotlivé klastre boli následne rozdelené na 57 binov, ktorých každý bin reprezentoval úsek o veľkosti 3cm dĺžky lineárnej dráhy. Hodnoty binov trajektorie a časy spajkov boli následne podelené. Podielom vzniklo rovnomerné rozdelenie aktivít pre celú dĺžku prostredia.

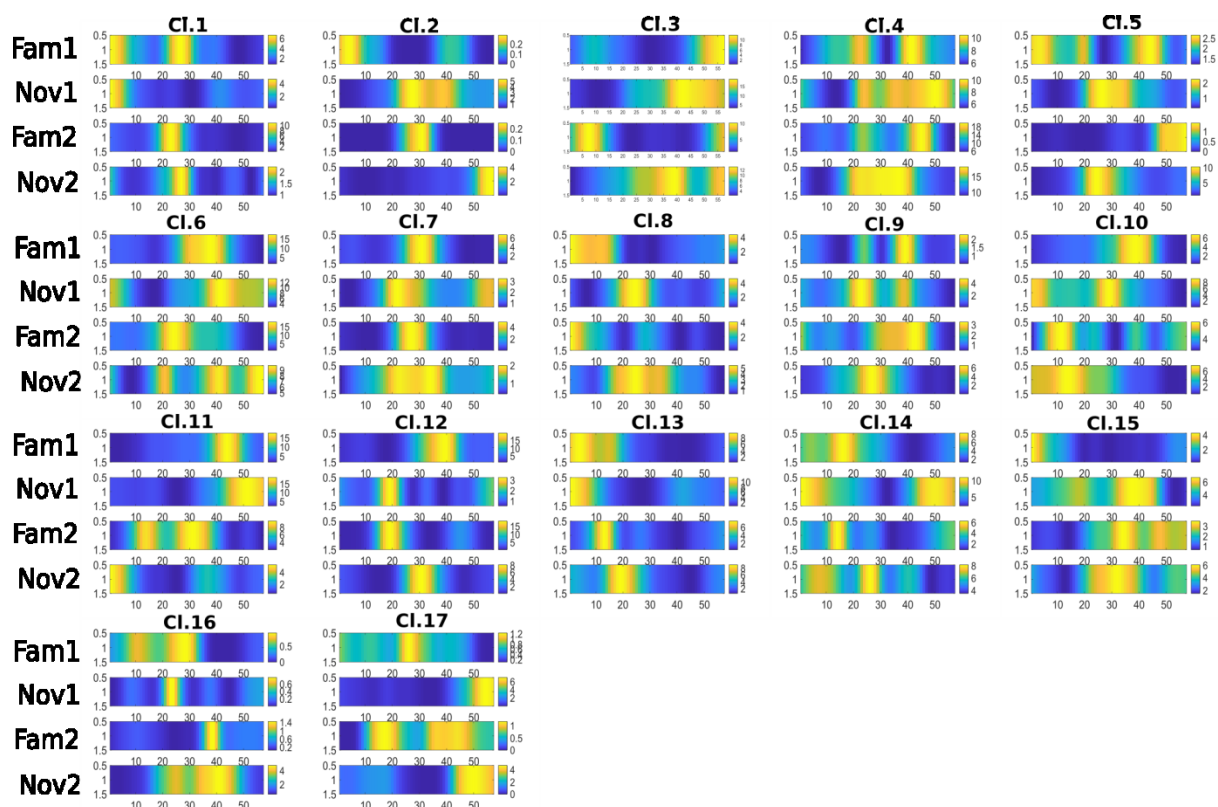
Jednotlivé place fields následne slúžili na analýzu stability priestorovej mapy a remapovanie prostredia v populačných korelačných analýzach. Korelované boli Familiárne prostredia 1,2 a Familiárne 1 a Nové 1 medzi sebou.



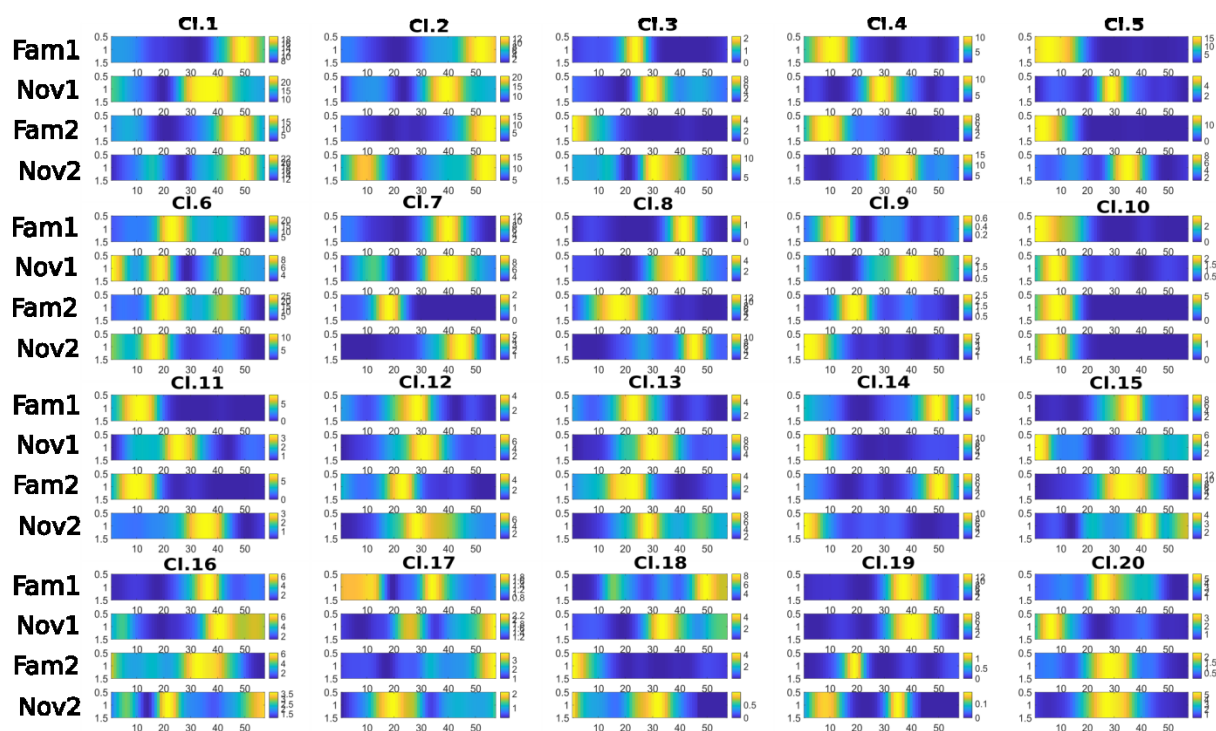
Obrázok 13: Ukážka aktivity klastra (červené bodky) na trajektórii (modrá farba) vo familiárnom prostredí 1 a 2 (Fam1, Fam2) a novom prostredí 1 a 2 (Nov1, Nov2) u potkanov línie F344-CT (A) a TgF344-AD (B), z ktorej boli následne vytvárané place fields pre jednotlivé klastre, použité v korelačných analýzach.



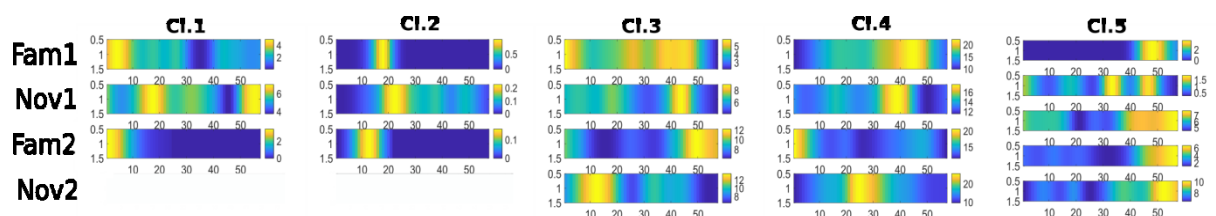
Obrázok 14: Obrázok je tvorený 35 grafmi, v ktorých (jeden graf) je graficky znázornený place field jedného klastra vo všetkých prostrediach (Fam1,Nov1,Fam2,Nov2) u potkanov línie F344-CT pred podaním inhibítora FTO demetylázy. Dĺžka jedného prostredia v grafe (os x) predstavuje 57 binov, modrá farba zobrazuje nízku až nulovú aktivitu, žltá maximálnu aktivitu pálenia akčných potenciálov (sp/s).



Obrázok 15: Obrázok je tvorený 17 grafmi, v ktorých (jeden graf) je graficky znázornený place field jedného klastra vo všetkých prostrediach (Fam1,Nov1,Fam2,Nov2) u potkanov línie F344-CT po podaní inhibítora FTO demetylázy. Dĺžka jedného prostredia v grafe (os x) predstavuje 57 binov, modrá farba zobrazuje nízku až nulovú aktivitu, žltá maximálnu aktivitu pálenia akčných potenciálov(sp/s).



Obrázok 16 : Obrázok je tvorený 20 grafmi, v ktorých (jeden graf) je graficky znázornený place field jedného klastra vo všetkých prostrediach (Fam1,Nov1,Fam2,Nov2) u potkanov línie TgF344-AD pred podaním inhibítora FTO demetylázy. Dĺžka jedného prostredia v grafe (os x) predstavuje 57 binov, modrá farba zobrazuje nízku až nulovú aktivitu, žltá maximálnu aktivitu pálenia akčných potenciálov(sp/s).



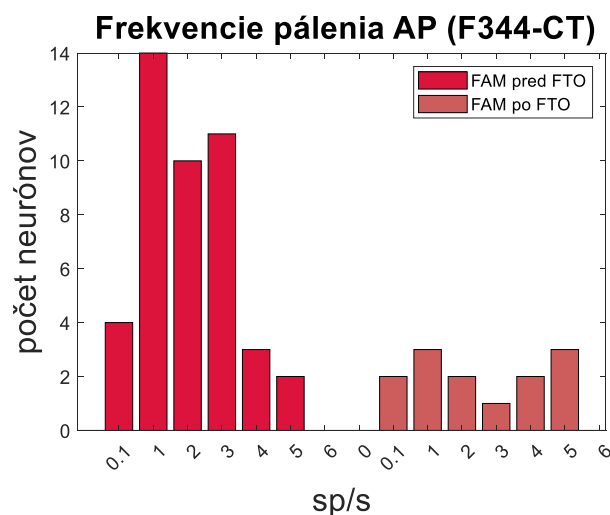
Obrázok 17: Obrázok je tvorený 5 grafmi, v ktorých (jeden graf) je graficky znázornený place field jedného klastra vo všetkých prostrediach (Fam1,Nov1,Fam2,Nov2) u potkanov línie TgF344-AD po podaní inhibítora FTO demetylázy. Dĺžka jedného prostredia v grafe (os x) predstavuje 57 binov, modrá farba zobrazuje nízku až nulovú aktivitu, žltá maximálnu aktivitu pálenia akčných potenciálov (sp/s). V prvých dvoch grafoch chýba posledné prostredie, ktoré u daného potkana nebolo nahrané. Na poslednom grafe je nové prostredie rozdelené na 2(spodný a predposledný sekundárny graf).

7 Výsledky

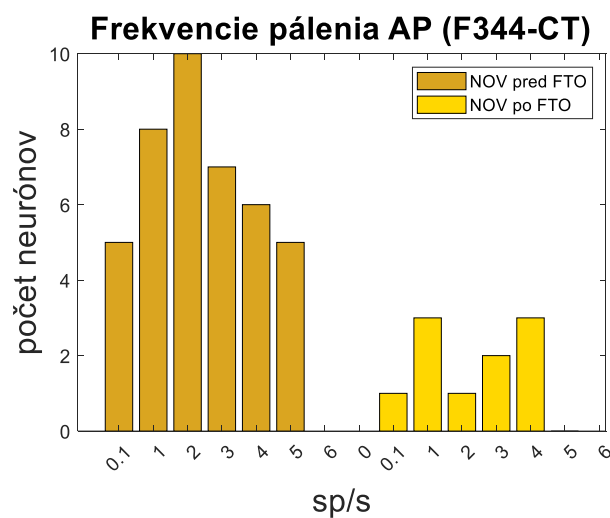
Pre analýzu výsledkov získaných z nahrávaní jednotkových aktivít neurónov hipokampálnej podoblasti CA1 pred a po aplikácii inhibítora FTO demetylázy (MO-I-500) boli využité skripty písané v programovacom prostredí Matlab, vytvorené a používané členmi laboratória pre ich všetky prebiehajúce experimenty. Analyzovali sme získané neuróny z 8 potkaních samcov, z ktorých 4 (PN1= 4) boli z kontrolnej línie F344-CT a 4 (PN2 = 4) boli z línie TgF344-AD. Počet získaných neurónov zo samcov F344-CT, bol 70 ($n_1 = 70$), z 1. nahrávania sme získali 52 neurónov, z 2. nahrávania 18 neurónov. Celkový počet neurónov získaných zo samcov TgF344-AD bol 36 ($n_2 = 36$), z 1. nahrávania sme získali 24 neurónov, z 2. nahrávania 12 neurónov. Pre nízky počet buniek, sme zvolili populačné analýzy „all cells pool“ z jednotlivých nahrávaní. Populačné analýzy place cells, sa dlhodobo využívajú v oblasti elektrofyziológie (napr. Jensen & Lisman, 2000, Jun et al., 2020). V rámci analýz sme zvolili porovnania nameraných dát z prvého nahrávania pred podaním inhibítora FTO demetylázy s nahrávaním po podaní inhibítora FTO demetylázy. Porovnania sme robili najskôr samostatne pre každú líniu, v ktorých sme urobili porovnanie pre aktivitu pálenia akčných potenciálov a následne sme Pearsonovým korelačným koeficientom porovnali stabilitu priestorovej mapy medzi dvomi familiárnymi prostrediami (Fam1xFam2) a remapovania mapy medzi prostrediami familiárne1 a nové1 (Fam1xNov1). Zo získaných hodnôt korelácií sme následne urobili multifaktoriálne porovnanie interakcií medzi líniou a inhibítorom FTO demetylázy (MO-I-500). V rámci analýz sme dodatočné korekcie pre viacnásobné porovnania nerobili.

7.1 Analýza priemernej aktivity pálenia akčných potenciálov princípálnych neurónov pred a po podaní inhibítora FTO demetylázy (MO-I-500) u potkanov línie F344-CT a TgF344-AD vo familiárnom a novom prostredí

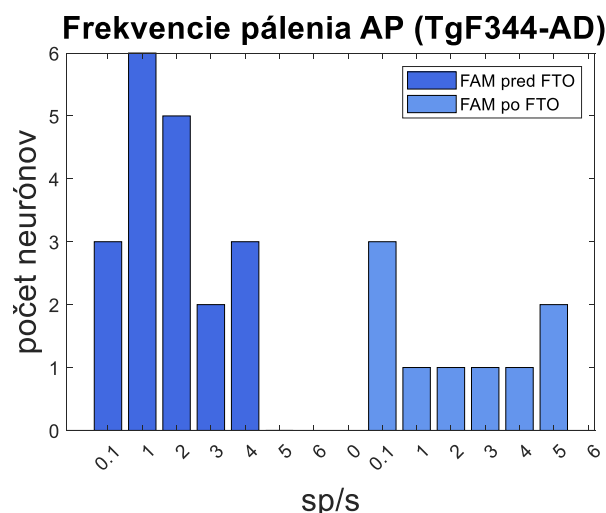
Pre analýzu priemernej aktivity place cells získaných z 1. a 2. elektrofyziológického nahrávania (pred a po podaní inhibítora FTO demetylázy (MO-I-500)) sme filtrovali neuróny, ktorých priemerná frekvencia pálenia akčných potenciálov sa nachádzala v intervale 0.1- 6.0 sp/s. Obe nahrávania (pred podaním inhibítora a po podaní inhibítora) obsahujú 2 familiárne (Fam1, Fam2) a 2 nové (Nov1, Nov2) prostredia, ktorých aktivita je navzájom spriemerovaná, do jedného FAM (FAM pred FTO; FAM po FTO) a jedného NOV(NOVpred FTO ;NOVpo FTO) prostredia . Zreteľné zníženie počtu buniek z druhého nahrávania v oboch prostrediach je spôsobené zníženým celkovým počtom nahraných buniek (12 neurónov).



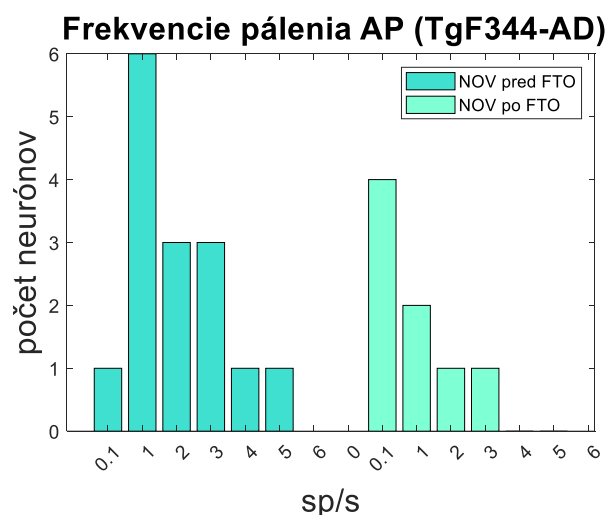
Obrázok 18: Porovnanie priemernej aktivity neurónov vo familiárnych prostrediach pred a po podaní inhibítora FTO demetylázy (MO-I-500) u potkanov línie F344-CT. Určené frekvencie v populácii (os x), počet neurónov reprezentujúcich danú frekvenciu (os y).



Obrázok 19: Porovnanie priemernej aktivity neurónov v nových prostrediach pred a po podaní inhibítora FTO demetylázy (MO-I-500) u potkanov línie F344-CT. Určené frekvencie v populácii (os x), počet neurónov reprezentujúcich danú frekvenciu (os y).



Obrázok 20: Porovnanie priemernej aktivity vo familiárnych prostrediach pred a po podaní inhibítora FTO demetylázy (MO-I-500) u potkanov línie TgF344-AD. Určené frekvencie v populácii (os x), počet neurónov reprezentujúcich danú frekvenciu (os y).

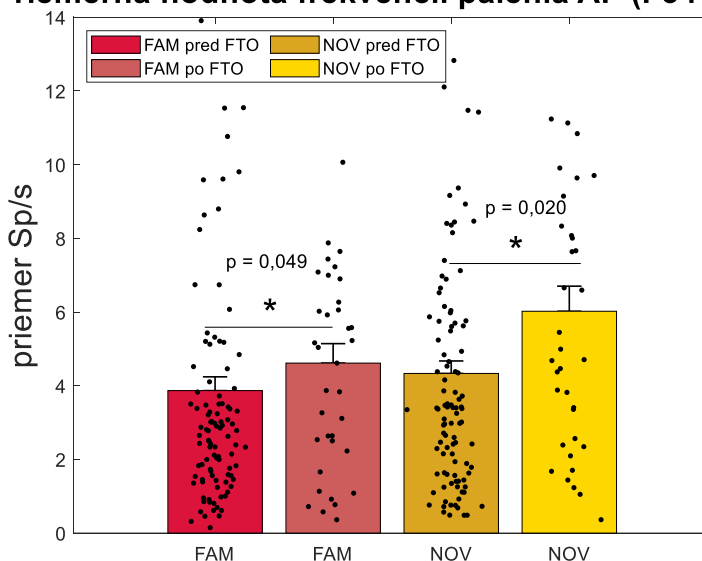


Obrázok 21: Porovnanie priemernej aktivity v nových prostrediach pred a po podaní inhibítora FTO demetylázy (MO-I-500) u potkanov línie TgF344-AD. Určené frekvencie v populácii (os x), počet neurónov reprezentujúcich danú frekvenciu (os y).

Pre analýzu priemeru priemernej aktivity place cells získaných z 1. elektrofyziologického nahrávania pred podaním inhibítora a 2. elektrofyziologického nahrávania po podaní inhibítora u potkaních samcov línií F344-CT a TgF344-AD sme získali priemerné hodnoty pre každé prostredie z oboch nahrávaní. Následne sme priemerné hodnoty (z 1. nahrávania a 2. nahrávania) štatisticky porovnali Wilcoxon rank sum testom. Štatisticky signifikantný výsledok sme dostali pre obe prostredia u samcov línie F344-CT (Obrázok 22), pričom priemerná aktivita pálenia AP sa zvýšila po podaní inhibítora FTO demetylázy. Pred podaním inhibítora sme namerali priemernú aktivitu pre familiárne prostredie (FAM pred FTO) $3,86 \pm 0,37 \text{ sp/s}$

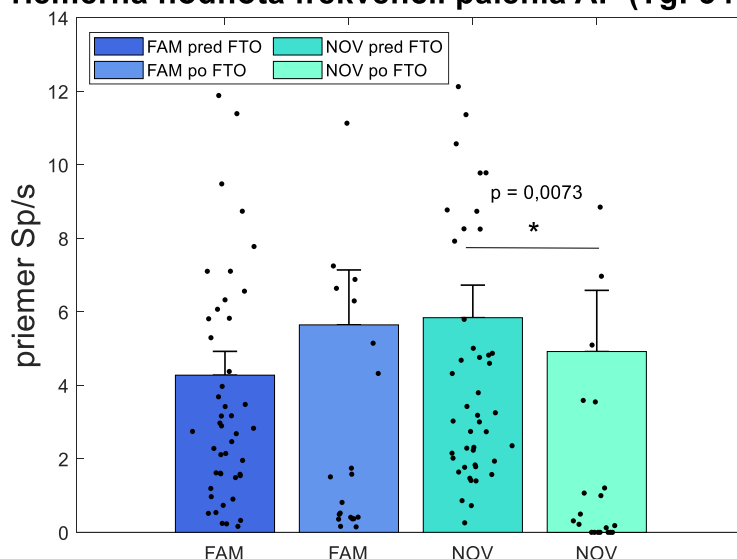
(priemer $\pm$ SEM), po podaní (FAM poFTO) sme namerali priemernú frekvenciu $4,61 \pm 0,52$ sp/s. Hodnota bola mierne zvýšená a štatistický test nám ukázal štatistickú signifikanciu $p = 0,049$ (alfa = 0,05). V novom prostredí sme pred podaním inhibítora (NOV pred FTO) namerali priemernú hodnotu $4,33 \pm 0,33$ sp/s , ktorá sa po podaní inhibítora (NOV poFTO) rovnako zvýšila na $6,02 \pm 0,68$ sp/s so štatisticky signifikantným výsledkom $p = 0,020$ (alfa = 0,05). U samcov línie TgF344-AD (Obrázok 23) sme vo familiárnom prostredí namerali pred podaním inhibítora (FAM pred FTO) hodnotu $4,27 \pm 0,64$ sp/s , po podaní inhibítora (FAM poFTO) sa hodnota zvýšila na $5,64$ sp/s , no rozdiel nebol štatisticky signifikantný ($p = 0,57$; alfa 0,05). V novom prostredí sme namerali pred podaním inhibítora (NOV predFTO) priemernú hodnotu $5,84$ sp/s ($\pm 0,88$ SEM), po podaní inhibítora (NOV po FTO) sme namerali priemernú hodnotu $4,91$ sp/s ($\pm 1,66$ SEM). Rozdiel v priemernej aktivite bol štatisticky signifikantný $p = 0,0073$ (alfa 0,05).

Priemerná hodnota frekvencie pálenia AP (F344-CT)



Obrázok 22: Analýza priemeru priemernej aktivity neurónov u línie F344-CT vo familiárnom (FAM) a novom (NOV) prostredí pred a po podaní inhibítora FTO demetylázy. Priemerné hodnoty pre familiárne (FAM pred FTO= $3,86$ sp/s) a nové (NOV pred FTO= $4,33$ sp/s) prostredie sa po podaní inhibítora FTO demetylázy štatisticky signifikantne zvýšili pre obe prostredia (FAM po FTO= $4,61$ sp/s; NOV po FTO= $6,02$ sp/s; $p = 0,049$, $p = 0,020$). Error bar zobrazuje štandardnú chybu priemeru (SEM)

Priemerná hodnota frekvencií pálenia AP (TgF344-AD)



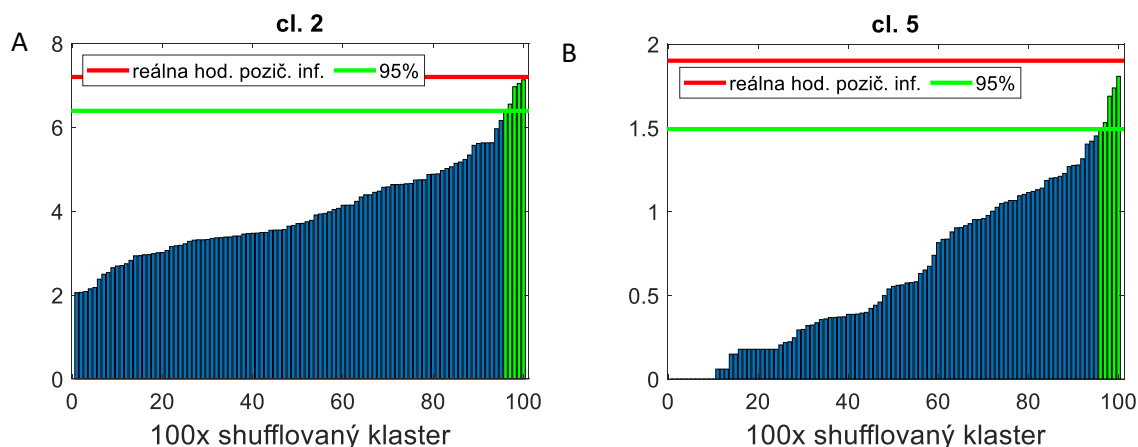
Obrázok 23: Aktivita neurónov u línie TgF344-AD vo familiárnom (FAM) a novom (NOV) prostredí pred a po podaní inhibítora FTO demetylázy. Priemerné hodnoty pre familiárne (FAM pred FTO= 4,27 sp/s) a nové (NOV pred FTO= 5,84 sp/s) sa po podaní inhibítora FTO demetylázy zvýšili v prípade familiárneho prostredia (FAM po FTO = 5,64 sp/s) no zvýšenie nebolo signifikantné ($p = 0,57$). V prípade nového prostredia sa hodnota naopak znížila štatisticky signifikantne (NOV po FTO=4,91 sp/s, $p = 0,0073$). Error bar zobrazuje štandardnú chybu priemeru (SEM)

7.2 Priestorové korelácie neurónov miesta pred a po podaní inhibítora FTO demetylázy (MO-I-500) u samcov línie F344-CT a TgF344-AD

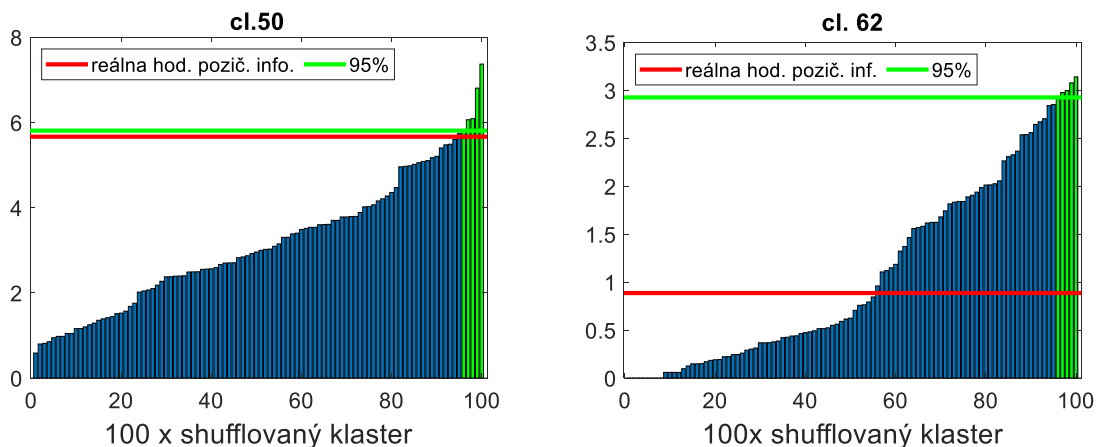
Pre populačnú korelačnú analýzu neurónov získaných z 1. a 2. nahrávania, sme na základe výpočtu pozičnej informácie selektovali neuróny, ktoré vykazovali priestorovú špecifitu vyššiu ako náhodnú. Na selekciu neurónov sme využili metódu shufflingu, v ktorej sa sekvencia pálených akčných potenciálov jedného klastra (čas spajkov) posúva v závislosti od trajektórie s 20 sek. intervalmi. Z vytvorených 100 náhodných shufflov pre každý klaster, sme vyčlenili tie klastre, ktorých hodnota 95 percentilu zo 100 shufflovaných hodnôt bola nižšia ako reálna hodnota pozičnej informácie daného klastra. Len tie neuróny, ktoré prešli shufflovacím „filtrom“ v aspoň jednom prostredí, boli následne korelované v rámci toho daného prostredia. Dodatočne sme zohľadnili aj smery z A do B resp. B do A na základe smerovosti neurónov (Battaglia et al., 2004; Navratilova et al., 2012).

Po filtrovaní sme získali 62 neurónov z celkového počtu ($n_1=70$) tzn. 88,57% v prípade samcov línie F344-CT a 28 neurónov z celkového počtu ($n_2 = 36$) tzn. 77,77% v prípade

samcov línie TgF344-AD. Pre overenie rozdielu medzi získanými hodnotami a či je výťažnosť závislá od línie, sme získané hodnoty porovnali štatistickým Chi kvadrát testom, ktorého výsledok nebol štatisticky signifikantný ($p = 0,14$; $\chi^2 = 2,16$). Získané hodnoty po filtrovaní nie sú závislé od línie.



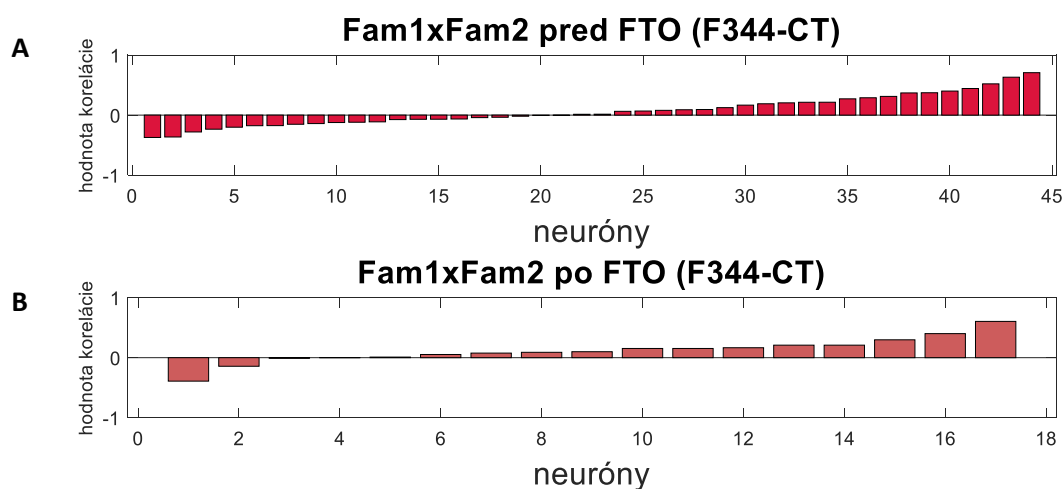
Obrázok 24: Oba grafy(A,B) zobrazujú 100x hodnôt pozičnej informácie vypočítanej pre príslušný shufflovaný klaster (každý graf je jeden klaster) a usporiadaných vzostupne (os x). Zelená línia reprezentuje hodnotu 95 percentilu (os y) shufflovaných dát, ktorá je nižšia ako reálna hodnota pozičnej informácie daného klastra (červená línia) (os y). Oba klastre pochádzajú z línie F344-CT, prvý klaster (cl.2) z prvého nahrávania pred podaním inhibítora (A), druhý klaster(cl.5) z druhého nahrávania po podaní inhibítora (B). Oba klastre sme klasifikovali hodnotou 1, tzn. prešli shufflovacím „filtrom“ a následne sme ich zahrnuli do populačných korelačných analýz.



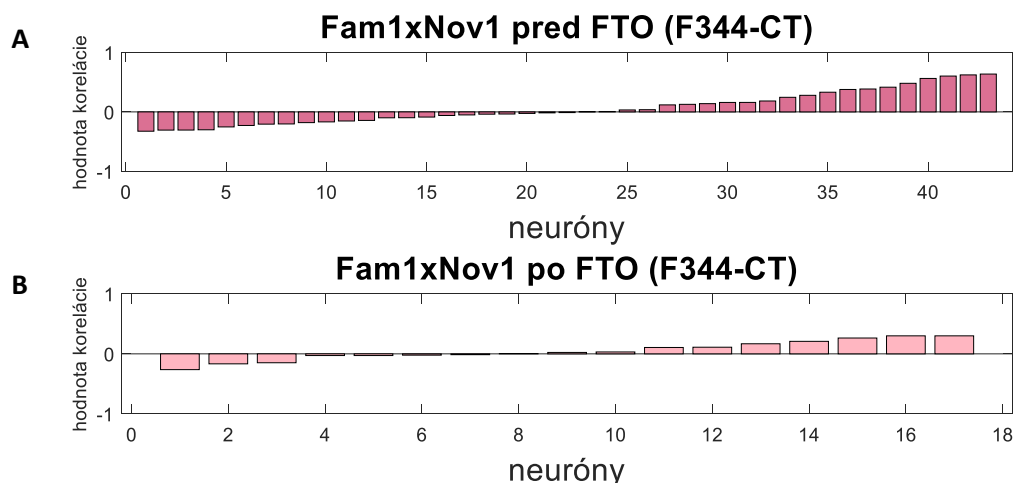
Obrázok 25: Oba grafy zobrazujú 100x hodnôt pozičnej informácie vypočítanej pre príslušný shufflovaný klaster (každý graf je jeden klaster) a usporiadaných vzostupne (os x). Zelená línia reprezentuje hodnotu 95 percentilu (os y) shufflovaných dát, ktorá je vyššia ako reálna hodnota pozičnej informácie daného klastra (červená línia) (os y). Oba klastre sme klasifikovali hodnotou 0, tzn. neprešli shufflovacím „filtrom“ a neboli následne zahrnuté v populačných analýzach.

Pre populačnú korelačnú analýzu neurónov sme využili Pearsonov korelačný koeficient, ktorý sleduje lineárnu závislosť medzi premennými a jeho interval kolíše od -1 (maximálna antikorelácia) po +1 (maximálna korelácia).

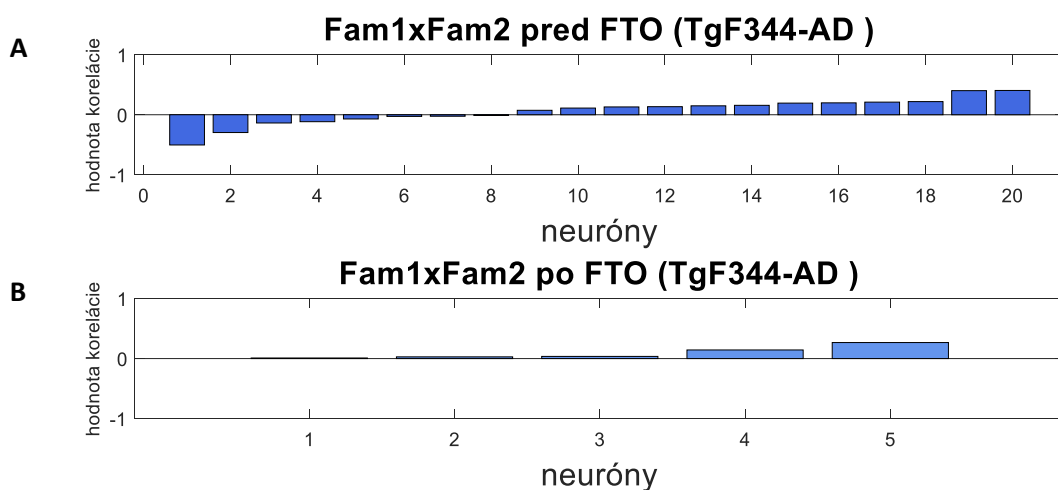
Pre porovnanie stability priestorovej mapy prostredí sme korelovali hodnoty place field každého neurónu z dvoch familiárnych prostredí (Fam1xFam2). Pre porovnanie remapovania mapy prostredí sme korelovali rovnaké neuróny v rámci familiárneho a nového prostredia (Fam1xNov1). Sledovanie stability mapy a remapovania sme hodnotili pred a po podaní inhibítora. U samcov línie F344-CT sme korelovali 44 neurónov v Fam1xFam2 a Fam1xNov1 prostrediach pred podaním inhibítora. Po podaní inhibítora sme získali 17 neurónov. U samcov línie TgF344-AD sme korelovali 17 neurónov v Fam1xFam2 a 22 neurónov v Fam1xNov1 prostredí pred podaním inhibítora a 5 neurónov v Fam1xFam2 a Fam1xNov1 prostredí po podaní inhibítora.



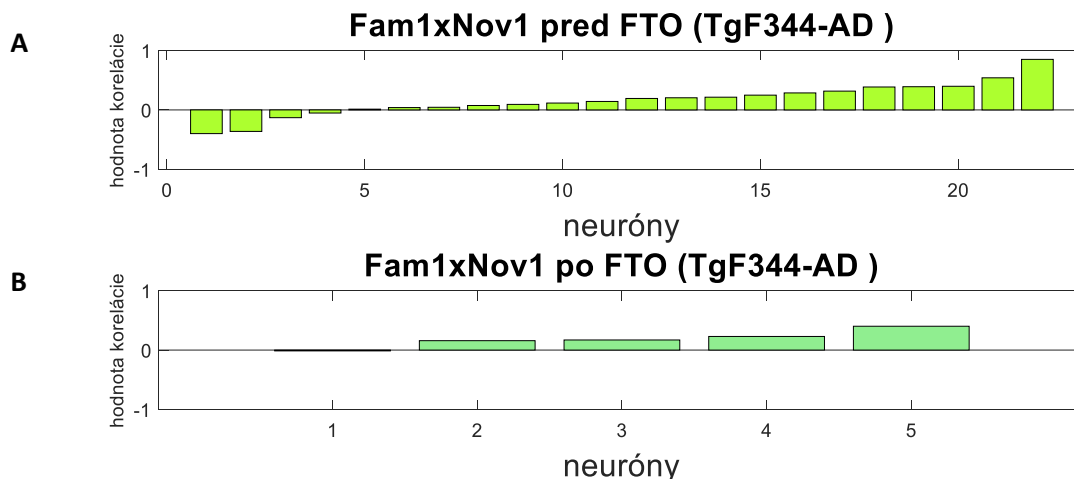
Obrázok 26: Hodnoty korelácií (os y) neurónov (os x) dvoch familiárnych prostredí (Fam1xFam2) nahraných zo samcov línie F344-CT pred (A, 44 neurónov) a po podaní inhibítora FTO demetylázy (B, 17 neurónov).



Obrázok 27: Hodnoty korelácií(os y) neurónov (os x) familiárneho a nového (Fam1xNov1) prostredia, nahraných zo samcov línie F344-CT pred (A, 43 neurónov) a po podaní inhibítora FTO demetylázy (B, 17 neurónov).



Obrázok 28: Hodnoty korelácií (os y) neurónov (os x) dvoch familiárnych prostredí(Fam1xFam2), nahraných zo samcov línie TgF344-AD pred (A, 20 neurónov) a po podaní inhibítora FTO demetylázy (B, 5 neurónov).



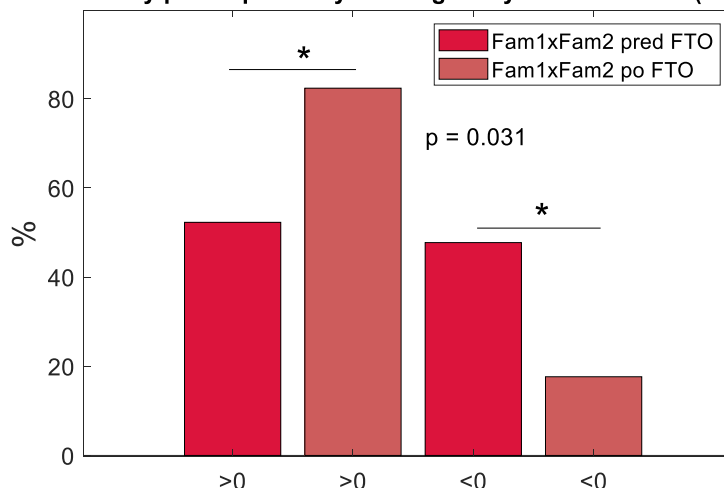
Obrázok 29: Hodnoty korelácií (os y) neurónov (os x) familiárneho a nového (Fam1xFam2) prostredia nahraných zo samcov línie TgF344-AD pred (A, 22 neurónov) a po podaní inhibítora FTO demetylázy (B, 5 neurónov).

7.2.1 Korelačné koeficienty pred a po podaní inhibítora FTO demetylázy (MO-I-500)

Vplyv farmakologickej inhibície FTO demetylázy na priestorové koreláty prostredí sme vyhodnocovali použitím Chi kvadrát testu. Korelácie sme rozdelili na pozitívne a negatívne pre všetky korelované prostredia a rámci testu sme sledovali zvýšenie alebo zníženie pozitívnych a negatívnych korelácií po podaní inhibítora.

U samcov línie F344-CT sa po podaní inhibítora percento pozitívnych korelácií z familiárnych prostredí štatisticky signifikantne zvýšilo z 52,27% na 82,35% . Percento negatívnych korelácií sa rovnako štatisticky signifikantne znížilo z 47,72% na 17,64% ($p = 0,031$, $X^2 = 4,64$).

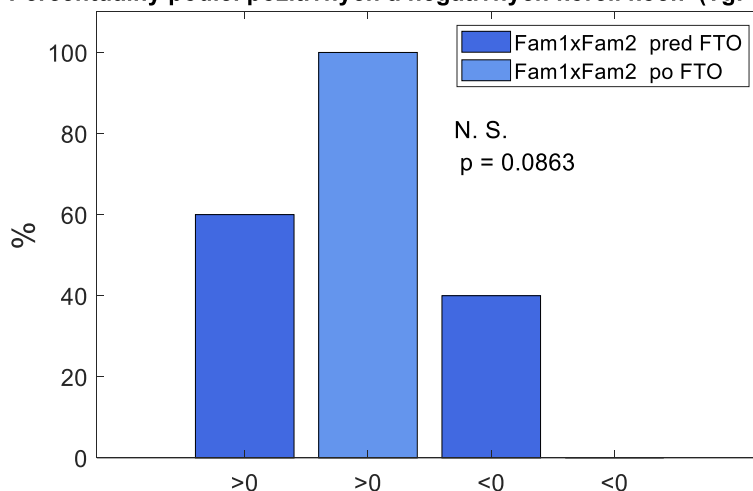
Percentuálny podiel pozitívnych a negatívnych korel. koef. (F344-CT)



Obrázok 30: Percentuálne zastúpenie (os y) pozitívnych a negatívnych korelácií (os x) z familiárnych prostredí (Fam1xFam2) pred a po podaní inhibítora FTO demetylázy (MO-I-500) so štatisticky významným výsledkom ($p=0,031$).

U samcov línie TgF344-AD sa po podaní inhibítora percento pozitívnych korelácií z familiárnych prostredí zvýšilo zo 60% na 100%. Percento negatívnych korelácií, sa znížilo zo 40% na 0. Ani jeden výsledok nebol štatisticky signifikantný ($p = 0,086$, $X^2 = 2,94$). Značný rozdiel v negatívnych koreláciách je ovplyvnený veľmi nízkym počtom korelovaných neurónov, ktorých počet bol 5.

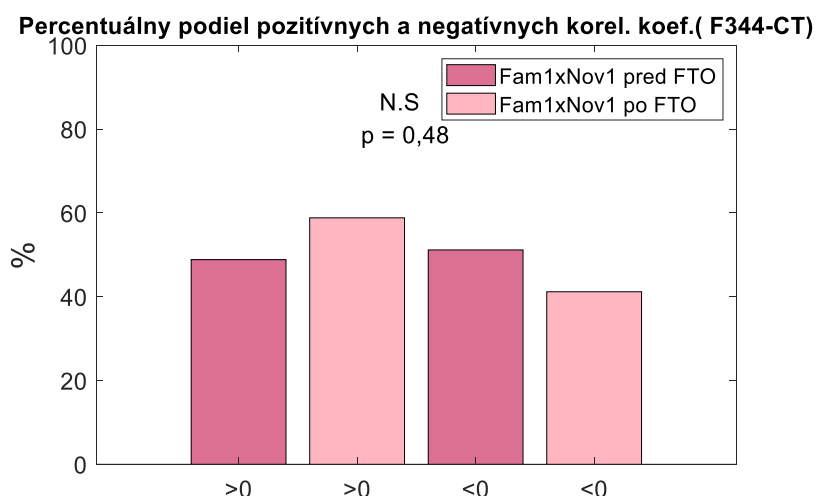
Percentuálny podiel pozitívnych a negatívnych korel. koef. (TgF344-AD)



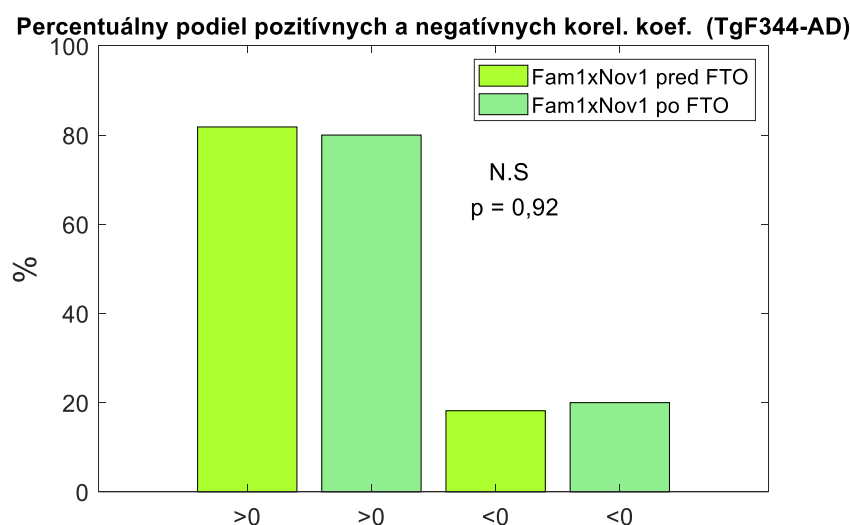
Obrázok 31: Percentuálne zastúpenie (os y) pozitívnych a negatívnych korelácií (os x) medzi familiárnymi (Fam1xFam2) prostrediami pred a po podaní inhibítora FTO demetylázy (MO-I-500) u samcov línie TgF344-AD so štatisticky nevýznamným výsledkom ($p= 0,086$).

Rovnako sme analyzovali korelačné koeficienty získané z výpočtu medzi familiárnym a novým prostredím. Cieľom analýzy bolo posúdenie remapovania medzi prostrediami. Ani u jednej línie sme nezistili štatisticky signifikantný výsledok. Podiel pozitívnych a negatívnych

korelácií po podaní inhibítora bol skoro rovnaký ako pred podaním inhibítora pre obe línie (F344-CT $p = 0,48$; $\chi^2 = 0,48$; TgF344-AD $p = 0,92$; $\chi^2 = 0,008$) (Obrázok 32; Obrázok 33).



Obrázok 32: Percentuálne zastúpenie (os y) pozitívnych a negatívnych korelácií (os x) medzi familiárnym a novým (Fam1xNov1) prostredím pred a po podaní inhibítora FTO demetylázy (MO-I-500) u samcov línie F344-CT bez štatisticky signifikantného výsledku ($p = 0,92$).



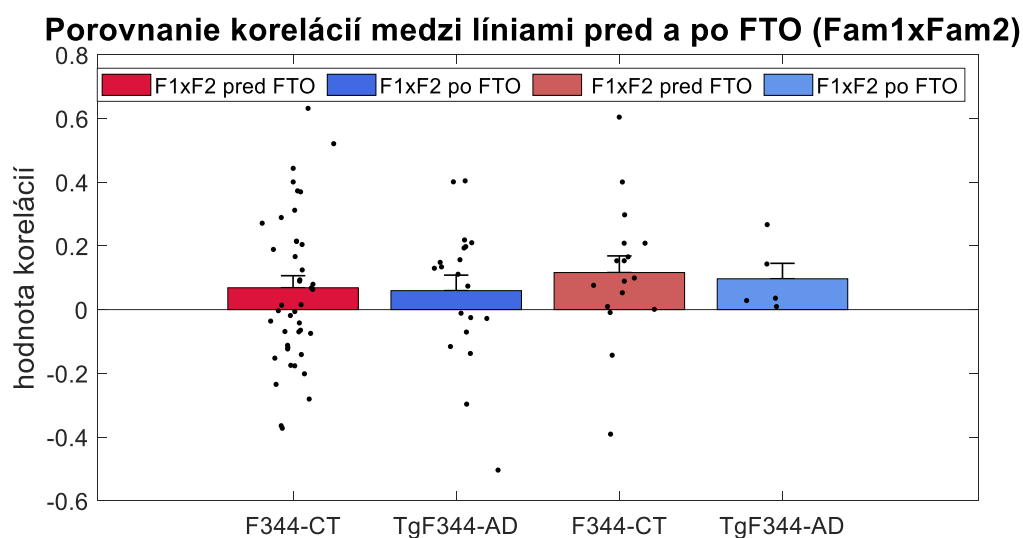
Obrázok 33: Percentuálne zastúpenie (os y) pozitívnych a negatívnych korelácií (os x) medzi familiárnym a novým (Fam1xFam2) prostredím pred a po podaní inhibítora FTO demetylázy (MO-I-500) u samcov línie TgF344-AD bez štatisticky signifikantného výsledku ($p = 0,92$).

V rámci ďalšej analýzy sme štatisticky, multifaktoriálnou ANOVOU, porovnali hodnoty korelácií nameraných z familiárných (Fam1xFam2) a familiárne-nové (Fam1xNov1) prostredí pred a po podaní inhibítora, medzi líniami F344-CT a TgF344-AD. Pre familiárne (Fam1xFam2) prostredia sme získali pre faktor skupiny (obe línie) výsledok testu $F(1) = 0,046$, $p = 0,83$. Porovnanie interakcie faktora FTO (pred a po) sme získali výsledok s hodnotou $F(1)$

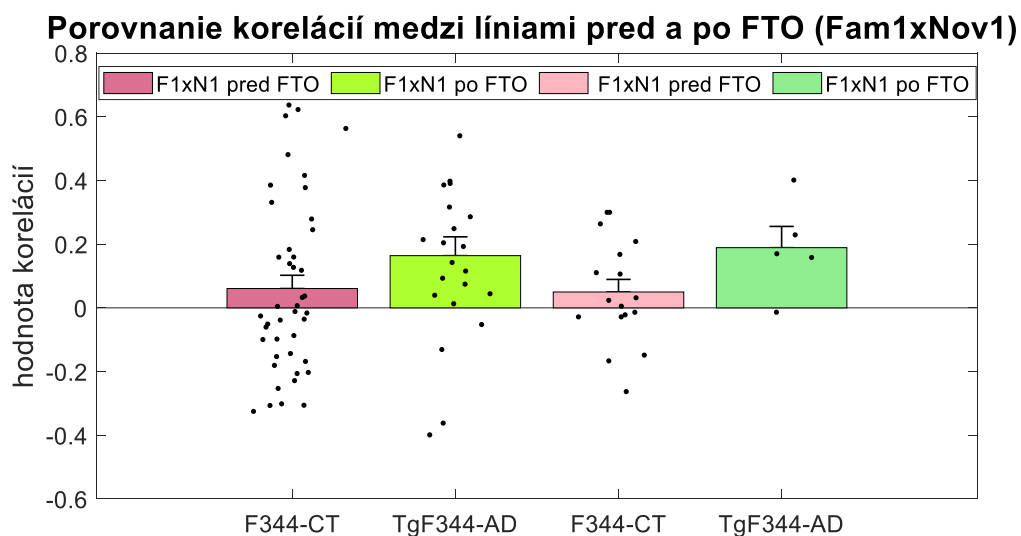
= 0,40 , $p = 0,52$. Porovnanie interakcie faktora skupiny a faktora FTO sme získali hodnotu $F(1) = 0,006$, $p = 0,93$.

Pre familiárne1- nové1 (Fam1xNnov1) prostredia sme získali pre faktor skupiny(obe línie) výsledok testu $F(1) = 2,83$, $p = 0,095$. Porovnanie interakcie faktora FTO (pred a po) sme získali výsledok s hodnotou $F(1) = 0,0094$, $p = 0,922$. Porovnanie interakcie faktora skupiny a faktora FTO sme získali hodnotu $F(1) = 0,062$, $p = 0,803$.

Ani jedna analýza nám nevyšla so štatisticky signifikantným výsledkom, ktorý by potvrdil interakciu medzi sledovanými parametrami. Post-hoc analýzy sme preto ďalej nerobili.



Obrázok 34 : Porovnanie priemernej hodnoty korelácie (os y) vyrátanej zo všetkých získaných hodnôt korelácií (čierne body) vo familiárnom (Fam1xFam2) prostredí pre každú líniu (os x) pred a po podaní inhibítora FTO demetylázy (MO-I-500). Hodnoty korelácií pre jednotlivé skupiny (priemer ± SEM) F344-CT pred FTO 0,06 ± 0,03; TgF344-AD pred FTO 0,05 ± 0,04 ; F344-CT po FTO 0,11 ± 0,05; TgF344-AD po FTO 0,09 ± 0,04.



Obrázok 35: Porovnanie priemernej hodnoty korelácie (os y) vyrátanej zo všetkých získaných hodnôt korelácií (čierne body) vo familiárnom (Fam1xNov1) prostredí pre každú líniu (os x) pred a po podaní inhibítora FTO demetylázy (MO-I-500). Hodnoty korelácií pre jednotlivé skupiny (priemer ± SEM) F344-CT pred FTO $0,06 \pm 0,04$; TgF344-AD pred FTO $0,16 \pm 0,05$; F344-CT po FTO $0,04 \pm 0,03$; TgF344-AD po FTO $0,18 \pm 0,06$.

8 Diskusia

Priestorová orientácia hlodavcov je dlhodobo využívaná pre štúdium pamäťových mechanizmov na rôznych úrovniach. Vo vedeckých prácach sa pre štúdium priestorovej orientácie cieľi na hipokampálnu formáciu, na ktorú sme sa v práci zamerali aj my.

V našej práci sme experimentálne otestovali vplyv inhibítora RNA demetylázy FTO v potkaňom modeli Alzheimerovej choroby. Práca nadväzovala na diplomovú prácu Petry Pohanovej (Pohanová, 2019), ktorej sa podarilo zistiť zlepšenie výsledkov v pamäťovom teste AAPA u samíc, ktorým bol podaný rovnaký typ farmakologického inhibítora FTO demetylázy (MO-I-500). No zlepšenie v teste strachového podmieňovania po inhibícii FTO demetylázy dosiahli aj v práci Walters et al., 2017 (Walters et al., 2017). Vplyv inhibície FTO demetylázy sa doposiaľ nepodarilo otestovať elektrofyziologicky na bunkách hipokampu, ktoré sú dôležité pre epizodickú formu pamäti u voľne sa pohybujúcich experimentálnych zvierat.

Na experiment sme využili 8 potkaních samcov línií F344-CT (4 potkany) a TgF344-AD(4 potkany), ktoré sme natrénovali na experimentálne bludisko vo forme lineárnej dráhy (Metodika tréningu) a následne sme im implantovali do hipokampálnej podoblasti CA1 elektrofyziologický drive s tetródovými vláknami na zaznamenanie aktivity neurónov (Metodika implantácie). Po rekonvalescencii sme potkany nahrali prvý krát, pred podaním inhibítora (*1. Elektrofyziologické nahrávanie pred aplikáciou inhibítora FTO demetylázy (MO-I-500)*). Následne sme po dobu 6 dní aplikovali inhibítor FTO demetylázy (MO-I-500) *i.p.* Bezprostredne po poslednom dni aplikácie sme potkany nahrali druhý krát (*2. Elektrofyziologické nahrávanie po aplikácii inhibítora FTO demetylázy (MO-I-500)*). Obe nahrávania mali zhodný nahrávací protokol, ktorý pozostával z dvoch familiárnych prostredí (Familiárne 1 a 2) a dvoch nových prostredí (Nové 1 a 2) (Obrázok 5). Nahrané dáta z oboch nahrávaní sme analyzovali algoritmom (Metodika analýzy elektrofyziologických dát) (Pachitariu et al., 2016) v prostredí Matlab, ktorý zaznamenané spajky zatriedil do klastrov (každý klaster = jeden neurón) a následne sme vo vizualizačnom prostredí Phy-GUI skontrolovali kvalitu klastrovania (Metodika hodnotenia kvality klastrov). Zo získaných dát sme pomocou skriptov opäť v prostredí Matlab vytvorili place field pre každý klaster vo všetkých prostrediach (Familiárne 1,2 a Nové 1,2). Z oboch nahrávaní sme získali 106 neurónov, ktorých aktivitu sme využili v populačných analýzach pre odsledovanie vplyvu inhibítora na priestorovú orientáciu voľne sa pohybujúcich experimentálnych potkanov.

8.1 Analýza priemernej aktivity pálenia akčných potenciálov princípálnych neurónov pred a po podaní inhibítora FTO demetylázy (MO-I-500) u potkanov línie F344-CT a TgF344-AD vo familiárnom a novom prostredí

Ako prvé sme zvolili analýzu pálenia akčných potenciálov, v ktorej sme sledovali vplyv inhibítora na zmenu priemerných frekvencií pálenia AP, ktorá by mohla súvisieť so zvýšenou excitabilitou neurónov a ich zvýšenou spotrebou glukózy. Predpokladali sme, že po aplikácii inhibítora FTO demetylázy sa priemerná aktivita neurónov zvýši, čo sa nám aj čiastočne štatisticky potvrdilo použitím Wilcoxon rank sum testu. U samcov línie F344-CT (Obrázok 22) sme získali štatisticky signifikantný výsledok pre familiárne aj nové prostredie, pričom priemerná aktivita pálenia AP sa zvýšila po podaní inhibítora FTO demetylázy tak, ako sme aj predpokladali. U samcov línie TgF344-AD (Obrázok 23) sme štatisticky signifikantne dostali len jeden výsledok a to v prípade nového prostredia, v ktorom sa po aplikácii inhibítora, naopak, priemerná aktivita neočakávane znížila.

8.2 Priestorové korelácie neurónov miesta pred a po podaní inhibítora FTO demetylázy (MO-I-500) u samcov línie F344-CT a TgF344-AD

Pre analýzu stability priestorovej mapy sme zvolili prístup populačnej korelačnej analýzy, ktorou sme sledovali stabilitu a remapovanie prostredí. Pomocou Pearsonovej korelačnej analýzy sme porovnávali podobnosť place fields pre každý klaster (Obrázok 13), medzi familiárnym prostredím 1 a 2 a novým prostredím 1 a 2, v rámci jedného nahrávacieho dňa. Získané korelačné koeficienty sme následne rozdelili na dve skupiny pre obe línie potkanov a pre obe nahrávania (pred a po podaní inhibítora). V prvej skupine sme analyzovali percento pozitívnych korelácií, v druhej percento negatívnych korelácií. Obe skupiny reprezentovali pomer pozitívnej a negatívnej korelácie medzi testovanými prostrediami. Následne sme štatistickou analýzou (Chi kvadrát test) porovnávali skupiny pred podaním inhibítora a po podaní inhibítora. Zvýšenie pomeru pozitívnych korelácií pre familiárne prostredie po aplikácii inhibítora by znamenalo zlepšenie stability priestorovej mapy prostredia a pozitívny vplyv inhibítora na koreláty priestorovej orientácie. Naopak, zvýšenie negatívnych korelácií by znamenalo zhoršenie stability mapy prostredia a jeho negatívny vplyv. U samcov línie F344-CT sa po podaní inhibítora percento pozitívnych korelácií z familiárnych prostredí štatisticky signifikantne zvýšilo a percento negatívnych korelácií sa rovnako štatisticky signifikantne znížilo (Obrázok 30). V prípade samcov línie TgF344-AD sme nedostali štatisticky signifikantný výsledok po podaní inhibítora. Percento pozitívnych korelácií sa pre

familiárne prostredia zvýšilo a percento negatívnych korelácií sa znížilo, no nárast a pokles neboli dostatočné pre dosiahnutie štatistickej signifikancie (Obrázok 31).

Nepredpokladaným výsledkom boli analýzy korelácií medzi prostrediami familiárne - nové, ktorých zmena po podaní inhibítora nebola štatisticky signifikantná ani pre jednu líniu potkanov (Obrázok 32;Obrázok 33). Výsledné percento sa pre pozitívne a negatívne korelácie pred a po podaní inhibítora veľmi nezmenilo. Ako posledné sme sa rozhodli porovnať získané korelácie z jednotlivých prostredí medzi líniami. Štatistický test multifaktoriálnej ANOVY nám ale nepotvrdil štatisticky signifikantný výsledok ani pre jednu analýzu (Obrázok 34,Obrázok 35). ANOVA nám nepotvrdila vzájomné ovplyvnenie FTO inhibície alebo skupiny (lína).

Naše výsledky naznačujú zlepšenie stability priestorovej mapy familiárneho prostredia u potkaních samcov línie F344-CT, no zlepšenie sa u samcov línie TgF344-AD štatisticky nepreukázalo. Jedným z dôvodov je pravdepodobne pomerne nízky počet neurónov, nepostačujúci pre kvalitnejšie zhodnotenie a analýzu. V prípade korelačných analýz sme u línie TgF-344-AD pracovali s 36 neurónmi, pričom z prvého nahrávania sme mali 24 neurónov a z druhého len 12. Príčinou nízkeho počtu neuronálnych buniek by mohla byť jednak patológia (v prípade línie TgF344-AD), ako aj opätovné ladenie pred druhým nahrávaním. Po prvom nahrávaní sme tetródy povytiahli o niekoľko μm nad úroveň pyramídálnej vrstvy CA1 a pred druhým nahrávaním sme ich opäť pomaly posúvali do vrstvy CA1. Aj napriek jemným posunom sme ani u jedného potkana nedosiahli porovnateľný počet neurónov z druhého nahrávania, ako sme dosiahli v prvom nahrávaní. Priemerný počet klastrov na tetródu bol u samcov línie TgF344-CT z prvého nahrávania 2,42 cl/tet. Počas druhého nahrávania sme nahrali v priemere 1,50 cl/tet. V prípade línie TgF344-AD sme nahrali počas prvého nahrávania 2,23 cl/tet a z druhého nahrávania sme nahrali v priemere 1,76 cl/tet. Väčšina z nahraných klastrov boli klasifikované ako interneuróny, alebo neprešli shufflovacím filtrom a ďalej v analýzach zahrnuté neboli. Z celkového počtu klastrov z oboch nahrávani, ktorých bolo 342 po klastrovaní, sme pre analýzy získali 106 klastrov pre obe línie. Z toho dôvodu sme zvolili prístup populačnej analýzy „all cells pool“ a spojili všetky nahrané klastre z prvého nahrávania od samcov línie F344-CT do jedného súboru dát a samcov línie TgF344-AD do druhého súboru dát. Rovnako sme spojili klastre aj z druhého nahrávania a následne ich štatisticky porovnávali.

Naša pilotná štúdia pre otestovanie vplyvu inhibítora RNA demetylázy FTO (MO-I-500) na koordináty priestorovej pamäti je prvá farmakologická štúdia, v ktorej sme sledovali vplyv farmaka na mechanizmy pamäti. Výsledky našej práce sú zamerané len na stabilitu priestorovej mapy a jej remapovanie pomocou Pearsonových korelačných koeficientov, no analýzy, na ktorých pracujeme, sa zameriavajú špecificky na parametre jednotlivých place fields, ako je

napr. ich veľkosť. V štúdií sme obom potkaním líniam aplikovali inhibítor FTO demetylázy a prvé nahrávanie pred podaním inhibítora (1. *Elektrofyzilogické nahrávanie pred aplikáciou inhibítora FTO demetylázy (MO-I-500)*) sme použili ako kontrolné nahrávanie, s ktorým sa následne porovnávalo druhé nahrávanie, po podaní inhibítora (2. *Elektrofyzilogické nahrávanie po aplikácii inhibítora FTO demetylázy (MO-I-500)*). Naším ďalším cieľom je pridať do štúdie kontrolnú skupinu, ktorej bude aplikované len vehikulum, bez aktívnej látky a navýšiť aj celkový počet potkanov u oboch línii. V budúcnosti by sme chceli v rámci FTO štúdie otestovať vplyv inhibítora v inom behaviorálnom teste, nakoľko čerpáme zo štúdií v ktorých sa inhibítor testoval v testoch pre alocentrickú navigáciu (napr. AAPA (Pohanová, 2019)) a v ktorých boli experimentálne zvieratá tréňované na sledovanie zmien v prostredí s následným záznamom chybovosti v orientácii (učenie). Zvieratá v takýchto testoch priestorovej orientácie využívajú naučenú mapu prostredia, pričom by sme v teste vyskúšali použiť konkrétnu prácu alebo úlohu, ktorá by bola závislá od zmien v prostredí. Následná zaznamenaná aktivita správania, ale aj aktivita neurónov miesta, by bola použitá pre analýzy vplyvu inhibítora na mechanizmy učenia a pamäti. V štúdií je tiež možné využiť modernejšie experimentálne metódy, ako napríklad optogenetiku, ktorou by sme priamo kontrolovali aktivitu konkrétnych, plazmidom značených neurónov pomocou svetla (on/off).

9 Záver

Cieľom experimentálnej práce bolo otestovať vplyv inhibítora RNA demetylázy FTO na potkanom modeli Alzheimerovej choroby TgF344-AD s mutáciou PSEN1 a deltaE9 amyloidového-prekurzorového proteínu (APP). Behaviorálne experimenty u týchto zvierat potvrdili zníženie kognície v teste Morisovho vodného bludiska, v Barnesovej bludisku a rovnako sa potvrdil deficit aj v teste Novel object recognition (Cohen et al., 2013). Model je vhodný pre štúdium pamäťových deficitov prostredníctvom priestorovej orientácie.

Experiment bol vykonaný v nadväznosti na predchádzajúcu diplomovú prácu Mgr. Petry Pohanovej (Pohanová, 2019), v ktorej zistila pozitívny vplyv inhibítora FTO-MO-I-500, v testoch priestorového učenia u transgénneho modelu TgF344-AD. Opierali sme sa aj o štúdiu Walters et al., 2017, v ktorej potvrdili pozitívny vplyv inhibície FTO demetylázy u myšacieho knock-out modelu v teste strachového podmieňovania v porovnaní s kontrolami (Walters et al., 2017). Naša pilotná štúdia bola zameraná na jednotkovú aktivitu neurónov miesta v prostredí lineárnej dráhy. Pre otestovanie vplyvu inhibítora FTO demetylázy sme pre všetky potkany (PN1,2 = 8, 4xTgF344-AD, 4xF344-CT) sme zvolili prístup dvoch nahrávaní aktivity neurónov. Prvé nahrávanie prebiehalo pred podaním inhibítora FTO demetylázy a druhé nahrávanie prebehlo nasledujúci deň, po poslednej dávke inhibítora. V oboch nahrávaniach sme použili rovnaký protokol pre behaviorálne testovanie, pozostávajúci z dvoch familiárnych prostredí a dvoch nových prostredí (Obrázok 5). Cieľom práce bolo porovnanie získaných jednotkových aktivít z nahrávania pred podaním inhibítora FTO demetylázy (MO-I-500) s nahrávaním po podaní inhibítora a ich následná analýza. V diplomovej práci sme experimentálne potvrdili zvýšenie priemerných frekvencií aktivity neurónov u potkanov línie F344-CT vo familiárnom aj novom prostredí po podaní inhibítora FTO demetylázy (MO-I-500) (Obrázok 22). U potkanov línie TgF344-AD sa zmena priemerných frekvencií pálenia akčných potenciálov štatisticky potvrdila len v novom prostredí (Obrázok 23). Pozitívny vplyv inhibítora na stabilitu priestorovej mapy prostredia sme u oboch línií sledovali hodnotami Pearsonového korelačného koeficientu, ktoré sme následne rozdelili do dvoch skupín, pre pozitívne a negatívne korelácie. Získané pomery kladných a záporných korelácií sme následne porovnávali medzi prvým nahrávaním pred podaním inhibítora a druhým nahrávaním po podaní inhibítora. U línie F344-CT nám vyšiel štatisticky signifikantný výsledok pre familiárne prostredia (Obrázok 29) a preto predpokladáme pozitívny vplyv inhibítora na stabilitu mapy prostredia. V prípade línie TgF344-AD sme nezískali štatisticky signifikantný výsledok a rovnako nám štatistická signifikancia nevyšla ani pre korelácie medzi familiárnym a novým prostredím a to u oboch

línii (Obrázok 32;Obrázok 33). Analýza multifaktoriálnym štatistickým testom ANOVA nepotvrdila vzájomné ovplyvnenie faktoru línie a faktoru inhibítora so štatisticky signifikantným výsledkom.

Výsledky dosiahnuté v našom experimente naznačujú pozitívny vplyv inhibítora RNA demetylázy FTO na stabilitu priestorovej mapy familiárneho prostredia u potkaních samcov línie F344-CT, no zlepšenie sa u samcov línie TgF344-AD štatisticky nepreukázalo.

10 Literatúra

Primárne zdroje

- Aas, P. A., Otterlei, M., Falnes, P. Ø., Vågbø, C. B., Skorpen, F., Akbari, M., Krokan, H. E. (2003). Human and bacterial oxidative demethylases repair alkylation damage in both RNA and DNA. *Nature*, 421(6925), 859-863.
- Adams, J. P., & Sweatt, J. D. (2002). Molecular psychology: Roles for the ERK MAP kinase cascade in memory. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 42(1), 135-163.
- Almeida, C. G., Tampellini, D., Takahashi, R. H., Greengard, P., Lin, M. T., Snyder, E. M., Gouras, G. K. (2005). Beta-amyloid accumulation in APP mutant neurons reduces PSD-95 and GluR1 in synapses. *Neurobiology of disease*, 20(2), 187-198.
- Amaral, D., & Lavenex, P. (2007). Hippocampal neuroanatomy. In P. Andersen, R. Morris, D. Amaral (Eds.) & T. Bliss & J. O'Keefe (Ed.), *The hippocampus book* (p.37-114). Oxford University Press.
- Anselme, I., Laclef, C., Lanaud, M., Rüther, U., Schneider-Maunoury, S. (2007). Defects in brain patterning and head morphogenesis in the mouse mutant Fused toes. *Developmental biology*, 304(1), 208-220.
- Bannister, N. J., & Larkman, A. U. (1995). Dendritic morphology of CA1 pyramidal neurones from the rat hippocampus: I. Branching patterns. *Journal of Comparative Neurology*, 360(1), 150-160.
- Barnes, C. A. (1979). Memory deficits associated with senescence: A neurophysiological and behavioral study in the rat. *Journal of comparative and physiological psychology*, 93(1), 74.
- Barnes, C. A., McNaughton, B. L., Mizumori, S. J., Leonard, B. W., Lin, L. H. (1990). Chapter Comparison of spatial and temporal characteristics of neuronal activity in sequential stages of hippocampal processing. *Progress in brain research*, 83, 287-300.
- Battaglia, F. P., Sutherland, G. R., McNaughton, B. L. (2004). Local sensory cues and place cell directionality: Additional evidence of prospective coding in the hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 24(19), 4541-4550.
- Béhé, P., Colquhoun, D., Wyllie, D. J. A. (1999). Activation of single AMPA and NMDA-type glutamate-receptor channels. In *Ionotropic glutamate receptors in the CNS* (pp. 175-218). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Bernstein, D., Olton, D. S., Ingram, D. K., Waller, S. B., Reynolds, M. A., London, E. D. (1985). Radial maze performance in young and aged mice: Neurochemical correlates. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 22(2), 301-307.
- Bir, S. C., Ambekar, S., Kukreja, S., Nanda, A. (2015). Julius Caesar Arantius (Giulio Cesare Aranzi, 1530-1589) and the hippocampus of the human brain: History behind the discovery. *Journal of neurosurgery*, 122(4), 971-975.
- Boyles, J. K., Pitas, R. E., Wilson, E., Mahley, R. W., Taylor, J. (1985). Apolipoprotein E associated with astrocytic glia of the central nervous system and with nonmyelinating glia of the peripheral nervous system. *The Journal of clinical investigation*, 76(4), 1501-1513.
- Braak, H., & Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta neuropathologica*, 82(4), 239-259.
- Brandeis, R., Brandys, Y., Yehuda, S. (1989). The use of the Morris water maze in the study of memory and learning. *International Journal of Neuroscience*, 48(1-2), 29-69.
- Brickell, K. L., Steinbart, E. J., Rumbaugh, M., Payami, H., Schellenberg, G. D., Van Deerlin, V., ... Bird, T. D. (2006). Early-onset Alzheimer disease in families with late-onset Alzheimer disease: A

- potential important subtype of familial Alzheimer disease. *Archives of neurology*, 63(9), 1307-1311.
- Buhl, E. H., Szilágyi, T., Halasy, K., Somogyi, P. (1996). Physiological properties of anatomically identified basket and bistratified cells in the CA1 area of the rat hippocampus in vitro. *Hippocampus*, 6(3), 294-305.
- Burgess, N., Maguire, E. A., O'Keefe, J. (2002). The human hippocampus and spatial and episodic memory. *Neuron*, 35(4), 625-641.
- Busche, M. A., Chen, X., Henning, H. A., Reichwald, J., Staufenbiel, M., Sakmann, B., Konnerth, A. (2012). Critical role of soluble amyloid- β for early hippocampal hyperactivity in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(22), 8740-8745.
- Busche, M. A., & Konnerth, A. (2015). Neuronal hyperactivity-A key defect in Alzheimer's disease?. *Bioessays*, 37(6), 624-632.
- Cabeza, R., & St Jacques, P. (2007). Functional neuroimaging of autobiographical memory. *Trends in cognitive sciences*, 11(5), 219-227.
- Carew, T. J. (1989). Developmental assembly of multiple components of learning and memory in Aplysia. In *Neural Models of Plasticity* (pp. 22-45). Academic Press.
- Chain, D. G., Hegde, A. N., Yamamoto, N., Liu-Marsh, B., Schwartz, J. H. (1995). Persistent activation of cAMP-dependent protein kinase by regulated proteolysis suggests a neuron-specific function of the ubiquitin system in Aplysia. *Journal of Neuroscience*, 15(11), 7592-7603.
- Chapillon, P., & Roulet, P. (1997). Habituation and memorization of spatial objects' configurations in mice from weaning to adulthood. *Behavioural processes*, 39(3), 249-256.
- Chapman, P. F., White, G. L., Jones, M. W., Cooper-Blacketer, D., Marshall, V. J., Irizarry, M., Hsiao, K. K. (1999). Impaired synaptic plasticity and learning in aged amyloid precursor protein transgenic mice. *Nature neuroscience*, 2(3), 271-276.
- Cobb, S. R., Buhl, E. H., Halasy, K., Paulsen, O., Somogyi, P. (1995). Synchronization of neuronal activity in hippocampus by individual GABAergic interneurons. *Nature*, 378(6552), 75-78.
- Cockova, Z., Honc, O., Telensky, P., Olsen, M. J., Novotny, J. (2021). Streptozotocin-induced astrocyte mitochondrial dysfunction is ameliorated by FTO inhibitor MOI-500. *ACS Chemical Neuroscience*, 12(20), 3818-3828.
- Cohen, R. M., Rezai-Zadeh, K., Weitz, T. M., Rentsendorj, A., Gate, D., Spivak, I., Town, T. (2013). A transgenic Alzheimer rat with plaques, tau pathology, behavioral impairment, oligomeric A β , and frank neuronal loss. *Journal of Neuroscience*, 33(15), 6245-6256.
- Corry, B., & Thomas, M. (2012). Mechanism of ion permeation and selectivity in a voltage gated sodium channel. *Journal of the American Chemical Society*, 134(3), 1840-1846.
- Davis, H. P., & Squire, L. R. (1984). Protein synthesis and memory: A review. *Psychological bulletin*, 96(3), 518.
- De Leon, M. J., George, A. E., Stylopoulos, L. A., Miller, D. C., Smith, G. (1990). In vivo studies of hippocampal atrophy in Alzheimer's disease. In *Alzheimer's Disease. Epidemiology, Neuropathology, Neurochemistry, and Clinics* (pp. 523-529). Springer, Vienna.
- Deacon, R. M., & Rawlins, J. N. P. (2006). T-maze alternation in the rodent. *Nature protocols*, 1(1), 7-12.
- Dewachter, I., Reversé, D., Caluwaerts, N., Ris, L., Kuipéri, C., Van den Haute, C., Van Leuven, F. (2002). Neuronal deficiency of presenilin 1 inhibits amyloid plaque formation and corrects hippocampal long-term potentiation but not a cognitive defect of amyloid precursor protein [V717I] transgenic mice. *Journal of Neuroscience*, 22(9), 3445-3453.
- Ingram, D. K. (1988). Complex maze learning in rodents as a model of age-related memory impairment. *Neurobiology of aging*, 9, 475-485.

- Dombeck, D. A., Harvey, C. D., Tian, L., Looger, L. L., Tank, D. W. (2010). Functional imaging of hippocampal place cells at cellular resolution during virtual navigation. *Nature neuroscience*, 13(11), 1433-1440.
- Dominissini, D., Moshitch-Moshkovitz, S., Schwartz, S., Salmon-Divon, M., Ungar, L., Osenberg, S., Rechavi, G. (2012). Topology of the human and mouse m6A RNA methylomes revealed by m6A-seq. *Nature*, 485(7397), 201-206.
- Druckmann, S., Feng, L., Lee, B., Yook, C., Zhao, T., Magee, J. C., Kim, J. (2014). Structured synaptic connectivity between hippocampal regions. *Neuron*, 81(3), 629-640.
- Rolls, E. (2013). The mechanisms for pattern completion and pattern separation in the hippocampus. *Frontiers in systems neuroscience*, 7, 74.
- Eichenbaum, H. (2017). The role of the hippocampus in navigation is memory. *Journal of neurophysiology*, 117(4), 1785-1796.
- Einarsson, E. Ö., Pors, J., Nader, K. (2015). Systems reconsolidation reveals a selective role for the anterior cingulate cortex in generalized contextual fear memory expression. *Neuropsychopharmacology*, 40(2), 480-487.
- Esteves, I. M., Chang, H., Neumann, A. R., Sun, J., Mohajerani, M. H., McNaughton, B. L. (2021). Spatial Information Encoding across Multiple Neocortical Regions Depends on an Intact Hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 41(2), 307-319.
- Etienne, A. S., & Jeffery, K. J. (2004). Path integration in mammals. *Hippocampus*, 14(2), 180-192.
- Flavell, S. W., & Greenberg, M. E. (2008). Signaling mechanisms linking neuronal activity to gene expression and plasticity of the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.*, 31, 563-590.
- Freund, T. F., & Buzsaki, G. (1996). Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*, 6(4), 347-470.
- Frey, U., Matthies, H., Reymann, K. G., Matthies, H. (1991). The effect of dopaminergic D1 receptor blockade during tetanization on the expression of long-term potentiation in the rat CA1 region in vitro. *Neuroscience letters*, 129(1), 111-114.
- Fu, Y., Jia, G., Pang, X., Wang, R. N., Wang, X., Li, C. J., Han, K. L. (2013). FTO-mediated formation of N 6-hydroxymethyladenosine and N 6-formyladenosine in mammalian RNA. *Nature communications*, 4(1), 1-8.
- Galloway, C. R., Ravipati, K., Singh, S., Lebois, E. P., Cohen, R. M., Levey, A. I., Manns, J. R. (2018). Hippocampal place cell dysfunction and the effects of muscarinic M1 receptor agonism in a rat model of Alzheimer's disease. *Hippocampus*, 28(8), 568-585.
- Gerken, T., Girard, C. A., Tung, Y. C. L., Webby, C. J., Saudek, V., Hewitson, K.S., Galvanovskis, J. (2007). The obesity-associated FTO gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase. *Science*, 318(5855), 1469-1472.
- Gilman, A. G. (1995). G proteins and regulation of adenylyl cyclase. *Bioscience reports*, 15(2), 65-97.
- Goshen, I., Brodsky, M., Prakash, R., Wallace, J., Gradinaru, V., Ramakrishnan, C., Deisseroth, K. (2011). Dynamics of retrieval strategies for remote memories. *Cell*, 147(3), 678-689.
- Greenberg, M. E., Ziff, E. B., Greene, L. A. (1986). Stimulation of neuronal acetylcholine receptors induces rapid gene transcription. *Science*, 234(4772), 80-83.
- Grudzien, A., Shaw, P., Weintraub, S., Bigio, E., Mash, D. C., Mesulam, M.M. (2007). Locus coeruleus neurofibrillary degeneration in aging, mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, 28(3), 327-335.
- Haass, C. (1997). Presenilins: Genes for life and death. *Neuron*, 18(5), 687-690.
- Han, M., Liu, Z., Xu, Y., Liu, X., Wang, D., Li, F., Bi, J. (2020). Abnormality of m6A mRNA methylation is involved in Alzheimer's disease. *Frontiers in neuroscience*, 14, 98.
- Hasselmo, M. E., Schnell, E., Barkai, E. (1995). Dynamics of learning and recall at excitatory recurrent synapses and cholinergic modulation in rat hippocampal region CA3. *Journal of Neuroscience*, 15(7), 5249-5262.

- Häusser, M. (2000). The Hodgkin-Huxley theory of the action potential. *Nature neuroscience*, 3(11), 1165-1165.
- Hayman, L. A., Fuller, G. N., Cavazos, J. E., Pflieger, M. J., Meyers, C. A., Jackson, E. F. (1998). The hippocampus: Normal anatomy and pathology. *AJR. American journal of roentgenology*, 171(4), 1139-1146.
- Hebb, D. O. (1949). *The organization of behavior: A neuropsychological theory*. J.Wiley; Chapman & Hall.
- Hermans, E., & Challiss, R. J. (2001). Structural, signalling and regulatory properties of the group I metabotropic glutamate receptors: Prototypic family C G-protein-coupled receptors. *Biochemical Journal*, 359(3), 465-484.
- Hess, M. E., Hess, S., Meyer, K. D., Verhagen, L. A., Koch, L., Brönneke, H. S., Belgardt, B. F. (2013). The fat mass and obesity associated gene (Fto) regulates activity of the dopaminergic midbrain circuitry. *Nature neuroscience*, 16(8), 1042-1048.
- Holtmaat, A., & Caroni, P. (2016). Functional and structural underpinnings of neuronal assembly formation in learning. *Nature neuroscience*, 19(12), 1553.
- Hsieh, H., Boehm, J., Sato, C., Iwatsubo, T., Tomita, T., Sisodia, S., Malinow, R. (2006). AMPAR removal underlies A β -induced synaptic depression and dendritic spine loss. *Neuron*, 52(5), 831-843.
- Hu, J. Y., Chen, Y., Schacher, S. (2007). Protein kinase C regulates local synthesis and secretion of a neuropeptide required for activity-dependent long-term synaptic plasticity. *Journal of Neuroscience*, 27(33), 8927-8939.
- Iijima, T., Witter, M. P., Ichikawa, M., Tominaga, T., Kajiwar, R., Matsumoto, G. (1996). Entorhinal-hippocampal interactions revealed by real-time imaging. *Science*, 272(5265), 1176-1179.
- Ishizuka, N., Weber, J., Amaral, D. G. (1990). Organization of intrahippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat. *Journal of comparative neurology*, 295(4), 580-623.
- Ittner, L. M., Ke, Y. D., Delerue, F., Bi, M., Gladbach, A., van Eersel, J., Götz, J. (2010). Dendritic function of tau mediates amyloid- β toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell*, 142(3), 387-397.
- Jankowski, M. M., Passecker, J., Islam, M. N., Vann, S., Erichsen, J. T., Aggleton, J. P., O' Mara, S. M. (2015). Evidence for spatially-responsive neurons in the rostral thalamus. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 9, 256.
- Jensen, O., & Lisman, J. E. (2000). Position reconstruction from an ensemble of hippocampal place cells: Contribution of theta phase coding. *Journal of neurophysiology*, 83(5), 2602-2609.
- Hopfield, J. J. (1982). Neural networks and physical systems with emergent collective computational abilities. *Proceedings of the national academy of sciences*, 79(8), 2554-2558.
- Jun, H., Bramian, A., Soma, S., Saito, T., Saido, T. C., & Igarashi, K. M. (2020). Disrupted place cell remapping and impaired grid cells in a knockin model of Alzheimer's disease. *Neuron*, 107(6), 1095-1112.
- Kandel, E. R., Klein, M., Paris, G., Schwartz, J. H. (1981). IONIC AND BIOCHEMICAL MECHANISMS UNDERLYING HABITUATION AND SENSITIZATION IN APLYSIA. In *Sensory Functions* (pp. 93-94). Pergamon.
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M., Siegelbaum, S., Hudspeth, A. J., Mack, S. (Eds.). (2000). *Principles of neural science* (Vol. 4, pp. 1227-1246). New York: McGrawhill.
- Kandel, E. R., Dudai, Y., Mayford, M. R. (2014). The molecular and systems biology of memory. *Cell*, 157(1), 163-186.
- Kang, H., & Schuman, E. M. (1995). Long-lasting neurotrophin-induced enhancement of synaptic transmission in the adult hippocampus. *Science*, 267(5204), 1658-1662.

- Keller, L., Xu, W., Wang, H. X., Winblad, B., Fratiglioni, L., & Graff, C. (2011). The obesity related gene, FTO, interacts with APOE, and is associated with Alzheimer's disease risk: A prospective cohort study. *Journal of Alzheimer's Disease*, 23(3), 461-469.
- Kennedy, M. B. (1989). Regulation of synaptic transmission in the central nervous system: Long-term potentiation. *Cell*, 59(5), 777-787.
- Kessels, H. W., Malinow, R. (2009). Synaptic AMPA receptor plasticity and behavior. *Neuron*, 61(3), 340-350.
- Kim, D. M., & Nimigean, C. M. (2016). Voltage-gated potassium channels: A structural examination of selectivity and gating. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 8(5), a029231.
- Klausberger, T., & Somogyi, P. (2008). Neuronal diversity and temporal dynamics: The unity of hippocampal circuit operations. *Science*, 321(5885), 53-57.
- Kondo, H., Lavenex, P., Amaral, D. G. (2009). Intrinsic connections of the macaque monkey hippocampal formation: II. CA3 connections. *Journal of Comparative Neurology*, 515(3), 349-377.
- Kraeuter, A. K., Guest, P. C., Sarnyai, Z. (2019). The Y-maze for assessment of spatial working and reference memory in mice. In *Pre-Clinical Models* (pp. 105-111). Humana Press, New York, NY.
- Kropff, E., Carmichael, J. E., Moser, M. B., Moser, E. I. (2015). Speed cells in the medial entorhinal cortex. *Nature*, 523(7561), 419-424.
- Kunkel, D. D., Lacaille, J. C., Schwartzkroin, P. A. (1988). Ultrastructure of stratum lacunosum moleculare interneurons of hippocampal CA1 region. *Synapse*, 2(4), 382-394.
- Laurberg, S. (1979). Commissural and intrinsic connections of the rat hippocampus. *Journal of Comparative Neurology*, 184(4), 685-708.
- Lee, K. J., Queenan, B. N., Rozeboom, A. M., Bellmore, R., Lim, S. T., Vicini, S., Pak, D. T. (2013). Mossy fiber-CA3 synapses mediate homeostatic plasticity in mature hippocampal neurons. *Neuron*, 77(1), 99-114.
- Leutgeb, J. K., Leutgeb, S., Moser, M. B., Moser, E. I. (2007). Pattern separation in the dentate gyrus and CA3 of the hippocampus. *Science*, 315(5814), 961-966.
- Li, H., Ren, Y., Mao, K., Hua, F., Yang, Y., Wei, N., Zhang, H. (2018). FTO is involved in Alzheimer's disease by targeting TSC1-mTOR-Tau signaling. *Biochemical and biophysical research communications*, 498(1), 234-239.
- Lisman, J., Yasuda, R., Raghavachari, S. (2012). Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. *Nature reviews neuroscience*, 13(3), 169-182.
- Liu, G., Choi, S., & Tsien, R. W. (1999). Variability of neurotransmitter concentration and nonsaturation of postsynaptic AMPA receptors at synapses in hippocampal cultures and slices. *Neuron*, 22(2), 395-409.
- Liu, N., Dai, Q., Zheng, G., He, C., Parisien, M., Pan, T. (2015). N 6-methyladenosine-dependent RNA structural switches regulate RNA-protein interactions. *Nature*, 518(7540), 560-564.
- Lyford, G. L., Yamagata, K., Kaufmann, W. E., Barnes, C. A., Sanders, L. K., Copeland, N. G., Worley, P. F. (1995). Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron*, 14(2), 433-445.
- Mably, A. J., Gereke, B. J., Jones, D. T., Colgin, L. L. (2017). Impairments in spatial representations and rhythmic coordination of place cells in the 3xTg mouse model of Alzheimer's disease. *Hippocampus*, 27(4), 378-392.
- Marcyniuk, B., Mann, D. M. A., Yates, P. O. (1986). The topography of cell loss from locus caeruleus in Alzheimer's disease. *Journal of the neurological sciences*, 76(2-3), 335-345.
- Marzo, A., Galli, S., Lopes, D., McLeod, F., Podpolny, M., Segovia-Roldan, M., Salinas, P. C. (2016). Reversal of synapse degeneration by restoring Wnt signaling in the adult hippocampus. *Current Biology*, 26(19), 2551-2561.

- McClelland, J. L., McNaughton, B. L., O'Reilly, R. C. (1995). Why there are complementary learning systems in the hippocampus and neocortex: Insights from the successes and failures of connectionist models of learning and memory. *Psychological review*, 102(3), 419.
- McCormick, D. A. (2014). Membrane potential and action potential. In *From Molecules to Networks* (pp. 351-376). Academic Press.
- McNaughton, B. L., Barnes, C. A., O'Keefe, J. J. E. B. R. (1983). The contributions of position, direction, and velocity to single unit activity in the hippocampus of freelymoving rats. *Experimental brain research*, 52(1), 41-49.
- McNaughton, B. L., Barnes, C. A., Gerrard, J. L., Gothard, K., Jung, M. W., Knierim, J. J., Weaver, K. L. (1996). Deciphering the hippocampal polyglot: The hippocampus as a path integration system. *Journal of Experimental Biology*, 199(1), 173-185.
- Medeiros, R., Baglietto - Vargas, D., LaFerla, F. M. (2011). The role of tau in Alzheimer's disease and related disorders. *CNS neuroscience & therapeutics*, 17(5), 514-524.
- Melzer, S., Michael, M., Caputi, A., Eliava, M., Fuchs, E. C., Whittington, M. A., Monyer, H. (2012). Long-range-projecting GABAergic neurons modulate inhibition in hippocampus and entorhinal cortex. *Science*, 335(6075), 1506-1510.
- Mitsushima, D., Ishihara, K., Sano, A., Kessels, H. W., Takahashi, T. (2011). Contextual learning requires synaptic AMPA receptor delivery in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(30), 12503-12508.
- Morris, R. G. (1981). Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learning and motivation*, 12(2), 239-260.
- Moss, S. J., & Smart, T. G. (2001). Constructing inhibitory synapses. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(4), 240-250.
- Navratilova, Z., Hoang, L. T., Schwindel, C. D., Tatsuno, M., McNaughton, B. L. (2012). Experience-dependent firing rate remapping generates directional selectivity in hippocampal place cells. *Frontiers in neural circuits*, 6, 6.
- O'Keefe, J., & Dostrovsky, J. (1971). The hippocampus as a spatial map: Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain research*.
- John O'Keefe & Lynn Nadel (1978) *The Hippocampus as a Cognitive Map*, Oxford University Press.
- Olton, D. S., & Paras, B. C. (1979). Spatial memory and hippocampal function. *Neuropsychologia*, 17(6), 669-682.
- Olton, D. S., & Samuelson, R. J. (1976). Remembrance of places passed: Spatial memory in rats. *Journal of experimental psychology: Animal behavior processes*, 2(2), 97.
- Ondrejcek, T., Klyubin, I., Corbett, G. T., Fraser, G., Hong, W., Mably, A. J., Rowan, M. J. (2018). Cellular prion protein mediates the disruption of hippocampal synaptic plasticity by soluble tau in vivo. *Journal of Neuroscience*, 38(50), 10595-10606.
- Ondrejcek, T., Hu, N. W., Qi, Y., Klyubin, I., Corbett, G. T., Fraser, G., Rowan, M. J. (2019). Soluble tau aggregates inhibit synaptic long-term depression and amyloid β -facilitated LTD in vivo. *Neurobiology of Disease*, 127, 582-590.
- Pachitariu, M., Steinmetz, N., Kadir, S., Carandini, M. (2016). Kilosort: Realtime spike-sorting for extracellular electrophysiology with hundreds of channels. *BioRxiv*, 061481.
- Packard, M. G., Hirsh, R., & White, N. M. (1989). Differential effects of fornix and caudate nucleus lesions on two radial maze tasks: Evidence for multiple memory systems. *Journal of Neuroscience*, 9(5), 1465-1472.
- Patterson, S. L., Grover, L. M., Schwartzkroin, P. A., Bothwell, M. (1992). Neurotrophin expression in rat hippocampal slices: A stimulus paradigm inducing LTP in CA1 evokes increases in BDNF and NT-3 mRNAs. *Neuron*, 9(6), 1081-1088.

- Pawelzik, H., Hughes, D. I., & Thomson, A. M. (2003). Modulation of inhibitory autapses and synapses on rat CA1 interneurons by GABAA receptor ligands. *The Journal of physiology*, 546(3), 701-716.
- Pawson, T., & Scott, J. D. (1997). Signaling through scaffold, anchoring and adaptor proteins. *Science*, 278(5346), 2075-2080.
- Peters, T., Ausmeier, K., Rüther, U. (1999). Peters, T., Ausmeier, K., & Rüther, U. (1999). Cloning of Fatso (Fto), a novel gene deleted by the Fused toes (Ft) mouse mutation. *Mammalian genome*, 10(10), 983-986. *Mammalian Genome*, 10(10), 983-986. <https://doi.org/10.1007/s003359901144>
- Petrides, M. (1985). Deficits on conditional associative-learning tasks after frontal and temporal-lobe lesions in man. *Neuropsychologia*, 23(5), 601-614.
- Ping, X. L., Sun, B. F., Wang, L., Xiao, W., Yang, X., Wang, W. J., Yang, Y. G. (2014). Mammalian WTAP is a regulatory subunit of the RNA N6-methyladenosine methyltransferase. *Cell research*, 24(2), 177-189.
- Pitman, R. T., Fong, J. T., Stone, A. L., Devito, J. T., Puri, N. (2013). FTO knockdown decreases phosphorylation of Tau in neuronal cells: A potential model implicating the association of FTO with Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis Parkinsonism*, 3(125), 2161-0460.
- Quirk, G. J., Muller, R. U., Kubie, J. L., Ranck, J. B. (1992). The positional firing properties of medial entorhinal neurons: Description and comparison with hippocampal place cells. *Journal of Neuroscience*, 12(5), 1945-1963.
- Ranck Jr, J. B. (1984). Head direction cells in the deep layer of dorsal presubiculum in freely moving rats. In *Society of Neuroscience Abstract* (Vol. 10, p. 599).
- Rempel-Clower, N. L., Zola, S. M., Squire, L. R., Amaral, D. G. (1996). Three cases of enduring memory impairment after bilateral damage limited to the hippocampal formation. *Journal of Neuroscience*, 16(16), 5233-5255.
- Rolls, E. T., Treves, A., (1998). *Neural networks and brain function* (Vol.572). Oxford: Oxford university press.
- Rudy, C. C., Hunsberger, H. C., Weitzner, D. S., Reed, M. N. (2015). The role of the tripartite glutamatergic synapse in the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Aging and disease*, 6(2), 131.
- Saleem, A. B., Diamanti, E. M., Fournier, J., Harris, K. D., Carandini, M. (2018). Coherent encoding of subjective spatial position in visual cortex and hippocampus. *Nature*, 562(7725), 124-127.
- Samsonovich, A., & McNaughton, B. L. (1997). Path integration and cognitive mapping in a continuous attractor neural network model. *Journal of Neuroscience*, 17(15), 5900-5920.
- Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D., George-Hyslop, P. S., Pericak-Vance, M. A., Joo, S. H., Roses, A. D. (1993). Association of apolipoprotein E allele ϵ 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology*, 43(8), 1467-1467.
- Savelli, F., Yoganarasimha, D., Knierim, J. J. (2008). Influence of boundary removal on the spatial representations of the medial entorhinal cortex. *Hippocampus*, 18(12), 1270-1282.
- Scannevin, R. H., & Huganir, R. L. (2000). Postsynaptic organisation and regulation of excitatory synapses. *Nature Reviews Neuroscience*, 1(2), 133-141.
- Schellenberg, G. D. (2006). Early Alzheimer's disease genetics. *Journal of Alzheimer's Disease*, 9(s3), 367-372.
- Schmidt, S. D., Furini, C. R. G., Zinn, C. G., Cavalcante, L. E., Ferreira, F. F., Behling, J. A. K., Izquierdo, I. (2017). Modulation of the consolidation and reconsolidation of fear memory by three different serotonin receptors in hippocampus. *Neurobiology of learning and memory*, 142, 48-54.
- Schwiening C. J. (2012). A brief historical perspective: Hodgkin and Huxley. *The Journal of physiology*, 590(11), 2571-2575.

- Scuteri, A., Sanna, S., Chen, W. M., Uda, M., Albai, G., Strait, J., Abecasis, G. R. (2007). Genome-wide association scan shows genetic variants in the FTO gene are associated with obesity-related traits. *PLoS genetics*, 3(7), e115.
- Selkoe, D. J. (2008). Soluble oligomers of the amyloid β -protein: Impair synaptic plasticity and behavior. *Synaptic Plasticity and the Mechanism of Alzheimer's Disease*, 89-102.
- Shi, H., Zhang, X., Weng, Y. L., Lu, Z., Liu, Y., Lu, Z., Zhou, T. (2018). M6A facilitates hippocampus-dependent learning and memory through YTHDF1. *Nature*, 563(7730), 249-253.
- Sik, A., Penttonen, M., Ylinen, A., Buzsáki, G. (1995). Hippocampal CA1 interneurons: An in vivo intracellular labeling study. *Journal of Neuroscience*, 15(10), 6651-6665.
- Šišková, Z., Justus, D., Kaneko, H., Friedrichs, D., Henneberg, N., Beutel, T., Remy, S. (2014). Dendritic structural degeneration is functionally linked to cellular hyperexcitability in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuron*, 84(5), 1023-1033.
- Skou, J. C., & Esmann, M. (1992). The Na⁺/K⁺-ATPase. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 24(3), 249-261.
- Smith, M. L., & Milner, B. (1981). The role of the right hippocampus in the recall of spatial location. *Neuropsychologia*, 19(6), 781-793.
- Snyder, E. M., Nong, Y., Almeida, C. G., Paul, S., Moran, T., Choi, E. Y., Greengard, P. (2005). Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid- β . *Nature neuroscience*, 8(8), 1051-1058.
- Spruston, N., & McBain, C. (2007). Structural and functional properties of hippocampal neurons. *The hippocampus*.
- Spruston, N. (2008). Pyramidal neurons: Dendritic structure and synaptic integration. *Nature Reviews Neuroscience*, 9(3), 206-221.
- Storm, J. F. (1987). Action potential repolarization and a fast after - hyperpolarization in rat hippocampal pyramidal cells. *The Journal of physiology*, 385(1), 733-759.
- Sunyer, B., Patil, S., Höger, H., & Lubec, G. (2007). Barnes maze, a useful task to assess spatial reference memory in the mice.
- Swanson, L. W., Sawchenko, P. E., Cowan, W. M. (1981). Evidence for collateral projections by neurons in Ammon's horn, the dentate gyrus, and the subiculum: A multiple retrograde labeling study in the rat. *Journal of Neuroscience*, 1(5), 548-559.
- Szabadics, J., Varga, C., Molnár, G., Oláh, S., Barzó, P., Tamás, G. (2006). Excitatory effect of GABAergic axo-axonic cells in cortical microcircuits. *Science*, 311(5758), 233-235.
- Tanabe, Y., Masu, M., Ishii, T., Shigemoto, R., Nakanishi, S. (1992). A family of metabotropic glutamate receptors. *Neuron*, 8(1), 169-179.
- Ueda, Y., Ooshio, I., Fusamae, Y., Kitae, K., Kawaguchi, M., Jingushi, K., Tsujikawa, K. (2017). AlkB homolog 3-mediated tRNA demethylation promotes protein synthesis in cancer cells. *Scientific reports*, 7, 42271.
- Vago, D. R., Wallenstein, G. V., Morris, L. S., (2014). Hippocampus, In *Encyclopedia of the Neurological Sciences* (Second Edition), Academic Press, Pages 566-570, ISBN 9780123851581.
- Van Der Hoeven, F., Schimmang, T., Volkmann, A., Mattei, M. G., Kyewski, B., Ruther, U. (1994). Programmed cell death is affected in the novel mouse mutant Fused toes (Ft). *Development*, 120(9), 2601-2607. *Development*, 120(9), 2601.
- Van Strien, N. M., Cappaert, N. L. M., Witter, M. P. (2009). The anatomy of memory: An interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. *Nature reviews neuroscience*, 10(4), 272-282.
- Vorhees, C. V., & Williams, M. T. (2014). Assessing spatial learning and memory in rodents. *ILAR journal*, 55(2), 310-332.

- Walters, B. J., Mercaldo, V., Gillon, C. J., Yip, M., Neve, R. L., Boyce, F. M., Josselyn, S. A. (2017). The role of the RNA demethylase FTO (fat mass and obesity-associated) and mRNA methylation in hippocampal memory formation. *Neuropsychopharmacology*, 42(7), 1502-1510.
- Wang, Y., Zhang, P., Wyskiel, D. R. (2016). Chandelier cells in functional and dysfunctional neural circuits. *Frontiers in neural circuits*, 10, 33.
- Wheeler, D. W., White, C. M., Rees, C. L., Komendantov, A. O., Hamilton, D.J., Ascoli, G. A. (2015). Hippocampome. Org: A knowledge base of neuron types in the rodent hippocampus. *Elife*, 4, e09960.
- Whitehouse, P. J., Price, D. L., Struble, R. G., Clark, A. W., Coyle, J. T., DeLong, M. R. (1982). Alzheimer's disease and senile dementia: Loss of neurons in the basal forebrain. *Science*, 215(4537), 1237-1239.
- Widagdo, J., Zhao, Q. Y., Kempen, M. J., Tan, M. C., Ratnu, V. S., Wei, W., Bredy, T. W. (2016). Experience-dependent accumulation of N6-methyladenosine in the prefrontal cortex is associated with memory processes in mice. *Journal of Neuroscience*, 36(25), 6771-6777.
- Wiener, S. I. (1993). Spatial and behavioral correlates of striatal neurons in rats performing a self-initiated navigation task. *Journal of Neuroscience*, 13(9), 3802-3817.
- Wood, E. R., Dudchenko, P. A., Eichenbaum, H. (1999). The global record of memory in hippocampal neuronal activity. *Nature*, 397(6720), 613-616.
- Wright, S. H. (2004). Generation of resting membrane potential. *Advances in physiology education*, 28(4), 139-142.
- Zeidman, P., & Maguire, E. A. (2016). Anterior hippocampus: The anatomy of perception, imagination and episodic memory. *Nature Reviews Neuroscience*, 17(3), 173-182.
- Zemankovics, R., Veres, J. M., Oren, I., Hájos, N. (2013). Feedforward inhibition underlies the propagation of cholinergically induced gamma oscillations from hippocampal CA3 to CA1. *Journal of Neuroscience*, 33(30), 12337-12351.
- Zhang, Z., Wang, M., Xie, D., Huang, Z., Zhang, L., Yang, Y., Wang, X. J. (2018). METTL3-mediated N 6-methyladenosine mRNA modification enhances long-term memory consolidation. *Cell research*, 28(11), 1050-1061.
- Zheng, G., Cox, T., Tribbey, L., Wang, G. Z., Iacoban, P., Booher, M. E., Olsen, M. J. (2014). Synthesis of a FTO inhibitor with anticonvulsant activity. *ACS chemical neuroscience*, 5(8), 658-665.
- Zola-Morgan, S., Squire, L. R., Amaral, D. G. (1986). Human amnesia and the medial temporal region: Enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 6(10), 2950-2967.

11 Prílohy

11.1 Zoznam obrázkov

Obrázok 1: prepojenie hipokampu s anatomickým zobrazením polohy pyramidálnych neurónov v jednotlivých podoblastiach formácie. CA1, CA2, CA3: podoblasti hipokampálnej formácie, LEA: later. entor. kôra, MEA: medial. entor. kôra, Sub: subikulum (pre/Para), DG: gyrus dentatus, st. Pyr: stratum pyramidale, St. Mol: stratum moleculare, GCL: stratum granulosum, ML: stratum moleculare, modré dráhy: machové vlákna, červené dráhy: Schafferové kolaterály (http://www.martinpyka.de/neurosvg/).	21
Obrázok 2: Lustrový interneurón (Wang et al., 2016).....	23
Obrázok 3: Košíčkové bunky (Zemankovics et al., 2013).....	24
Obrázok 4: (A) Prepojenie hipokampálnej štruktúry z entorinálnej kôry (EC) do hipokampálnej podoblasti dentálneho gyru (DG), ďalej cez machové vlákna do podoblasti CA3 a následne cez Schafferovy kolaterály do CA1. (B) grafické znázornenie prepojenia hipokampálnej štruktúry s konkrétnymi podoblastami entorinálnej kôry. (C) Princípálny neurón hipokampálnej podoblasti CA3 s vrstvami (stratum lacunosum-moleculare; stratum radiatum; stratum oriens; stratum lucidum) do ktorých vedú prepojenia z DG, EC a CA3 (Vago et al., 2014).....	34
Obrázok 5: Grafický návrh protokolu nahrávania použitého počas prvého a druhého nahrávania	55
Obrázok 6 : Náhľad do vizualizačného prostredia phy-GU v ktorom bolo kontrolované klastrovanie. Okno zobazuje detailné informácie o identifikačnom čísle klastra (id), jeho amplitúde (amp), intenzite pálenia AP (fr), číslo kanálu, na ktorom bol klaster nahraný (ch) a počet spajkov v danom klasteri (n_spikes). Zelená farba vyznačuje klastre vyhodnotené ako good, sivá ako noise.	57
Obrázok 7: (A) autokorelogram pyramidálneho neurónu v časovom úseku 492.5 ms, ktorý zobrazuje histogram vzdialeností medzi akčnými potenciálmi (os y) jedného klastra (os x) čas 0 je v prostriedku.. Veľkosť jedného binu je 1 ms. (B) autokorelogram šumu, bez refraktérnej fázy.	58
Obrázok 8: (A) príklad vlny pyramidálneho neurónu na kanáloch 33, 34 a 35. (B) vlna šumu.....	58
Obrázok 9: (A) náhľad na pozície akčných potenciálov patriace pod jeden klaster (modré zvýraznenie) a ich aktivita počas celej dĺžky nahrávania. Dobrý klaster má mať vzhľad amplitúdy gaussovho rozdelenia, (B) negaussovo rozdelenie amplitúdy klastra reprezentujúceho šum.	59
Obrázok 10: náhľad na frekvenciu pálenia akčných potenciálov klastra klasifikovaného ako bunka (A) a klastra reprezentujúceho šum (B).	59
Obrázok 11: Okno s náhľadom na detaily klastra a jeho podobnosť (similarity) s iným klastrom. Podobnosť klastra je definovaná hodnotami 0 (žiadna) až 1 (veľmi vysoká).....	60
Obrázok 12: (A) pyramidálny neurón, (B) interneurón	60
Obrázok 13: Ukážka aktivity klastra (červené bodky) na trajektórii (modrá farba) vo familiárnom prostredí 1 a 2 (Fam1, Fam2) a novom prostredí 1 a 2 (Nov1, Nov2) u potkanov línie F344-CT (A) a TgF344-AD (B), z ktorej boli následne vytvárané place fields pre jednotlivé klastre, použité v korelačných analýzach.	61

- Obrázok 14:** Obrázok je tvorený 35 grafmi, v ktorých (jeden graf) je graficky znázornený place field jedného klastra vo všetkých prostrediach (Fam1,Nov1,Fam2,Nov2) u potkanov línie F344-CT pred podaním inhibítora FTO demetylázy. Dĺžka jedného prostredia v grafe (os x) predstavuje 57 binov, modrá farba zobrazuje nízku až nulovú aktivitu, žltá maximálnu aktivitu pálenia akčných potenciálov (sp/s). 62
- Obrázok 15:** Obrázok je tvorený 17 grafmi, v ktorých (jeden graf) je graficky znázornený place field jedného klastra vo všetkých prostrediach (Fam1,Nov1,Fam2,Nov2) u potkanov línie F344-CT po podaní inhibítora FTO demetylázy. Dĺžka jedného prostredia v grafe (os x) predstavuje 57 binov, modrá farba zobrazuje nízku až nulovú aktivitu, žltá maximálnu aktivitu pálenia akčných potenciálov(sp/s). 63
- Obrázok 16 :** Obrázok je tvorený 20 grafmi, v ktorých (jeden graf) je graficky znázornený place field jedného klastra vo všetkých prostrediach (Fam1,Nov1,Fam2,Nov2) u potkanov línie TgF344-AD pred podaním inhibítora FTO demetylázy. Dĺžka jedného prostredia v grafe (os x) predstavuje 57 binov, modrá farba zobrazuje nízku až nulovú aktivitu, žltá maximálnu aktivitu pálenia akčných potenciálov(sp/s). 64
- Obrázok 17:** Obrázok je tvorený 5 grafmi, v ktorých (jeden graf) je graficky znázornený place field jedného klastra vo všetkých prostrediach (Fam1,Nov1,Fam2,Nov2) u potkanov línie TgF344-AD po podaní inhibítora FTO demetylázy. Dĺžka jedného prostredia v grafe (os x) predstavuje 57 binov, modrá farba zobrazuje nízku až nulovú aktivitu, žltá maximálnu aktivitu pálenia akčných potenciálov (sp/s). V prvých dvoch grafoch chýba posledné prostredie, ktoré u daného potkana nebolo nahrané. Na poslednom grafe je nové prostredie rozdelené na 2(spodný a predposledný sekundárny graf). 64
- Obrázok 18:** Porovnanie priemernej aktivity neurónov vo familiárnych prostrediach pred a po podaní inhibítora FTO demetylázy (MO-I-500) u potkanov línie F344-CT. Určené frekvencie v populácii (os x), počet neurónov reprezentujúcich danú frekvenciu (os y). 66
- Obrázok 19:** Porovnanie priemernej aktivity neurónov v nových prostrediach pred a po podaní inhibítora FTO demetylázy (MO-I-500) u potkanov línie F344-CT. Určené frekvencie v populácii (os x), počet neurónov reprezentujúcich danú frekvenciu (os y). 66
- Obrázok 20:** Porovnanie priemernej aktivity vo familiárnych prostrediach pred a po podaní inhibítora FTO demetylázy (MO-I-500) u potkanov línie TgF344-AD. Určené frekvencie v populácii (os x), počet neurónov reprezentujúcich danú frekvenciu (os y). 67
- Obrázok 21:** Porovnanie priemernej aktivity v nových prostrediach pred a po podaní inhibítora FTO demetylázy (MO-I-500) u potkanov línie TgF344-AD. Určené frekvencie v populácii (os x), počet neurónov reprezentujúcich danú frekvenciu (os y). 67
- Obrázok 22:** Analýza priemeru priemernej aktivity neurónov u línie F344-CT vo familiárnom (FAM) a novom (NOV) prostredí pred a po podaní inhibítora FTO demetylázy. Priemerné hodnoty pre familiárne (FAM pred FTO= 3,86sp/s) a nové (NOVpred FTO= 4,33sp/s) prostredie sa po podaní inhibítora FTO demetylázy štatisticky signifikantne zvýšili pre obe prostredia (FAM po FTO= 4,61 sp/s; NOV po FTO= 6,02 sp/s; $p = 0,049$, $p = 0,020$). Error bar zobrazuje štandardnú chybu priemeru (SEM) 68
- Obrázok 23:** Aktivita neurónov u línie TgF344-AD vo familiárnom (FAM) a novom (NOV) prostredí pred a po podaní inhibítora FTO demetylázy. Priemerné hodnoty pre familiárne (FAM pred FTO= 4,27 sp/s) a nové (NOV pred FTO= 5,84 sp/s) sa po podaní inhibítora FTO demetylázy zvýšili v prípade familiárneho prostredia (FAM po FTO = 5,64 sp/s) no zvýšenie nebolo signifikantné ($p = 0,57$). V prípade nového

prostredia sa hodnota naopak znížila štatisticky signifikantne (NOV po FTO=4,91 sp/s, $p = 0,0073$). Error bar zobrazuje štandardnú chybu priemeru (SEM)	69
Obrázok 24: Oba grafy(A,B) zobrazujú 100x hodnôt pozičnej informácie vypočítanej pre príslušný shufflovaný klaster (každý graf je jeden klaster) a usporiadaných vzostupne (os x). Zelená línia reprezentuje hodnotu 95 percentilu (os y) shufflovaných dát, ktorá je nižšia, ako reálna hodnota pozičnej informácie daného klastra (červená línia) (os y). Oba klastre pochádzajú z línie F344-CT, prvý klaster (cl.2) z prvého nahrávania pred podaním inhibítora (A), druhý klaster(cl.5) z druhého nahrávania po podaní inhibítora (B) . Oba klastre sme klasifikovali hodnotou 1, tzn. prešli shufflovacím „filtrom“ a následne sme ich zahrnuli do populačných korelačných analýz.	70
Obrázok 25: Oba grafy zobrazujú 100x hodnôt pozičnej informácie vypočítanej pre príslušný shufflovaný klaster (každý graf je jeden klaster) a usporiadaných vzostupne (os x). Zelená línia reprezentuje hodnotu 95 percentilu (os y) shufflovaných dát, ktorá je vyššia, ako reálna hodnota pozičnej informácie daného klastra (červená línia) (os y). Oba klastre sme klasifikovali hodnotou 0, tzn. neprešli shufflovacím „filtrom“ a neboli následne zahrnuté v populačných analýzach.	70
Obrázok 26: Hodnoty korelácií(os y) neurónov (os x) dvoch familiárnych prostredí (Fam1xFam2), nahraných zo samcov línie F344-CT pred (A, 44 neurónov) a po podaní inhibítora FTO demetylázy (B, 17 neurónov). ...	71
Obrázok 27: Hodnoty korelácií(os y) neurónov (os x) familiárneho a nového (Fam1xNov1) prostredia, nahraných zo samcov línie F344-CT pred (A, 43 neurónov) a po podaní inhibítora FTO demetylázy (B, 17 neurónov).	72
Obrázok 28: Hodnoty korelácií(os y) neurónov (os x) dvoch familiárnych prostredí(Fam1xFam2), nahraných zo samcov línie TgF344-AD pred (A, 20 neurónov) a po podaní inhibítora FTO demetylázy (B, 5 neurónov).	72
Obrázok 29: Hodnoty korelácií(os y) neurónov (os x) familiárneho a nového (Fam1xFam2) prostredia, nahraných zo samcov línie TgF344-AD pred (A, 22 neurónov) a po podaní inhibítora FTO demetylázy (B, 5 neurónov).	73
Obrázok 30: Percentuálne zastúpenie (os y) pozitívnych a negatívnych korelácií (os x) z familiárnych prostredí (Fam1xFam2) pred a po podaní inhibítora FTO demetylázy (MO-I-500) so štatisticky významným výsledkom ($p=0,031$).	74
Obrázok 31: Percentuálne zastúpenie (os y) pozitívnych a negatívnych korelácií (os x) medzi familiárnymi (Fam1xFam2) prostrediami pred a po podaní inhibítora FTO demetylázy (MO-I-500) u samcov línie TgF344-AD so štatisticky nevýznamným výsledkom ($p = 0,086$).	74
Obrázok 32: Percentuálne zastúpenie (os y) pozitívnych a negatívnych korelácií (os x) medzi familiárnym a novým (Fam1xNov1) prostredím pred a po podaní inhibítora FTO demetylázy (MO-I-500) u samcov línie F344-CT bez štatisticky signifikantného výsledku ($p = 0,92$).	75
Obrázok 33: Percentuálne zastúpenie (os y) pozitívnych a negatívnych korelácií (os x) medzi familiárnym a novým (Fam1xFam2) prostredím pred a po podaní inhibítora FTO demetylázy (MO-I-500) u samcov línie TgF344-AD bez štatisticky signifikantného výsledku ($p = 0,92$).	75
Obrázok 34 : Porovnanie priemernej hodnoty korelácie (os y) vyrátanej zo všetkých získaných hodnôt korelácií (čierne body) vo familiárnom (Fam1xFam2) prostredí pre každú líniu (os x) pred a po podaní inhibítora FTO demetylázy (MO-I-500). Hodnoty korelácií pre jednotlivé skupiny (priemer $\pm$ SEM) F344-CT pred FTO $0,06 \pm 0,03$; TgF344-AD pred FTO $0,05 \pm 0,04$; F344-CT po FTO $0,11 \pm 0,05$ S; TgF344-AD po FTO $0,09 \pm 0,04$	76

Obrázok 35: Porovnanie priemernej hodnoty korelácie (os y) vyrátanej zo všetkých získaných hodnôt korelácií (čierne body) vo familiárnom (Fam1xNov1) prostredí pre každú líniu (os x) pred a po podaní inhibítora FTO demetylázy (MO-I-500). Hodnoty korelácií pre jednotlivé skupiny (priemer $\pm$ SEM) F344-CT pred FTO $0,06 \pm 0,04$; TgF344-AD pred FTO $0,16 \pm 0,05$; F344-CT po FTO $0,04 \pm 0,03$; TgF344-AD po FTO $0,18 \pm 0,06$ **77**