

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Fyziologie živočichů



Bc. Adéla Hofmannová

**Mitochondriální protein 17 $\beta$ -hydroxysteroidová dehydrogenáza typu 10 v mozku genetického  
animálního modelu Alzheimerovy choroby (potkani McGill-R-Thy1-APP)**

Mitochondrial protein 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 10 in the brain of a genetic animal  
model of Alzheimer's disease (McGill-R-Thy1-APP rats)

Diplomová práce

Vedoucí práce: Ing. Zdena Křištofiková, Ph.D.

Národní ústav duševního zdraví, Klecany

Praha 2018

**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 dne 24. 4. 2018

Podpis:

V rámci této diplomové práce byly naměřeny výsledky na mitochondriích izolovaných z mozku transgenních potkanů a komplexy 17 $\beta$ HSD10-Parkin v mozkomíšním moku pacientů s AD, ostatní výsledky jsou převzaty z jiných prací a na jejich měření jsem se nepodílela (viz kapitola Diskuze, Tab. 2)

**Poděkování:**

Ráda bych poděkovala své školitelce Ing. Zdeně Křištofikové, Ph.D. za čas a trpělivost věnované vedení mé diplomové práce. Děkuji jí také za poskytnutí dat naměřených na mozkomíšním moku pacientů s roztroušenou sklerózou. Dále děkuji Mgr. Tomáši Petráskovi, Ph.D. za poskytnutí dat z behaviorálních testů na transgenních potkanech McGill-R-Thy1-APP.

Tato práce byla podpořena granty GA ČR (P304-12-G069) a AZV (16-27611A).

## ABSTRAKT

Transgenní potkani McGill-R-Thy1-APP jsou jedním z nejlepších animálních genetických modelů Alzheimerovy choroby (AD). Dochází u nich k intracelulární akumulaci rozpustné formy amyloidu  $\beta$  ( $A\beta$ ) a kognitivnímu deficitu již ve věku 3 měsíců, ještě před depozicí extracelulárních plaků. Narušena je také kapacita mitochondriální bioenergetiky, konkrétně byla zjištěna dysfunkce enzymatické aktivity komplexu I dýchacího řetězce u potkanů ve věku 6 měsíců. Jádrem kódovaný protein mitochondriální matrix 17 $\beta$ -hydroxysteroidová dehydrogenáza typu 10 (17 $\beta$ HSD10) má řadu enzymatických i neenzymatických funkcí a je znám jako vazebný partner intracelulárního  $A\beta$ . U pacientů s AD byla zjištěna overexprese 17 $\beta$ HSD10 v mozku a zvýšené hladiny v mozkomíšním moku. 17 $\beta$ HSD10 je z cytoplasmy importován PINK1-Parkin-TOM/TIM mechanismem do mitochondriální matrix, kde interaguje např. s cyklofilinem D (CypD) a zabraňuje tak jeho translokaci na vnitřní mitochondriální membránu. Tím reguluje otevírání mitochondriálního transientního permeabilního póru vyvolané CypD. Zdá se, že by  $A\beta$  akumulovaný v mitochondriích mohl tuto regulaci ovlivnit. Cílem této práce bylo otestovat změny v hladinách 17 $\beta$ HSD10 v mitochondriích izolovaných z mozku 11měsíčních homozygotních potkanů McGillR-Thy1-APP a zjistit, zda interakce 17 $\beta$ HSD10 s peptidy  $A\beta$  ovlivní regulaci CypD. Pro tato měření byla použita metoda ELISA. Nejistili jsme žádné změny v hladinách 17 $\beta$ HSD10, CypD, konformačně změněného  $A\beta$ (1-42) a v komplexech 17 $\beta$ HSD10 s celkovým  $A\beta$ . Naše experimenty však potvrdily signifikantní zvýšení hladin celkového  $A\beta$  a pokles komplexů 17 $\beta$ HSD10-CypD v porovnání s kontrolami. Dále jsme stanovovali hladiny komplexů 17 $\beta$ HSD10-Parkin v mozkomíšním moku pacientů s AD, zde jsme nenalezli žádné změny vůči kontrolám. Naše výsledky naznačují, že up-regulace 17 $\beta$ HSD10 pozorovaná u AD nemusí vést ke zvýšenému transportu do mitochondriální matrix. Navíc schopnost 17 $\beta$ HSD10 regulovat CypD v mitochondriální matrix je pravděpodobně vlivem akumulovaného  $A\beta$  oslabena. Srovnání výsledků získaných u lidí s AD nebo animálního modelu AD s lidmi s roztroušenou sklerózou naznačuje, že poměry v mitochondriální matrix jsou u obou neurodegenerativních nemocí zcela odlišné, navzdory podobné overexpresi 17 $\beta$ HSD10.

**Klíčová slova:** Alzheimerova choroba, transgenní potkani model McGill-R-Thy1-APP, mitochondrie, 17 $\beta$ -hydroxysteroidová dehydrogenáza typu 10

## ABSTRACT

Transgenic McGill-R-Thy1-APP rats are one of the best animal genetic models of Alzheimer's disease (AD). Significant intracellular elevation of soluble amyloid  $\beta$  ( $A\beta$ ) and cognitive deficits are observed already in 3-month-old rats, prior to extracellular plaque deposition. Mitochondrial bioenergetic capacity appears to be altered via defects in complex I enzymatic activity in the electron transport chain already in 6-month-old rats. Nucleus-encoded mitochondrial matrix protein 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 10 (17 $\beta$ HSD10) operates via multiple enzymatic and non-enzymatic functions and is known as a binding partner of intracellular  $A\beta$ . In patients with AD, 17 $\beta$ HSD10 overexpression has been reported in brain and increased levels in cerebrospinal fluid. Cytoplasmic 17 $\beta$ HSD10 is imported via the PINK1-Parkin-TOM/TIM pathway into mitochondrial matrix, where it binds e.g. cyclophilin D (CypD) and prevents its translocation to the inner mitochondrial membrane. By this mechanism, 17 $\beta$ HSD10 can regulate the opening of the mitochondrial permeability transition pore mediated by CypD. It seems that accumulated mitochondrial  $A\beta$  may influence this regulation. In this study, we measured 17 $\beta$ HSD10 levels in mitochondria isolated from the brain of 11-month-old homozygous McGill-R Thy1-APP rats and we evaluated the ability of 17 $\beta$ HSD10 to regulate CypD. An ELISA method was used for these measurements. We observed no changes in levels of 17 $\beta$ HSD10, CypD, conformation-altered  $A\beta$ (1-42) and 17 $\beta$ -HSD10-total  $A\beta$  complexes. On the contrary, our experiments confirmed significant increase in levels of total  $A\beta$  and significant drop in levels of 17 $\beta$ HSD10-CypD complexes in comparison with wild-type rats. Moreover, we estimated levels of 17 $\beta$ HSD10-Parkin complexes in cerebrospinal fluid of AD people but we did not find marked alterations compared to controls. Our results suggest that up-regulation of 17 $\beta$ HSD10 observed in AD does not have to be followed by its increased transport into mitochondrial matrix. Moreover, the ability of 17 $\beta$ HSD10 to regulate CypD in mitochondrial matrix, under conditions of accumulated  $A\beta$ , is weakened. The comparison of these results in people with AD or animal model of AD with people with multiple sclerosis suggests that conditions in mitochondrial matrix are quite different in both neurodegenerative diseases, despite similar 17 $\beta$ HSD10 overexpression.

**Key words:** Alzheimer's disease, transgenic McGill-R-Thy1-APP rat model, mitochondria, 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 10

## SEZNAM ZKRATEK

- 17 $\beta$ HSD10 – 17 $\beta$ -hydroxysteroidová dehydrogenáza typu 10
- A $\beta$  – amyloid  $\beta$
- A $\beta$ (1-40) – amyloid  $\beta$  končící v pozici 40
- A $\beta$ (1-42) – amyloid  $\beta$  končící v pozici 42
- AD – Alzheimerova choroba (*Alzheimer's disease*)
- APP – amyloidový prekurzorový protein
- B – blank
- BS – blokovácí roztok (*blocking solution*)
- BSA – bovinní sérový albumin
- CNS – centrální nervová soustava
- CS – potahovací roztok (*coating solution*)
- DMSO – dimethylsulfoxid
- DS – ředící roztok (*diluting solution*)
- ELISA – *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*
- ER – endoplasmatické retikulum
- ERAB – s ER asociovaný A $\beta$  vázající protein (*ER-associated A $\beta$  binding protein*)
- GA – Golgiho aparát
- LM – lauryl maltoside
- LTP – dlouhodobá potenciace (*long-term potentiation*)
- MITO – vzorek mitochondriální frakce s detergentem (příp. i naředěný H<sub>2</sub>O)
- MPTP – mitochondriální permeabilní transítiní pór
- MWW – Mann-Whitney-Wilcoxonův test
- PBS – fosfátový pufr (*phosphate buffered saline*)
- PP – primární protilátka
- PSEN1 – presenilin 1
- PSEN2 – presenilin 2
- ROS – reaktivní formy kyslíku (*reactive oxygen species*)
- SD – směrodatná odchylka (*standard deviation*)
- SP – sekundární protilátka
- tau – protein asociovaný s tubulinem (*tubulin associated unit*)
- TIM – translokáza vnitřní mitochondriální membrány (*translocase of the inner membrane*)
- TMB – tetramethylbenzidin
- TOM – translokáza vnější mitochondriální membrány (*translocase of the outer membrane*)
- WS – promývací roztok (*washing solution*)

# OBSAH

## LITERÁRNÍ PŘEHLED

1	ÚVOD.....	1
2	ALZHEIMEROVA CHOROBA.....	2
2.1	Formy AD a rizikové faktory .....	2
2.2	Patofyziologie.....	3
2.2.1	Amyloid $\beta$ .....	3
2.2.2	Tau protein .....	5
2.3	Diagnostika.....	5
3	MITOCHONDRIE A AD.....	6
4	17 $\beta$ -HYDROXYSTEROIDOVÁ DEHYDROGENÁZA TYPU 10 .....	9
4.1	Struktura a funkce .....	9
4.2	Interakce 17 $\beta$ HSD10 s A $\beta$ .....	11
4.3	Další interakce a regulace 17 $\beta$ HSD10.....	12
5	ANIMÁLNÍ MODELY AD.....	14
5.1	Genetické modely.....	14
5.2	Negenetické modely .....	16
6	TRANSGENNÍ POTKANI MCGILL-R-THY1-APP.....	17
6.1	Konstrukt a akumulace A $\beta$ .....	17
6.2	Změna kognitivních funkcí .....	18
6.3	Mitochondriální dysfunkce.....	19

## EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

7	CÍLE PRÁCE.....	21
8	METODY A MATERIÁL .....	22
8.1	Analyzovaný materiál.....	22
8.2	Pomůcky a přístroje.....	23
8.3	Pufry a roztoky .....	23
8.4	Vlastní metody: .....	24
8.4.1	Izolace mitochondrií .....	24
8.4.2	Stanovení celkové hladiny mitochondriálních proteinů metodou Bradford .....	25
8.4.3	ELISA – obecný princip .....	25

8.4.4	Stanovení hladin 17 $\beta$ HSD10 metodou kvantitativní kompetitivní ELISA v mitochondriích izolovaných z mozku potkana.....	26
8.4.5	Stanovení hladin 17 $\beta$ HSD10 metodou semikvantitativní sandwichová ELISA v mitochondriích izolovaných z mozku potkana.....	27
8.4.6	Stanovení hladin CypD metodou kvantitativní sandwichová ELISA v mitochondriích izolovaných z mozku potkana.....	27
8.4.7	Stanovení hladin konformačně změněného A $\beta$ (1-42) a celkového A $\beta$ metodou semikvantitativní sandwichová ELISA v mitochondriích izolovaných z mozku potkana.....	28
8.4.8	Stanovení hladin komplexů 17 $\beta$ HSD10 s celkovým A $\beta$ metodou semikvantitativní sandwichová ELISA v mitochondriích izolovaných z mozku potkana .....	29
8.4.9	Stanovení hladin komplexů 17 $\beta$ HSD10-CypD metodou semikvantitativní sandwichová ELISA v mitochondriích izolovaných z mozku potkana .....	30
8.4.10	Stanovení hladin komplexu 17 $\beta$ HSD10-Parkin metodou semikvantitativní sandwichová ELISA v mozkomíšním moku pacientů s AD.....	31
9	VÝSLEDKY .....	33
9.1	Hladiny 17 $\beta$ HSD10.....	33
9.2	Hladiny CypD.....	34
9.3	Hladiny A $\beta$ (1-42).....	35
9.4	Hladiny celkového A $\beta$ .....	35
9.5	Hladiny komplexů 17 $\beta$ HSD10-CypD .....	36
9.6	Hladiny komplexů 17 $\beta$ HSD10 s celkovým A $\beta$ .....	36
9.7	Hladiny komplexů 17 $\beta$ HSD10-Parkin .....	37
10	DISKUZE.....	38
10.1	Hladiny 17 $\beta$ HSD10 v mitochondriích a jeho schopnost regulovat CypD.....	38
10.2	Porovnání AD a roztroušené sklerózy.....	39
11	ZÁVĚR.....	41
12	POUŽITÁ LITERATURA.....	42
13	PŘÍLOHY.....	51

# LITERÁRNÍ PŘEHLED

# 1 ÚVOD

Alzheimerova choroba (AD, z anglického *Alzheimer's disease*) je neurodegenerativní onemocnění centrální nervové soustavy (CNS), které je nejčastější příčinou demence u lidí pokročilého věku. V současné době jej nelze účinně léčit (Bekris et al., 2010). Dělí se na formu familiární (genetické příčiny a brzký nástup) a sporadickou (neznámé příčiny, pozdní nástup). Histopatologickými znaky AD jsou extracelulární senilní plaky tvořené zejména agregovaným amyloidem  $\beta$  ( $A\beta$ ) a neurofibrilární klubka tvořená hyperfosforylovaným tau proteinem. Jedna ze starších hypotéz přikládala hlavní význam toxicitě nerozpustného extracelulárního amyloidu  $\beta$  tvořícího senilní plaky. V současné době je pozornost obrácena spíše k solubilní oligomerní formě  $A\beta$ , která se akumuluje i intracelulárně a může se dostávat také do mitochondrií (Swerdlow and Khan, 2004). Právě mitochondriální dysfunkce jsou pozorovány u raného stadia AD a jsou dávány do souvislosti s akumulací intracelulárního  $A\beta$ , který může uvnitř mitochondrie interagovat např. s různými proteiny. Jedním z takových proteinů je 17 $\beta$ -hydroxysteroidová dehydrogenáza typu 10 (17 $\beta$ HSD10) nacházející se v mitochondriální matrix. 17 $\beta$ HSD10 má řadu významných enzymatických i neenzymatických funkcí a je důležitý např. pro regulaci proteinu cyklofilinu D. Ukazuje se, že interakce s  $A\beta$  tyto funkce 17 $\beta$ HSD10 narušuje. U lidí s AD byla nalezena výrazná overexprese 17 $\beta$ HSD10 v mozku a zvýšené koncentrace v mozkomíšním moku (Yan and Stern, 2005; Kristofíková et al., 2009).

Bylo vyvinuto mnoho genetických i negenetických animálních modelů AD, jejichž cílem je modelovat patologii této choroby. Jedním z nejlepších modelů je linie transgenních potkanů McGill-R-Thy1-APP. U těchto potkanů je vyvinuta exprese mutované formy genu pro lidský amyloidový prekurzorový protein (APP). Gen nese dvě klíčové mutace – dvojitou švédskou (Swe) a indiánskou (Ind), které jsou obdobné jako u pacientů s familiární formou AD (Zimmer et al., 2014). Dochází zde k intracelulární akumulaci rozpustné formy  $A\beta$  již ve věku 3 měsíců, k tvorbě amyloidních plaků v některých oblastech mozku až daleko později (Leon et al., 2010). Pozorovány byly u těchto zvířat také neuronální mitochondriální dysfunkce ve věku 6 měsíců (Adami et al., 2015).

Naším cílem bylo změřit hladiny 17 $\beta$ HSD10 v izolovaných mitochondriích z mozku těchto potkanů a porovnat je se změnami u pacientů s AD. Dalším cílem bylo zjistit, zda jsou interakce 17 $\beta$ HSD10 s cyklofilinem D ovlivněny v přítomnosti peptidů  $A\beta$ . Nakonec jsme chtěli porovnat změny vyvolané AD se změnami u lidí s roztroušenou sklerózou, kde byly zvýšené hladiny 17 $\beta$ HSD10 v mozkomíšním moku také nalezeny.

## 2 ALZHEIMEROVA CHOROBA

Alzheimerova choroba (AD) je progresivní neurodegenerativní onemocnění CNS, které je nejčastější příčinou demence u lidí pokročilého věku. Uvádí se prevalence kolem 10 % po 65. roce a více než jedna třetina populace po 85. roce věku ve vyspělých zemích (Qiu et al., 2009; Iulita et al., 2014). AD spolu s dalšími neurodegenerativními onemocněními představují závažný zdravotní problém, který negativně ovlivňuje kvalitu života stárnoucí populace.

Za objevitele AD je považován německý psychiatr Alois Alzheimer, který toto onemocnění popsal v roce 1901 na případu pacientky Auguste Deter (Farinde, 2012). Méně známým faktem je, že ve stejném roce publikoval studii 12 nálezů senilní demence český vědec německo-židovského původu Otakar Fischer, který zůstal ve stínu Alzheimerova. Někteří odborníci proto navrhuji korektnější název Fischer-Alzheimerova choroba (Goedert, 2009).

### 2.1 Formy AD a rizikové faktory

Je známo, že AD je multifaktoriální onemocnění, kde dochází k integraci různých genetických i environmentálních faktorů (Marchant and Howard, 2015).

Rozlišují se dvě základní formy AD – familiární a sporadická (Muirhead et al., 2010). Familiární forma AD je genetické onemocnění s autozomálně dominantní dědičností. Jedná se o časný typ AD - vyskytuje se zpravidla před 65. rokem věku (Blennow et al., 2006). Způsobena je mutacemi v genu pro amyloidní prekurzorový protein (APP) a dvou genech kódující proteiny účastníci se v procesu štěpení APP (komponenty komplexu  $\gamma$ -sekretázy) – presenilin 1 (PSEN1) a presenilin 2 (PSEN2) (Bird, 2008). Tato forma AD je atypická a z celkového výskytu AD tvoří asi jen 5 % (Bayer and Wirths, 2010). Drtivá většina případů AD (kolem 95 %) je však tzv. sporadická forma. Typická je pozdním výskytem – po 65. roce věku (Hampel and Lista, 2012). Jedním z uváděných genetických rizikových faktorů sporadické formy je  $\epsilon$ 4 alela apolipoproteinu E (ApoE), transportéru cholesterolu v mozku. Tato alela podporuje akumulaci A $\beta$  a formování amyloidních plaků (Blennow et al., 2006). Mezi další rizikové faktory kromě věku patří také deprese, úzkost, poruchy spánku, neuroticismus a dlouhodobý stres (Marchant and Howard, 2015). Významnou roli mohou hrát i různé faktory v rámci životního stylu jako je kouření, obezita, intoxikace drogami, deficity vitaminů, nemoci štítné žlázy, diabetes atd. (Blennow et al., 2006; Bird, 2008).

## 2.2 Patofyziologie

Klinicky je AD charakterizována úbytkem kognitivních funkcí, z histologického hlediska pak výskytem amyloidu  $\beta$  ( $A\beta$ ) agregovaného do senilních plaků a hyperfosforylovaného tau proteinu tvořícího neurofibrilární klubka. Typický je úbytek synapsí i neuronů (Murphy and LeVine, 2010). AD je také doprovázena chronickými zánětlivými procesy, dochází k aktivaci mikroglíí a astrocytů vedoucí k sekreci mediátorů zánětu. Tvoří se nadměrné množství reaktivních forem kyslíku (ROS) poškozující neurony (Sastre et al., 2011). Hlavními pozorovatelnými symptomy jsou poruchy paměti, problémy s orientací a percepcí, změna osobnosti a chování, jež pak postupně ústí v neschopnost postarat se o sebe sama a vykonávat běžné každodenní aktivity (Farinde, 2012).

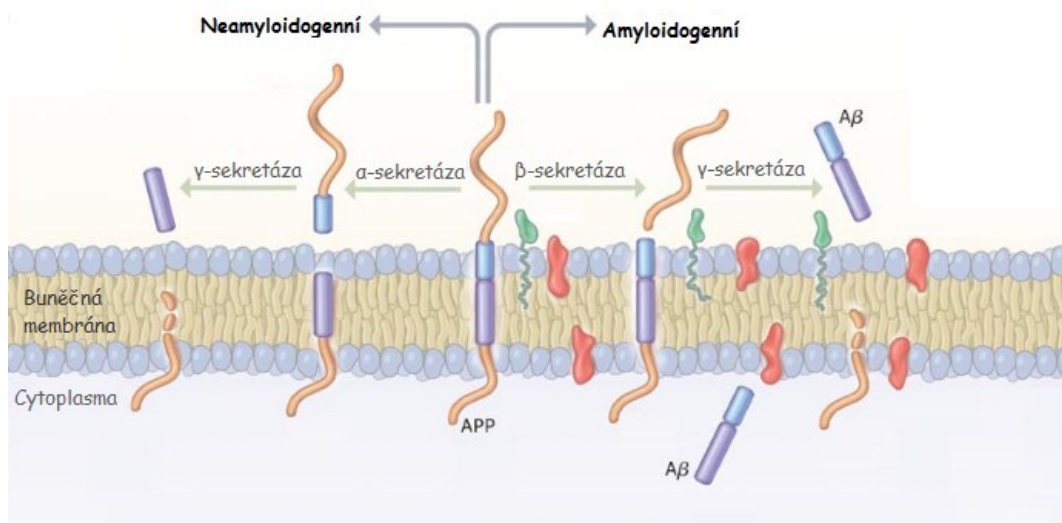
Rozvoj AD začíná již desítky let před tím, než se začnou projevovat první klinické příznaky (Do Carmo and Cuello, 2013). V současné době toto onemocnění nelze vyléčit, lze pouze částečně zpomalit jeho progresi (Bekris et al., 2010). Jako léčivo jsou používány např. inhibitory acetylcholinesterázy, kompenzující úbytek neurotransmiteru acetylcholinu vzniklý důsledkem poškození cholinergních neuronů (Talesa, 2001) nebo antagonisté NMDA receptorů (memantin) zmírňující excitotoxicitu způsobenou nadměrným výlevem glutamátu (Blennow et al., 2006).

Předpokládá se, že v rozvoji AD hrají klíčovou roli peptidy  $A\beta$  a protein tau (Duyckaerts et al., 2009). Lokalizace míst zasažených  $A\beta$  a tau proteinem odpovídá oblastem mozku, kde při AD dochází k rozsáhlému úbytku neuronů – nejprve v hipokampu a entorhinální kůře, poté v dalších korových i podkorových oblastech (Muirhead et al., 2010).

### 2.2.1 Amyloid $\beta$

$A\beta$  vzniká štěpením vysoce konzervovaného amyloidního prekurzorového proteinu (APP), jehož gen je u lidí lokalizovaný na 21. chromozomu (Dawkins and Small, 2014). APP se běžně nachází na plasmatické membráně buněk všech tkání (Pagani and Eckert, 2011) a má pravděpodobně význam pro buněčnou adhezi, funkci synapsí a neuronální plasticitu (Priller et al., 2006). APP může být štěpen dvěma odlišnými způsoby – cestou amyloidogenní pomocí proteolytických enzymů  $\beta$ - a  $\gamma$ -sekretáza, nebo cestou neamyloidogenní pomocí enzymů  $\alpha$ - a  $\gamma$ -sekretáza (O'Brien and Wong, 2011). Za fyziologických podmínek prochází asi jen 10 % APP cestou amyloidogenní, tedy vedoucí ke vzniku  $A\beta$ . Zbýlých 90 % APP nevede ke vzniku  $A\beta$ , tedy projde cestou neamyloidogenní (Murphy and LeVine, 2010). Obě cesty jsou významné pro správnou funkci neuronů, pokud jsou ve správném poměru. V důsledku mutací genů pro APP nebo PSEN1/PSEN2 (tvoří katalytickou podjednotku  $\gamma$ -sekretázy) se však poměry mohou změnit, a to směrem ke zvýšenému vzniku  $A\beta$ . Mutace v genu pro APP zvyšuje štěpící aktivitu  $\beta$ -sekretázy, mutace v genech pro PSEN1/PSEN2 pak stimuluje štěpení  $\gamma$ -sekretázou (Patterson et al., 2008). Následkem nepřesného štěpení  $\gamma$ -sekretázou vzniká více izoform  $A\beta$ , které se liší svou

C-terminální doménou. Dvě nejčastější izoformy jsou A $\beta$ (1-40) a A $\beta$ (1-42), tj. s poslední aminokyselinou na pozici 40 nebo 42 (Murphy and LeVine, 2010). Vzniklé monomery A $\beta$  pak mohou oligomerizovat nebo agregovat vně nervových buněk a vytvářet tzv. amyloidní senilní plaký (Benilova et al., 2012). A $\beta$ (1-42) je více hydrofobní a má větší sklon k agregaci, je proto hlavní součástí těchto plaků (Murphy and LeVine, 2010). Nejprve se z A $\beta$ (1-42) vytvoří denzní jádro plaku, poté se inkorporuje i A $\beta$ (1-40) a další komponenty (Toga and Thompson, 2003).



**Obr. 1: Schéma štěpení APP.** Neamyloidogenní cesta – APP je nejprve štěpen  $\alpha$ -sekretázou uvnitř segmentu A $\beta$  a poté je štěpen  $\gamma$ -sekretázou; A $\beta$  nevzniká. Amyloidogenní cesta – štěpení APP je iniciováno  $\beta$ -sekretázou, poté štěpí  $\gamma$ -sekretáza za vzniku volného A $\beta$ , který může oligomerizovat a agregovat. (Převzato z Querfurth and LaFerla, 2010, upraveno.)

Nerozpustná fibrilární forma A $\beta$  tvořící extracelulární plaký byla původně považována za hlavní příčinu toxických účinků A $\beta$  – tzv. amyloidní kaskádová hypotéza (Reitz, 2012). U animálních transgenních modelů AD byl však pozorován kognitivní deficit ještě před výskytem extracelulárních plaků a tato pozorování vedla k přesměrování pozornosti na rozpustnou oligomerní formu A $\beta$  uvnitř buněk (LaFerla and Green, 2012). Intracelulární A $\beta$  se shlukuje do oligomerů složených z 2–30 monomerů, dříve než dochází k tvorbě extracelulárních plaků. Experimentální data naznačují, že toxicita intracelulárního A $\beta$  převyšuje toxicitu extracelulárního (Yan and Stern, 2005). Zdá se, že hladiny intracelulárního A $\beta$  v mozku lépe korelují s kognitivním poškozením a se stádiem neurodegenerace než množství plaků (Muirhead et al., 2010). Podle nových poznatků se A $\beta$  může dostávat až do mitochondrií, kde interaguje s dalšími proteiny (Lustbader et al., 2004). Následkem těchto interakcí může docházet k narušení homeostázy a nakonec i otevírání mitochondriálních pórů vedoucí k buněčné smrti (Muirhead et al., 2010). Postupně tak byla vytvořena hypotéza, že mitochondrie hrají významnou roli v progresi AD – tzv. mitochondriální kaskádová hypotéza (Swerdlow and Khan, 2004).

### 2.2.2 Tau protein

Tau protein je protein asociovaný s mikrotubuly (*tubulin-associated unit*), který se běžně nachází v axonech neuronů. Existuje v 6 izoformách a je důležitý pro sestavování a stabilizaci mikrotubulů, a tedy pro celkové udržení molekulární kostry neuronu (Magnani et al., 2007). Fosforylace tau proteinu moduluje vazbu k mikrotubulům a schopnost jejich stabilizace (Brion, 2006). Za normálních podmínek je fosforylace v rovnováze s defosforylací, avšak při patologii AD bývá tau protein hyperfosforylován, což způsobuje jeho vyvázání z mikrotubulů (Benilova et al., 2012). Tau protein je poté dislokován z axonu do dendritů a soma neuronu, kde se shlukuje do tzv. neurofibrilárních klubek. Akumulace fosforylovaného tau proteinu v dendritických trnech pak narušuje funkci synapsí a tím komunikaci mezi neurony (Hoover et al., 2010). Mikrotubuly bez tau proteinu disociují, molekulární kostra neuronu se rozpadne a neuron degeneruje (Benilova et al., 2012). Existuje teorie předpokládající, že hyperfosforylace tau proteinu se objevuje jako důsledek akumulace A $\beta$  (Oddo et al., 2004). Vzájemný vztah A $\beta$  a tau proteinu je však stále málo probádaný. Jejich interakce jsou zřejmě patologické a přispívají k rozvoji choroby (Manczak and Reddy, 2013).

## 2.3 Diagnostika

V diagnostice neurodegenerativních onemocnění včetně AD je klíčová analýza mozkomíšního moku. Odběr mozkomíšního moku se provádí lumbální punkcí, z oblasti mezi bederními L4 a L5 obratli (Parada et al., 2007; Jesse et al., 2011). Jelikož je mozkomíšní mok v přímém kontaktu s CNS, předpokládá se, že jakákoliv změna v biochemickém složení mozkové tkáně se odrazí také ve složení mozkomíšního moku (Wiltfang et al., 2005). Za patologických podmínek lze v mozkomíšním moku naměřit zvýšené koncentrace původně intracelulárně lokalizovaných proteinů, naznačující poškození nebo rozpad neuronů během neurodegenerativních procesů (Walko et al., 2014). Biomarkery stanovené v mozkomíšním moku reflektují změny v mozku vyvolané AD citlivěji než biomarkery v séru nebo plasmě (Wiltfang et al., 2005). Ideální biomarker by měl být vysoce senzitivní (tzn. i k raným stádiím onemocnění), specifický (i při srovnání s jinými typy demence) a měl by monitorovat průběh nemoci. Takový biomarker AD však ještě nebyl objeven (Frey et al., 2005). Současnými biomarkery AD jsou hladiny tau proteinu (celkového a fosforylovaného) a A $\beta$ (1-42) stanovené z mozkomíšního moku (Chiaravalloti et al., 2017).

### 3 MITOCHONDRIE A AD

Mitochondrie jsou dynamické orgány neustále fúzující a dělící se, tvořící propojenou síť, kde se odehrává mnoho procesů. Jejich ústřední rolí je energetický metabolismus – mitochondriální oxidativní fosforylace je hlavní cesta produkce ATP, zásobující přes 95 % veškerých energetických požadavků buněk. Další důležité funkce mitochondrie jsou regulace hladiny intracelulárního  $\text{Ca}^{2+}$ , regulace signálních kaskád a buněčné smrti. Mitochondrie jsou také hlavním zdrojem produkce ROS (Rezin et al., 2009; Morais and De Strooper, 2010). Nervová tkáň má vysoké energetické požadavky, obsahuje proto velké množství mitochondrií, zejména v oblasti synapsí. Zároveň jsou ale neurony velmi náchylné k redukci aerobního metabolismu (Rezin et al., 2009)

Funkce mitochondrie bývají při AD narušeny. Dochází k nabourání homeostázy  $\text{Ca}^{2+}$ , oslabení oxidativní fosforylace a tedy snížení produkce ATP, zvyšuje se produkce ROS a mění se dynamika i morfologie mitochondrií (Pagani and Eckert, 2011). Příčina těchto změn v mitochondriích není úplně známa, je však řada důkazů pro souvislost se zvýšenými hladinami peptidu A $\beta$ . Mechanismy patologických účinků A $\beta$  akumulovaného v mitochondriích ještě nebyly detailněji popsány.

U pacientů s AD bylo prokázáno snížení energetického metabolismu v postižených oblastech mozku (Mosconi et al., 2008). Při patogenezi AD, stejně jako u některých dalších neuropsychiatrických chorob, je za důležitý faktor považováno poškození funkce dýchacího řetězce mitochondrie. Podobné poškození mitochondrií bylo způsobeno i zvýšenými koncentracemi A $\beta$  v experimentu *in vivo* nebo *in vitro* (Keil et al., 2004; Tillement et al., 2011). Předpokládá se, že za výskyt mitochondriálních dysfunkcí objevujících se při AD je zodpovědný intracelulární rozpustný A $\beta$ , spíše než extracelulární fibrilární peptid tvořící plaky (Morais and De Strooper, 2010). Mitochondriální kaskádovou hypotézu AD potvrzuje řada studií (Swerdlow and Khan, 2004).

A $\beta$  se jeví jako inhibitor mitochondriálních enzymů (Hernandez-Zimbron et al., 2012). V CNS i periferních tkáních pacientů s AD byla zjištěna nedostatečná funkce některých mitochondriálních enzymů, zejména cytochrom c oxidázy (komplexu IV dýchacího řetězce) (Yan and Stern, 2005). Dochází k narušení transportu elektronů v dýchacím řetězci, produkce ATP, spotřeby kyslíku a membránového potenciálu mitochondrie, což vede ke zvýšení oxidativního stresu, vylití cytochromu c z mezimembránového prostoru a následné apoptóze (Morais and De Strooper, 2010). Se sníženou aktivitou cytochrom c oxidázy jsou také spojovány defekty mitochondriální DNA (Reddy and Beal, 2008) a proces autofagie v případě takto poškozených mitochondrií (Hirai et al., 2001). Studie *in situ* hybridizace mitochondriální DNA a imunocytochemie cytochrom c oxidázy ukázaly, že neurony vykazující zvýšené oxidativní poškození při AD měly zvýšené hladiny mitochondriální DNA a cytochrom c oxidázy v cytoplasmě, což odpovídá signifikantně sníženému

počtu mitochondrií v takové tkáni (Morais and De Strooper, 2010). V *post mortem* tkáni mozku jedinců s AD byly pozorovány snížené hladiny také některých enzymů Krebsova cyklu (např.  $\alpha$ -ketoglutarát dehydrogenáza), což koreluje s nedostatečnou produkcí acetyl-CoA a cholinergními defekty zjištěnými u AD (Pagani and Eckert, 2011). Dále byly pozorovány snížené hladiny pyruvát dehydrogenázy a s tím spojené defekty v utilizaci glukózy při AD (Yan and Stern, 2005; Selfridge et al., 2013). Podle některých autorů právě snížené energetické hladiny mitochondrií způsobují hyperfosforylaci a agregaci tau proteinu (Swerdlow et al., 2010).

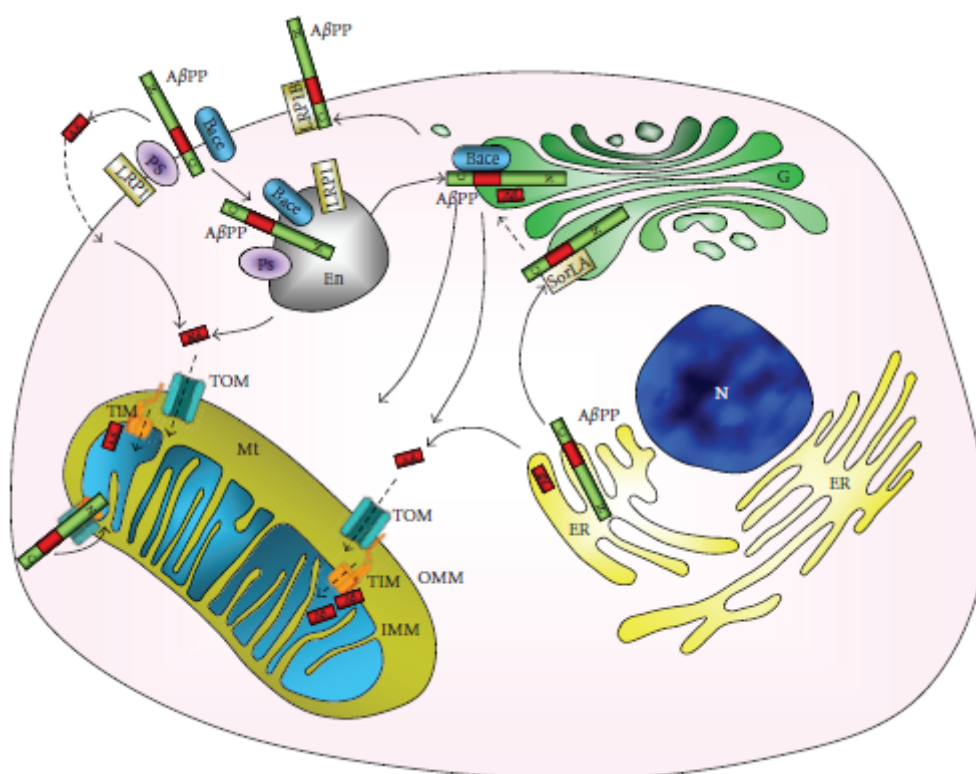
Ve zdravých neuronech je udržována dynamická rovnováha mezi mitochondriálním fúzováním a štěpením, při AD dochází působením  $A\beta$  k posunutí směrem ke štěpení. Mitochondrie jsou pak nadměrně fragmentované a to je další z faktorů způsobujících jejich dysfunkce (Chen and Chan, 2009).  $A\beta$  také nejspíš ovlivňuje axonální transport mitochondrií. Studie na drozofilím modelu AD objevily výrazný úbytek presynaptických mitochondrií a snížený axonální transport mitochondrií, což následně způsobuje nefunkčnost synapsí (Zhao et al., 2010). Tím je narušena synaptická plasticita neuronů (Mattson, 2007).

Ačkoli dostupné evidence jasně ukazují, že  $A\beta$  ovlivňuje funkci mitochondrií, původ mitochondriálního  $A\beta$  je stále předmětem debaty.  $A\beta$  je vytvářen na plasmatické membráně, ale i v endoplasmatickém retikulu (ER) a Golgiho aparátu (GA). Do mitochondrií se tedy  $A\beta$  může dostávat z membrány endosomálním systémem nebo transportem z ER a GA (Pagani and Eckert, 2011). Dovnitř mitochondrie je pak  $A\beta$  importován přes translokázy vnější (TOM) a vnitřní mitochondriální membrány (TIM). Lokální produkce  $A\beta$  uvnitř mitochondrií je nepravděpodobná (Hansson Petersen et al., 2008). Také přesná lokace  $A\beta$  v mitochondriích je sporná. V mnoha studiích byl  $A\beta$  nalezen pouze asociovaný s vnitřní mitochondriální membránou a nikoli přímo v matrix, v rozporu by pak ale byly nálezy interakcí  $A\beta$  s proteiny mitochondriální matrix (Benek et al., 2015). Důvodem však může být rychlá degradace  $A\beta$  v matrix mitochondriálními proteázami (Alikhani et al., 2009). Pravděpodobně se tedy  $A\beta$  nachází jak na vnější i vnitřní mitochondriální membráně, tak i v mezimembránovém prostoru a matrix mitochondrie (Pagani and Eckert, 2011).

$A\beta$  a jeho prekurzor APP se tedy zřejmě nacházejí i v membránách mitochondrie, kde mohou blokovat transport mitochondriálních proteinů kódovaných jádrem dovnitř mitochondrií (Reddy and Beal, 2008) a také mitochondriální membránu poškozují (peroxidací lipidů, hydrolyzou sfingomyelinu), a mohou tak podporovat dysfunkce mitochondrií zvýšenou tvorbou ROS a zvýšeným vychytáváním  $Ca^{2+}$  dovnitř mitochondrií (Mattson et al., 2008).

V mezimembránovém prostoru může  $A\beta$  ovlivňovat vlastností obou mitochondriálních membrán, např. modulací jejich permeability.

V matrix pak může A $\beta$  interagovat s důležitými komponentami metabolických a antioxidačních drah. Byla zjištěna i interakce A $\beta$  s několika mitochondriálními proteiny, která může vést ke změnám jejich fyziologických funkcí a následným mitochondriálním dysfunkcím ústícím k rozvoji AD. Jedním z důležitých proteinů interagujících s A $\beta$  kromě zmiňovaných enzymů dýchacího řetězce je 17 $\beta$ -hydroxysteroidová dehydrogenáza typu 10 (Benek et al., 2015), která je předmětem následující kapitoly.



**Obr. 2: Intracelulární lokalizace APP a A $\beta$ .** Zdroje mitochondriálního A $\beta$  mohou být endosom, ER a GA. APP syntetizovaný v ER je dopravován přes GA na plasmatickou membránu nebo do mitochondrie. Membránový APP je spolu s dalšími proteiny internalizován endosomem. Z APP poté vzniká A $\beta$  amyloidogenním štěpením. Dovnitř mitochondrie A $\beta$  proniká skrze TOM/TIM komplex. N – jádro, ER – endoplasmatické retikulum, GA – Golgiho aparát, En – endosom, Mt – mitochondrie (Převzato z Pagani and Eckert, 2011)

## 4 17 $\beta$ -HYDROXYSTEROIDOVÁ DEHYDROGENÁZA TYPU 10

### 4.1 Struktura a funkce

17 $\beta$ -hydroxysteroidová dehydrogenáza typu 10 (17 $\beta$ HSD10) je multifunkční protein mitochondriální matrix vykazující řadu enzymatických i neenzymatických funkcí. Patří do SDR rodiny enzymů, což jsou krátkořetězcové dehydrogenázy/reduktázy (z anglického *short-chain dehydrogenase/reductase*) (Yang et al., 2014). S ostatními členy rodiny sdílí mnoho vlastností, včetně katalytického místa a přítomnosti NAD<sup>+</sup> kofaktoru (Yan and Stern, 2005). Ze všech 14 různých 17 $\beta$ -hydroxysteroidových dehydrogenáz je typ 10 jako jediný lokalizovaný v mitochondriích. Je to homotetramer o molekulové hmotnosti 108 kDa; každá ze 4 identických podjednotek se skládá z 261 aminokyselinových zbytků (Yang et al., 2014).

Tento protein nese řadu alternativních názvů. Kromě 17 $\beta$ HSD10 bývá někdy označován jako HADH2 (3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenáza typu 2) nebo SCHAD (krátkořetězcová hydroxyacyl-CoA dehydrogenáza) či také ERAB (s ER asociovaný A $\beta$  vázající protein) a ABAD (A $\beta$  vázající alkohol dehydrogenáza) (Muirhead et al., 2010). Poslední dvě uvedená pojmenování jsou nepřesná, neboť protein byl v endoplasmatickém retikulu identifikován mylně a jeho alkohol dehydrogenázová aktivita je zanedbatelná (Yang et al., 2005). V této diplomové práci používám výhradně název 17 $\beta$ HSD10; v praktické části na některých místech výjimečně uvádím i pojmenování ERAB – pouze však pokud jde o součást oficiálního názvu od výrobce.

17 $\beta$ HSD10 má na rozdíl od ostatních enzymů ze své rodiny širokou substrátovou specifitu (Yan and Stern, 2005). Jeho hlavní fyziologickou funkcí je úloha v 3. kroku  $\beta$ -oxidace rozvětvených mastných kyselin, účastní se ale i několika dalších metabolických drah (Benek et al., 2015). Katalyzuje například degradaci izoleucinu, oxidaci neuroaktivních steroidů a je zahrnut v metabolismu pohlavních hormonů (Yang et al., 2014). Jeho schopnost využívat kyselinu  $\beta$ -hydroxymáselnou (patřící mezi ketolátky) výrazně přispívá k obraně buňky proti metabolickému stresu (Benek et al., 2015). V lidské tkáni se mRNA pro 17 $\beta$ HSD10 vytváří prakticky všude. Nejvyšší hladiny jsou v játrech a srdci, exprimován je ale i v různých oblastech mozku – nejhojněji v hipokampu, hypothalamu a amygdale, částečně pak i v mozkové kůře (He et al., 2005).

17 $\beta$ HSD10 má řadu esenciálních funkcí, zejména v ontogenezi (Chen and Yan, 2010). Kódován je genem lokalizovaným na pohlavním X chromozomu (Yang et al., 2005) a deficit proteinu 17 $\beta$ HSD10 nebo ztráta jeho funkce jsou asociovány s různými patologiemi (Yang et al., 2014). U buněk knockoutovaných v genu pro 17 $\beta$ HSD10 byl zjištěn výrazný pokles proliferace a životaschopnosti buněk (Deutschmann et al., 2014). V experimentech na drozofilách se vyřazení 17 $\beta$ HSD10 z funkce projevilo letálním fenotypem s mnoha abnormalitami (Torroja et al., 1998).

Výsledky pokusů na transgenních zvířatech se zvýšenou expresí 17 $\beta$ HSD10 naopak podpořily protektivní roli proteinu (např. v modelu Parkinsonovy choroby, ischemie či oxidativního stresu) (Tieu et al., 2004). Podle dat z lidských studií mají některé mutace genu pro 17 $\beta$ HSD10 za následek smrtelnou dětskou chorobu zvanou HSD10, danou deficitem 17 $\beta$ HSD10 (Deutschmann et al., 2014). Jiné mutace nebo up-regulace tohoto genu vedou u lidí nejspíš k mikrocefalii a mentální retardaci (Yang et al., 2009, 2014). Na buněčné úrovni se deficit proteinu projevuje změnou morfologie mitochondrií – většina z nich se jeví jako zaoblené, navíc dochází ke ztrátě struktury krist na vnitřní membráně (Yang et al., 2014). 17 $\beta$ HSD10 je tedy protein esenciální pro strukturální a funkční integritu mitochondrií (Rauschenberger et al., 2010), vedle deficitu však působí nepříznivě i jeho nadměrná exprese, která způsobuje kondenzaci mitochondriální matrix a částečnou ztrátu struktury krist, což vede k mitochondriální dysfunkci (Shafiqat et al., 2003).



**Obr. 3: Krystalická struktura lidského 17 $\beta$ HSD10.** Protein se skládá ze 4 podjednotek; na obrázku s navázaným inhibítoem. (Převzato z Kissinger et al., 2004.)

Bez výskytu zvýšeného A $\beta$ , ať už za homeostatických či oxidačních podmínek, se jeví působení 17 $\beta$ HSD10 v buněčné odpovědi jako protektivní (Chen and Yan, 2010) a přispívající k metabolické rovnováze (usnadňuje například využití ketoláték podporou vzniku acetyl-CoA, který zásobuje Krebsův cyklus) (Yan and Stern, 2005). Zvýšená exprese 17 $\beta$ HSD10 je tedy pravděpodobně primárně protektivní mechanismus, který se ale vymyká kontrole např. v přítomnosti A $\beta$  a působí patogenně (Yan et al., 2007).

## 4.2 Interakce 17βHSD10 s Aβ

Řada funkcí proteinu 17βHSD10 je založena na jeho schopnosti interagovat s dalšími peptidy nebo proteiny (např. estrogenový receptor  $\alpha$  a tRNA methyltransferáza). Pro patologii spojenou s rozvojem AD se ukazuje být důležitá zejména interakce s Aβ (Yan and Stern, 2005; Yang et al., 2014).

Mozková tkáň jedinců s AD, včetně animálních modelů této choroby, vykazuje abnormálně zvýšenou expresi 17βHSD10, obzvláště v okolí ložisek Aβ (Lustbader et al., 2004; Yan and Stern, 2005). Neurony napadené Aβ totiž zvyšují syntézu specifických mitochondriálních enzymů, mezi nimi také právě 17βHSD10 (Lovell et al., 2005). Zvýšená exprese 17βHSD10 byla objevena také u aktivovaných astrocytů obklopujících místa zasažená amyloidními plaky a patologickým tau proteinem u pacientů s AD (He et al., 2005). Změny hladin 17βHSD10 mozkomíšním moku, které odrážejí změny v mozkové tkáni, lze pozorovat mnoho let před nástupem symptomů, tj. již ve stádiu mírného kognitivního poškození způsobeného AD (Kristofikova et al., 2015). Zvýšené hladiny 17βHSD10 v mozkomíšním moku však byly zjištěny také u roztroušené sklerózy a schizofrenie, takže lze předpokládat, že overexprese 17βHSD10 není specifickou změnou pro AD (Hovorkova et al., 2008; Kristofiková et al., 2009).

Významným místem ve struktuře 17βHSD10 je tzv. D-smyčka. Zde dochází k navázání první molekuly monomerního Aβ vysokoafinitní vazbou. Tato iniciační vazba nezmění výrazněji enzymatickou aktivitu proteinu a předpokládá se, že by 17βHSD10 mohl působit jako fyziologický mitochondriální nosič Aβ (Lustbader et al., 2004). Při postupném tvoření oligomerního nebo agregovaného Aβ však dochází i k nescifickým interakcím, pokřivení struktury proteinu a vyvázání  $\text{NAD}^+$  kofaktoru, což vede ke změně funkcí 17βHSD10. Interakce Aβ s 17βHSD10 je jedním z mechanismů toxického působení Aβ v mitochondriích (Lustbader et al., 2004; Yan et al., 2007). Formování komplexů 17βHSD10 s Aβ vede ke změnám vlastností mitochondrií a k jejich dysfunkcím, které jsou raným znakem AD (Yan and Stern, 2005). Neurony s dysfunkčními mitochondriemi vykazují spontánní vznik ROS poškozující membrány, snížení hladiny ATP a uvolnění cytochromu c z mezimembránového prostoru mitochondrií vedoucí k apoptóze neuronů (Takuma et al., 2005).

Studie na dvojité transgenních myších zvýšeně exprimujících mutantní lidský APP a 17βHSD10 potvrzují nepříznivý vliv overexprese proteinu v přítomnosti nadbytku Aβ. Bylo pozorováno zhoršení prostorového učení a paměti, v hipokampu vyšší hladiny ROS a poškození cholinergního systému a další změny typické pro AD (Lustbader et al., 2004; Tieu et al., 2004).

Zdá se, že by interakce 17βHSD10 s Aβ mohla být potenciálně efektivním cílem pro terapeutickou intervenci u AD (Yao et al., 2007; Chen and Yan, 2010). Protože pouze

katalyicky aktivní 17 $\beta$ HSD10 podporuje cytotoxické působení A $\beta$ , navrženy byly inhibitory 17 $\beta$ HSD10. Zde ale zůstává otázkou množství vedlejších účinků, neboť inhibitory by mohly potlačit i řadu fyziologických funkcí 17 $\beta$ HSD10 (Benek et al., 2015). Další snahou bylo zavedení peptidu mimikujícího vazebné místo 17 $\beta$ HSD10 pro A $\beta$  (D-smyčku), který by vyvázal A $\beta$  a znemožnil by tak jeho vazbu k 17 $\beta$ HSD10. Takové pokusy byly zatím úspěšně testovány v in vitro studii a na transgenních myších modelech (Lustbader et al., 2004).

### 4.3 Další interakce a regulace 17 $\beta$ HSD10

17 $\beta$ HSD10 je protein kódovaný jádrem. Z cytoplasmy, kde vznikne, musí být transportován do mitochondrií. Děje se tak procesem, který využívá většina mitochondriálních proteinů kódovaných jádrem, tj. drahou přes membránové translokázy mitochondrie TOM/TIM regulovanou PINK1-Parkin mechanismem (Bertolin et al., 2015).

Parkin je cytoplasmatický enzym s ubikvitin-ligázovou aktivitou, zahrnutý v různých buněčných procesech. Mutace v tomto genu jsou např. příčinou vzniku autozomálně recesivní formy Parkinsonovy choroby (Shimura et al., 2000). Společně s kinázou PINK1 jsou komponenty biochemické dráhy regulující dynamiku a morfologii mitochondrií. V savčích buňkách kooperují Parkin a PINK1 také v procesu odstraňování dysfunkčních mitochondrií (Bertolin et al., 2015).

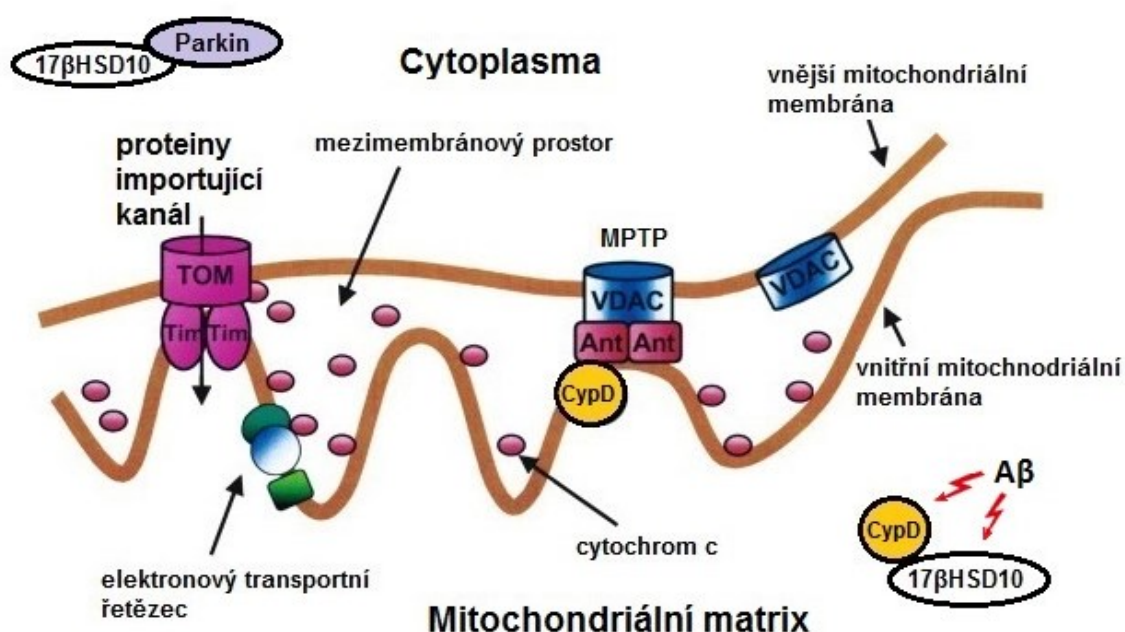
Bylo zjištěno, že Parkin interaguje s 17 $\beta$ HSD10 a po navázání se oba proteiny dostávají ke komplexu TOM, do blízkosti PINK1. Parkin a PINK1 asociují s TOM komplexem, a 17 $\beta$ HSD10 je tak skrz komplex importována do mitochondrie (Bertolin et al., 2015).

Interakce Parkinu s 17 $\beta$ HSD10 tedy určuje, jaké množství 17 $\beta$ HSD10 se dostane dovnitř mitochondrie. Overexprese Parkinu v buňkách zvyšuje množství 17 $\beta$ HSD10 v mitochondriích, down-regulace genu pro Parkin naopak způsobuje nedostatek 17 $\beta$ HSD10. Ukazuje se, že udržování 17 $\beta$ HSD10 na přiměřené hladině je jedním z mechanismů, kterým Parkin zabezpečuje kvalitu mitochondrií. Ztráta takového protektivního mechanismu přispívá k dysfunkci mitochondrií a celkové neuronální degeneraci (Bertolin et al., 2015).

Dalším proteinem interagujícím s 17 $\beta$ HSD10 je cyklofilin D (CypD). CypD se nachází v mitochondriální matrix a mimo jiné má úlohu chaperonu při sbalování proteinů (Javadov and Kuznetsov, 2013). Regulován je vazbou k 17 $\beta$ HSD10. Za podmínek oxidativního stresu je však vazba 17 $\beta$ HSD10-CypD oslabena a CypD je translokován na vnitřní mitochondriální membránu, kde se váže na mitochondriální permeabilní transitorní pór (MPTP). MPTP má klíčovou roli v apoptóze – jeho otevřením dochází k narušení iontové rovnováhy a kolapsu membránového potenciálu. Z vnitřní strany je tento pór tvořen Ant (adenine nukleotid translokázou), z vnější strany

potom VDAC (napětově závislým aniontovým kanálem). CypD asociuje s ANT a přispívá tak k otevření MPTP (Muirhead et al., 2010).

Předpokládá se, že akumulace A $\beta$  v mitochondriích ovlivňuje i vzájemné interakce 17 $\beta$ HSD10 a CypD, protože se A $\beta$  k oběma proteinům váže (Muirhead et al., 2010). Komplexy 17 $\beta$ HSD10-A $\beta$  omezují schopnost 17 $\beta$ HSD10 regulovat CypD, a tak CypD, volný nebo navázaný s A $\beta$ , by měl snadněji translokovat k vnitřní mitochondriální membráně a způsobit otevření MPTP (Yan and Stern, 2005). Toto otevírání MPTP vyvolané CypD se ukázalo být úzce spojeno s patologií AD (Benek et al., 2015).



**Obr. 4: Transport 17 $\beta$ HSD10 do mitochondrií a regulace CypD.** 17 $\beta$ HSD10 je za pomoci Parkinu a PINK1 transportován přes TOM/TIM komplex do mitochondriální matrix, kde interaguje s CypD. Zároveň se A $\beta$  přítomný v matrix může vázat na oba proteiny a ovlivňovat jejich vazbu. Při oslabení interakce 17 $\beta$ HSD10-CypD může CypD translokovat a vázat se na MPTP (ten je z vnitřní strany tvořen Ant, z vnější VDAC) a může způsobit jeho otevření vedoucí k apoptóze. V mezimembránovém prostoru mitochondrie se nachází proapoptotický protein cytochrom c, který se v případě otevření MPTP uvolní do cytoplasmy. (Převzato z Newmeyer and Ferguson-Miller, 2003)

## 5 ANIMÁLNÍ MODELY AD

Pro výzkum AD bylo v posledních desetiletích úspěšně vyvinuto mnoho animálních modelů (genetických i negenetických), snažících se reflektovat různé aspekty AD, zejména patologii amyloidních plaků, abnormální fosforylaci tau proteinu, zánětlivé procesy a kognitivní změny (Do Carmo and Cuello, 2013). Tyto modely jsou velmi významné pro determinaci molekulárních mechanismů v progresi choroby a pro testování potenciálních terapeutik. Ačkoli žádný model nezahrnuje všechny aspekty nemoci, dovolují hlubší prozkoumání jedné či dvou komponent, které by z etických důvodů nebylo možné testovat na lidských pacientech (LaFerla and Green, 2012).

V případě genetických modelů byly nejprve z technických důvodů používány výhradně myši – pro svou malou velikost a snazší genetickou manipulaci (injikace DNA u embryí) (Do Carmo and Cuello, 2013). Popsáno bylo přes 100 různých transgenních myších modelů AD [online databáze]. Postupně se více preferovaly modely potkaní, které i přes některé nedostatky nabízí mnoho výhod. Potkani jsou člověku fyziologicky, geneticky i morfologicky bližší než myši, mají komplexnější CNS, větší kognitivní schopnosti a projevují více sociální chování (Jacob and Kwitek, 2002; Do Carmo and Cuello, 2013). Výhodou je také objemnější tělo, resp. mozek zvířete (Zimmer et al., 2014). Pro model AD je u potkanů relevantní i výskyt 6 izoform tau proteinu, které jsou u myši pouze 3 (Benedikz et al., 2009; Heggland et al., 2015).

### 5.1 Genetické modely

Genetických modelů AD je naprostá většina. Jelikož je etiologie sporadické formy AD neznámá, v genetických animálních modelech je většinou využíváno mutací spojených s familiární formou AD (LaFerla and Green, 2012). Transgenní modely mají vyvinutou overexpresi mutantních lidských genů APP, PSEN1 a tau nebo jejich kombinaci (Zimmer et al., 2014).

#### Transgenní modely

APP modely: Princip overexprese lidského mutantního APP je u transgenních modelů AD klíčový koncept (Zimmer et al., 2014). Vede k podobné patologii jako u lidí – tedy akumulaci extracelulárních plaků z A $\beta$ , neuroinflamaci a neurodegeneraci. Důležité zde je, že navzdory konstantní produkci je i u těchto myši akumulace A $\beta$  závislá na věku (Götz et al., 2007). Na rozdíl od lidí s AD, tyto transgenní modely nevytvářejí neurofibrilární klubka, ačkoli u mnoha z nich dochází k hyperfosforylaci tau proteinu. Do této kategorie patří myší modely Tg2576, APP23, J20 a APPE693d a potkaní model McGill-R-Thy1-APP (Götz et al., 2007; Zimmer et al., 2014), který byl použit pro tuto diplomovou práci.

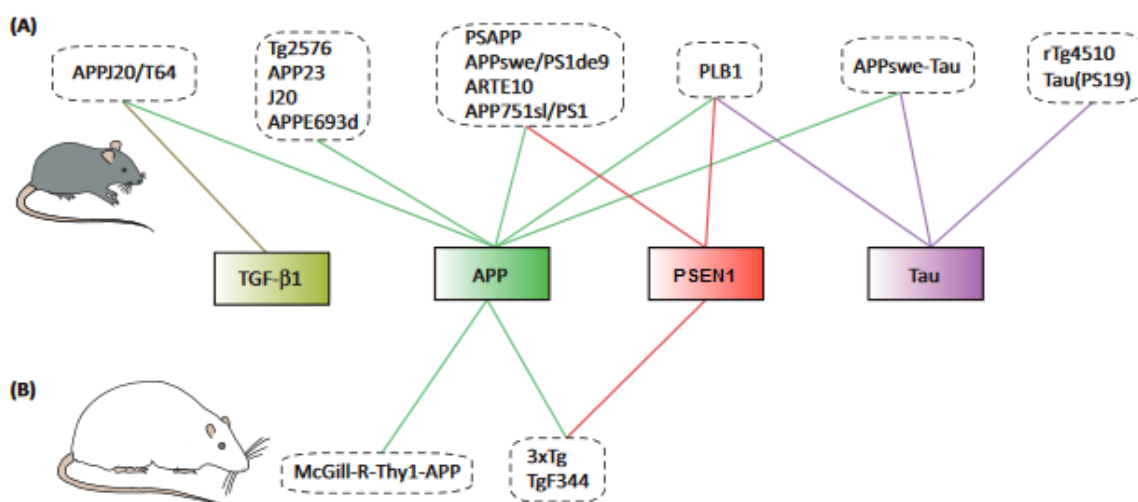
APP/PSEN1 modely: Přidání mutantní formy PSEN1 k APP vedlo k fenotypu s vyšší produkcí A $\beta$ (1-42) a těžší amyloidózou. Patří sem myší modely PSAP, APPswe/PS1de9, ARTE10, APP751sl/PS1 a potkaní modely 3xTg a TgF344 (Zimmer et al., 2014).

APP/TGF- $\beta$ 1 model: Kombinaci mutací APP a cytokinu TGF- $\beta$ 1 nese myší linie APPJ20/T64. Model byl vytvořen ke zkoumání vaskulárních a tkáňových aspektů amyloidózy. Dochází k dysfunkční cerebrovaskulární odpovědi a silné aktivaci mikroglíi (Ongali et al., 2010).

Tau modely: Jsou založeny na mutaci tau proteinu. Dochází u nich k tvorbě neurofibrilárních klubek a úbytku neuronů (tyto dva symptomy většina ostatních modelů postrádá). Jsou to modely rTg4510 a Tau(PS19) (SantaCruz et al., 2005; Yoshiyama et al., 2007).

APP/Tau model: Model exprimující kromě mutantního APP také mutantní lidský tau protein (Lewis et al., 2001). Výskyt intraneuronálního A $\beta$  předcházela akumulaci tau proteinu a imunologické odstranění A $\beta$  vedlo krátce poté k vymizení somatodendritického tau proteinu. Tyto výsledky podporovaly teorii predikující, že hyperfosforylace tau proteinu se objevuje jako důsledek akumulace A $\beta$  (Oddo et al., 2004). Bylo také objeveno, že intracelulární oligomery A $\beta$  inhibují funkci proteasomů, které by za normálních okolností degradovaly přebytečný tau protein, a toto opatření tedy přispívá k agregaci tau proteinu (Oddo, 2008). Takovýmto modelem je myší APPswe-Tau (Zimmer et al., 2014).

APP/PSEN1/Tau model: Pod touto kombinací tří mutantních genů byl očekáván silně patologický fenotyp, avšak myší model PLB1 vykazoval mírný fenotyp s nízkou expresí A $\beta$  (Platt et al., 2011).



**Obr. 5: Přehled transgenních animálních modelů AD.** Transgenní modely mají vyvinutou overexpresi jednotlivých mutantních lidských genů (APP, PSEN1, tau) či jejich kombinaci, a reflektují tak patologii AD. Na obrázku jsou v bílých okénkách uvedeny názvy modelů a barevně jsou propojeny s příslušnými geny.

(A) myší modely, (B) potkaní modely.

(Převzato z Zimmer et al., 2014, upraveno.)

## Další genetické modely

Dále existují modely vytvořené pomocí knockoutu genů. Ty přímo nereflektují patologii AD, ale pomohly identifikovat některé dráhy důležité pro cílení farmak. Např. takto byla identifikována  $\beta$ -sekretáza a presenilin jako kritická součást  $\gamma$ -sekretázy - enzymy nezbytné k produkci  $A\beta$  (LaFerla and Green, 2012). U APP transgenních myši na pozadí knockoutu genu pro tau protein nedocházelo ke kognitivnímu deficitu spojenému s  $A\beta$ . Tau protein se tedy ukázal být nezbytným ve zprostředkování toxického efektu  $A\beta$  a dopadu na kognici (LaFerla and Green, 2012).

## 5.2 Negenetické modely

Existuje i celá řada negenetických modelů, velmi úspěšné se zdají být spontánní modely (viz např. model SAMP8), méně úspěšné pak modely farmakologické (k nejlepším z nich patří model Samaritán).

Model SAMP8: Spontánním modelem AD je myši linie SAMP8 s přirozeným fenotypem urychleného stárnutí. Tyto myši mají normální raný vývoj bez známek růstové retardace. Geny zodpovědné za akcelerovanou senescenci nejsou známy. Myši linie je využívána pro výzkum stárnutí a studují se u ní např. dysfunkce imunity, osteoporóza a právě také atrofie mozku spojená s AD, učení a paměť a kognitivní deficit (Butterfield and Poon, 2005). Vyvíjí také nadprodukcii APP (Morley et al., 2012).

Model Samaritán: Farmakologickým modelem sporadické formy AD je potkaní model zvaný Samaritán (název patentovaný firmou Taconic Pharmaceuticals, USA). Potkanům je osmotickou pumpou zavedenou do mozkové komory aplikován speciální roztok FAB ( $FeSO_4$ ,  $A\beta(1-42)$ , buthionine sulfoximine) indukující tvorbu oxidativního stresu.  $A\beta(1-42)$  začne velmi rychle oligomerizovat, vytvářejí se také neurofibrilární klubka (Lecanu et al., 2006). Následkem dochází u těchto potkanů k narušení paměti a dalších kognitivních funkcí (Petrasek et al., 2016).

## 6 TRANSGENNÍ POTKANI MCGILL-R-THY1-APP

### 6.1 Konstrukt a akumulace A $\beta$

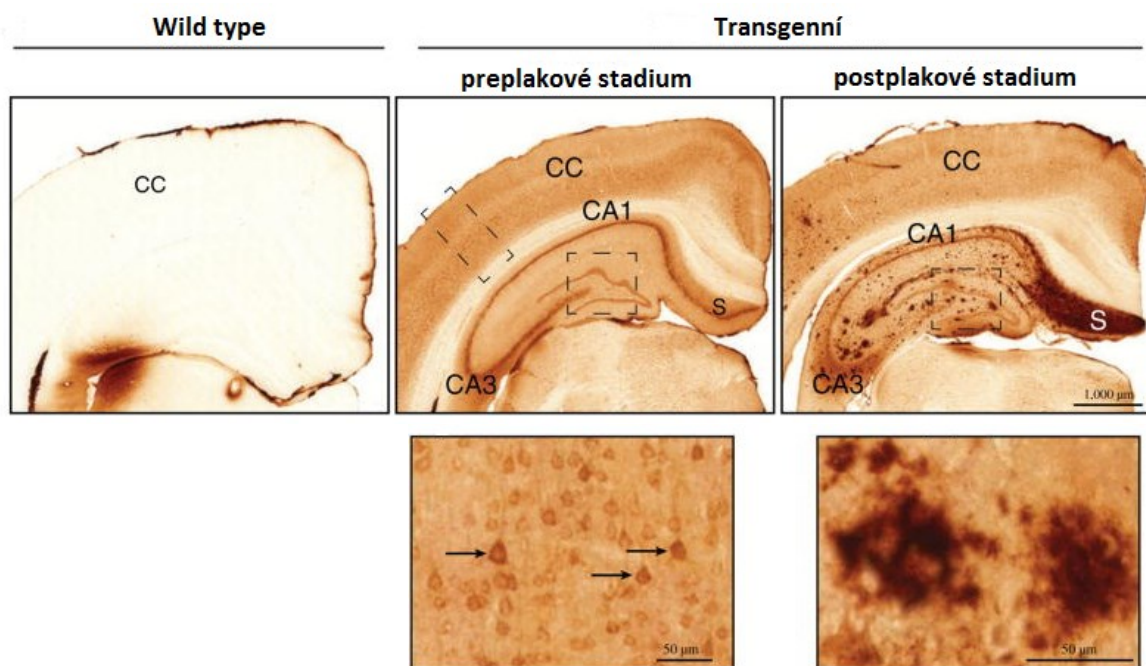
Linie transgenních potkanů McGill-R-Thy1-APP je animální model AD, u kterého dochází výrazně i k intracelulární akumulaci A $\beta$ . U těchto potkanů je vyvinuta exprese mutované formy genu pro lidský APP. Gen nese dvě klíčové mutace – dvojitou švédskou (Swe) a indiánskou (Ind) a je pod kontrolou neuronově specifického myšího promotoru Thy1 (Leon et al., 2010). Tyto mutace u animálního modelu jsou obdobné jako u pacientů s familiární formou AD (Zimmer et al., 2014).



**Obr. 6: DNA konstrukt transgenní linie McGill-R-Thy1-APP.** Expese lidského APP (hAPP) nesoucího dvojitou švédskou (Swe) a indiánskou (Ind) mutaci. Thy1 - neuronově specifický myší promotor. (Převzato z Wilson et al., 2017, upraveno.)

Potkaní model McGill-R-Thy1-APP je jedním z nejlepších animálních genetických modelů AD. Je schopný reflexe rozsáhlé patologie AD pomocí jednoho transgenu. Model spolehlivě odráží patologii ukládání A $\beta$  – změny pozorované na těchto transgenních potkanech jsou podobné rané fázi ukládání A $\beta$  pozorovaného u pacientů s AD. K tvorbě neurofibrilárních klubek a rozsáhlému úbytku neuronů zde nedochází, což je ale u animálních modelů běžné (Leon et al., 2010; Galeano et al., 2014). Neurony mozku těchto transgenních potkanů vykazují zvýšenou intracelulární a poté i extracelulární akumulaci A $\beta$  (Leon et al., 2010). Rozsáhlé shlukování je patrné v různých oblastech kůry a v hipokampu – exprese je cílená v oblastech relevantních pro AD a nedochází k ní v cerebellu ani periferní tkáni (Do Carmo and Cuellar, 2013). Intracelulární patologie A $\beta$  je dobře pozorovatelná již u 3měsíčních potkanů; ve věku 6 měsíců pak dochází k progresivní extracelulární akumulaci A $\beta$  a lze detekovat denzní amyloidní plaky – obr.7 (Wilson et al., 2017).

Následkem shlukování A $\beta$  dochází k aktivaci gliových buněk – mikroglíí a astrocytů, které obklopují dystrofované neurální axony a spouští zánětlivé procesy (Do Carmo and Cuellar, 2013). Ke vzniku zánětu však může docházet ještě před tvorbou amyloidních plaků. Na potkaním McGill-R-Thy1-APP modelu to bylo dokázáno pomocí markerů zánětu v neuronech a gliových buňkách. V mozkové kůře a hipokampu došlo k up-regulaci markerů jako je TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  a další, a to hlavně v neuronech postižených A $\beta$  (Hanzel et al., 2014). Prozánětlivé mechanismy taktéž přispívají k postižení kognitivních funkcí (Do Carmo and Cuellar, 2013).



**Obr. 7: Intracelulární a extracelulární akumulace A $\beta$  u homozygotů McGill-R-Thy1-APP.** Intracelulární depozice A $\beta$  v neuronech kortexu a hipokampu (ve věku 6 měsíců – preplakové stádium; uprostřed) následovaná tvorbou extracelulárních amyloidních plaků (15 měsíců – postplakové stádium; vpravo). Imunoenzymatická reakce: protilátka anti-A $\beta$ (1-12), 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) jako chromogen -> hnědé zbarvení. Vlevo – kontrola. CC - cerebrální kortex; oblasti hipokampu: CA1, CA3, S – subiculum. (Převzato z Wilson et al., 2017, upraveno.)

## 6.2 Změna kognitivních funkcí

V testech Morrisova vodního bludiště byla u potkanů McGill-R-Thy1-APP patrná změna kognitivních funkcí již ve věku 3 měsíců – tedy ještě před tím, než jsou v CNS přítomné amyloidní plaky. Změny se projevily v poruchách učení – transgenní potkani měli v bludišti signifikantně rozdílné naměřené časy latence než kontrola (Leon et al., 2010). Měřen byl i čas strávený v cílovém kvadrantu bazénku, kde byla umístěna plošinka. U kontrolních potkanů byly tyto časy signifikantně vyšší než u zbylých kvadrantů. Naopak transgenní potkani strávili v každém z kvadrantů přibližně stejnou dobu (Galeano et al., 2014).

Postižení prostorové kognice se stává výraznějším až u starších potkanů okolo 13 měsíců s postupující akumulací A $\beta$ , kde behaviorální výkon těchto transgenních živočichů koreluje s naměřenou hladinou rozpustného A $\beta$  (trimerů) v kortexu (Leon et al., 2010).

V longitudinální studii McGill-R-Thy1-APP potkanů se zkoumal vliv A $\beta$  na dlouhodobou potenciaci (LTP) neuronů, tedy základní mechanismus učení a paměti. Výsledky dokazují, že endogenně generovaný lidský A $\beta$  narušuje synaptickou plasticitu poškozením funkce NMDA receptorů. Dochází zde k inhibici LTP. Schopnost LTP, závislá na NMDA receptoru, se standardní frekvencí stimulu u potkanů vymizela ve věku 3,5 měsíců. Její deficit přetrvával minimálně

do doby, než se začaly objevovat amyloidní plaky. Sníženou odpověď na synaptický stimul bylo možno překonat silnější stimulací. Narušení schopnosti LTP potenciálně umožňuje terapeutické posouzení preklinického stadia AD (Qi et al., 2014).

V nejnovější behaviorální studii byly u potkanů McGill-R-Thy1-APP ve věku 4–7 měsíců zjištěny problémy s rovnováhou a koordinací (chůze po kladině), vážné postižení prostorové kognice (aktivní a pasivní vyhýbání se místu na aréně) a změna sociálního chování a emocionality. Patrné bylo také narušení cirkadiánní rytmicity ve věku 9–10 měsíců (Petrasek et al, under review).

### 6.3 Mitochondriální dysfunkce

Změny v mitochondriích u McGill-R-Thy1-APP potkanů ještě nebyly detailně studovány. Bylo však zjištěno, že v jejich neuronech dochází k narušení mitochondriálního metabolismu (Nilsen et al., 2014a). Zřetelné bioenergetické dysfunkce byly pozorovány na izolovaných hipokampálních mitochondriích potkanů již ve věku 6 měsíců. U komplexu I dýchacího řetězce byl zjištěn deficit enzymatické funkce a s tím spojená snížená tvorba ATP a zvýšená produkce ROS. Tyto defekty u potkanů fenotypově korelují s vyšším stupněm úzkosti a narušením prostorové paměti (Adami et al., 2015).

S rostoucím věkem transgenních potkanů byly také vysledovány změny hladiny některých metabolitů ve frontálním kortexu a dorzálním hipokampu. Změny metabolismu, které jsou pozorovány v brzkém stadiu AD, se s postupujícím věkem objevují do určité míry i u zdravých potkaních jedinců. Při analýzách potkaních mozků však byly patrné rozdíly linie McGill-R-Thy1-APP oproti kontrole, a to již ve věku 3 měsíců. Kolísání hladiny se týká hlavně glutamátu, myo-inositolu a cholinu a jde o pokles či zvýšení hladin v závislosti na věku (Nilsen et al., 2012). Některé studie také ukazují rozdílnost v závislosti na pohlaví, ale pouze v rámci transgenní linie McGill-R-Thy1-APP, zatímco u kontrol je koncentrace metabolitů genderově vyrovnaná (Nilsen et al., 2014b).



**Obr. 8: Chronologický přehled zjištěných změn u potkanů McGill-R-Thy1-APP.** (Leon et al., 2010; Adami et al., 2015; Wilson et al., 2017; Petrasek et al., under review)

# EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

## 7 CÍLE PRÁCE

- 1) Otestovat, zda změny v expresi 17 $\beta$ HSD10 v mitochondriích izolovaných z mozku potkana McGill-R-Thy1-APP odpovídají změnám pozorovaným v mozku lidí s AD
- 2) Otestovat, zda jsou interakce 17 $\beta$ HSD10 s CypD v mitochondriích izolovaných z mozku potkana McGill-R-Thy1-APP ovlivněny akumulací A $\beta$
- 3) Porovnat změny v interakcích mezi CypD a 17 $\beta$ HSD10 u AD se změnami vyvolanými roztroušenou sklerózou

## 8 METODY A MATERIÁL

### 8.1 Analyzovaný materiál

#### Potkani

Pokusy byly provedeny celkem na 20 samcích potkana, a to na 10 transgenních homozygotních McGill-R-Thy1-APP a na 10 odpovídajících kontrolách (Wistar). Všechna zvířata byla získána od firmy PsychoGenics (Rakousko). Nejdříve byla dovezena do Fyziologického ústavu AV ČR, kde byla behaviorálně testována. Ve věku 11 měsíců byla převezena do NUDZ v Klecanech, kde následně proběhly vlastní analýzy mozkové tkáně.

Jak ve Fyziologickém ústavu, tak v NUDZ byli potkani ustájeni v plastových akváriích v akreditovaném zvěřinci s konstantní vlhkostí (50 %), teplotou ( $22\pm 1^\circ\text{C}$ ) a s pravidelným 12h cyklem světlo/tma (rozsvícení v 6:00). V akváriích byli chováni maximálně po dvou a po převozu jim byla ponechána doba na aklimatizaci v délce 2 týdnů.

Potkani byli usmrceni stržením vazů a následně dekapitováni. Po vyjmutí mozku z lebky byly odstraněny čichové bulby a cerebellum a celá levá hemisféra byla použita k izolaci mitochondrií (hmotnosti hemisfér: 670 - 870 mg). Z mozků (obě hemisféry) dalších dvou 7měsíčních kontrolních samců Wistar byly izolovány mitochondrie, společná směs těchto mitochondrií byla rozpipetována a jednotlivé alikvóty byly použity jako interní standardy ve většině ELISA měření. Experimenty byly provedeny v souladu se zákonem na ochranu zvířat proti týrání a byly schváleny odbornou komisí pro práci s laboratorními zvířaty (3. LF UK).

#### Mozkomíšni mokr

Pokusy byly provedeny na 28 vzorcích mozkomíšního moku získaných od pacientů s AD (16 lidí) a věkově odpovídajících kontrol (12 lidí). Vzorky mozkomíšního moku byly získány během řešení projektu IGA MZČR (NR/9322-3, 2007-2009), schváleného etickou komisí. Formuláře informovaných souhlasů obsahovaly poznámku, že zbytky mozkomíšního moku mohou být využity i v dalším výzkumu AD.

Tab. 1: Základní charakteristiky lidí, jejichž vzorky mozkomíšního moku byly použity.

skupina	n	pohlaví (muž/žena)	věk (roky)
kontrola	12	7/5	$69,2 \pm 12,5$
AD	16	7/9	$71,9 \pm 12,9$
celkem	28	14/14	$p = 0,4295$

Věk je uveden jako aritmetický průměr  $\pm$  směrodatná odchylka, použit MWW test na porovnání věku.

## 8.2 Pomůcky a přístroje

homogenizátor Potter's Braun (Biotech International), homogenizátor Ultra Turrax (Ika)  
velkokapacitní centrifuga Avanti JXN – 30 (Beckman Coulter), rotor JA 20.1  
spektrofotometr Multiskan EX (Thermo Electron Corporation), spektrofotometr Specol 11 (Carl Zeiss Jena)  
třepačka ICA (MTS 2/4 digital)  
analytické váhy Sartorius  
pH metr typ 2700 (Eutech Instrument)  
vodní vývěva Brand  
mrazák Sanyo (-80°C) a mrazák Freezer NDF-438 (Sanyo; -40°C)  
redestilační přístroj GLF 2102 (Ascent Scientific)  
mikrotitrační destičky Maxisorp NUNC (Thermo Fisher Scientific)  
pipety Finnpiquette a Socorex, steepery Finnpiquette

## 8.3 Pufry a roztoky

Většina použitých hotových chemikálií byla získána z firmy Sigma.

mitochondriální izolační pufr:

0,25M sacharóza; 0,5mM K<sup>+</sup>-EDTA; 10mM TRIS; pH = 7,4

karbonátový pufr:

75mM NaHCO<sub>3</sub>; 25mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; pH = 9,5

fosfátový pufr (PBS – phosphate buffered saline):

0,1M NaCl; 2,8mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 7,2mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH = 7,2

blokovací roztok (BS – blocking solution):

0,15mM BSA v karbonátovém pufru

promývací roztok (WS – washing solution):

75% Tween 20 v PBS (275 µl do 400 ml PBS)

ředicí roztok (DS – diluting solution):

15µM BSA ve WS

## 8.4 Vlastní metody:

### 8.4.1 Izolace mitochondrií

Izolace mitochondrií byla provedena v souladu s literaturou (Rajapakse et al., 2001) a probíhala celkem ve třech dnech (první a druhý den bylo utraceno po 6 potkanech, poslední den zbylých 8 potkanů). Dva 7měsíční potkani, jejichž mitochondrie byly použity jako interní standardy, byli utraceni a mitochondrie následovně izolovány v jednom nezávislém experimentu.

Před vlastní izolací byl připraven mitochondriální izolační pufr. Následně byly připraveny roztoky Percollu (Sigma) v mitochondriálním izolačním pufru o koncentracích 12 %, 26 % a 40 % a následovně uskladněny v lednici. Levé hemisféry byly zhomogenizovány v homogenizátoru Potter Braun (systém teflon-sklo, podmínky 20 zdvihů, 600 otáček/min). Homogenizace mozkové tkáně proběhla v 7násobku 12% Percollu (např. pro 0,532 g mozkové tkáně použito  $7 \times 0,532 = 3,724$  ml Percollu). V předem vychlazených zkumavkách k rotoru JA 20.1 z centrifugy Beckman J2-HS došlo k navrstvení ledových roztoků (pro 1 vzorek homogenátu byly použity následující poměry: 3,5 ml 40% Percollu + 3,5 ml 26% Percollu + 3 ml homogenátu v 12% Percollu).

Vzorky byly opakovaně točeny na velkokapacitní centrifuze Beckman J2-HS, nejdříve při 28 700 g po dobu 5 min. Vrchní vrstva obsahující proteiny byla opatrně odsáta vodní vývěvou. Frakce obsahující mitochondrie (světle krémové zbarvení, mezi vrstvami 2 a 3) byla odebrána pipetou do nových zkumavek, do kterých byly dále přidány 4 ml mitochondriálního izolačního pufru a vše bylo zvortexováno. Dále byly vzorky centrifugovány při 15 100 g po dobu 10 min. Supernatant byl odsát vodní vývěvou a ke každému vzorku byl přidán 1 ml mitochondriálního izolačního pufru. Po zvortexování byly vzorky opět stočeny při 15 100 g po dobu 10 min. Vzniklý supernatant byl opatrně odsát (přibližně na 700  $\mu$ l) a zbylý objem mitochondriální frakce zamražen.

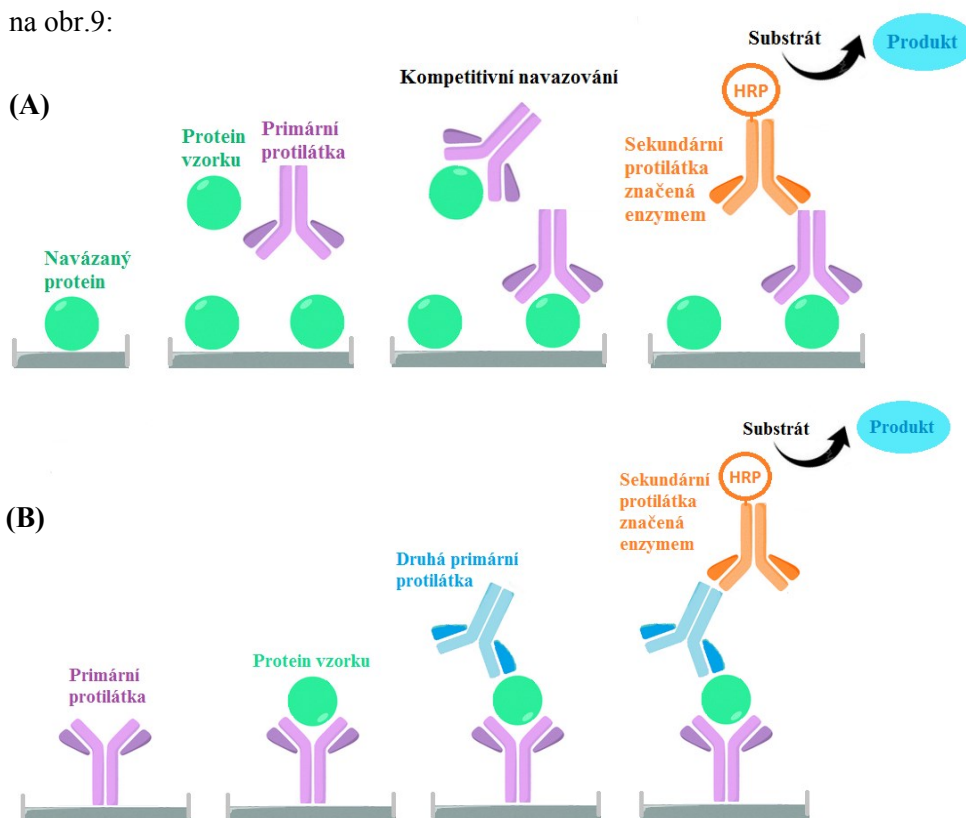
Po rozmražení byly všechny vzorky důkladně zvortexovány a zpracovány v homogenizátoru Ultra Turrax (10x, stupeň 3). Z každého vzorku bylo do skleněných zkumavek odebráno 20  $\mu$ l mitochondriální frakce, dále bylo přidáno 20  $\mu$ l redestilované vody a 20  $\mu$ l 15% detergentu lauryl maltoside (LM). Po zvortexování bylo 2x 10  $\mu$ l této směsi použito ke změření celkové hladiny mitochondriálních proteinů.

### 8.4.2 Stanovení celkové hladiny mitochondriálních proteinů metodou Bradford

Hladina celkových mitochondriálních proteinů byla stanovena metodou Bradford (Bradford, 1976) pomocí modrého barviva Coomassie Brilliant Blue v 0,1M NaOH s použitím bovinního sérového albuminu (BSA) jako standardu. Po inkubaci po dobu 10 min byly vzorky měřeny na spektrofotometru (Specol 11) při 590 nm. Všechny vzorky byly naředěny mitochondriálním izolačním pufrům na stejnou koncentraci proteinu (9 mg/ml). Poté byly jednotlivé vzorky rozpipetovány do mikrozkušavek po 250  $\mu$ l a zamrazeny při  $-40^{\circ}\text{C}$ .

### 8.4.3 ELISA – obecný princip

Imunologická metoda ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) byla použita k detekci antigenu, kterým byly různé proteiny/peptidy (17 $\beta$ HSD10, A $\beta$ , CypD, Parkin) nebo jejich komplexy obsažené ve vzorcích. K experimentům byla použita mikrotitrační destička F96 MaxiSorp (NUNC) obsahující 96 jamek. Všechna měření proběhla na vnitřních 60 jamkách. Základní typy metody ELISA jsou kompetitivní a sandwichová, jejich principy jsou znázorněny na obr.9:



**Obr. 9: Schéma metody kompetitivní a sandwichové ELISA.** (A) Kompetitivní ELISA: Principem je kompetice peptidu navázaného na destičce a peptidu ze vzorku o vazebné místo primární protilátky. Sekundární protilátka navázaná na primární pak vytvoří z bezbarvého substrátu barevný produkt.

(B) Sandwichová ELISA: Protein ze vzorku je vychytán primární protilátkou navázanou na destičku. Poté se na protein naváže druhá primární protilátka. (Tyto tři struktury vytvoří „sandwich“.) Na druhou primární protilátku se naváže sekundární protilátka, díky které je vytvořen barevný produkt.

**HRP** – křenová peroxidáza (horse radish peroxidase)

(Převzato z Goggins et al., 2015, upraveno.)

#### **8.4.4 Stanovení hladin 17 $\beta$ HSD10 metodou kvantitativní kompetitivní ELISA v mitochondriích izolovaných z mozku potkana**

Použit byl potkaní rekombinantní protein ERAB plné délky (CSB-YP010767RA, Flarebio), rozpipetovaný v jednotlivých alikvótách a skladovaný při  $-80^{\circ}\text{C}$ . 4  $\mu\text{l}$  rozmraženého roztoku (1,5 mg/ml) bylo přidáno do 7 ml karbonátového pufru (konečná koncentrace proteinu 0,8567  $\mu\text{g/ml}$ ), zvortexováno a použito jako potahovací roztok (CS). K aktivaci mikrodestičky bylo do všech jamek (kromě prvních dvou tvořících blank - B) napipetováno 100  $\mu\text{l}$  CS (85,67 ng proteinu na jamku). Destička se poté zakryla lepicí fólií a probíhala inkubace na třepačce při pokojové teplotě po dobu 4 h. Po inkubaci a vycáknutí byla destička 3x promyta PBS (250  $\mu\text{l}$  na jamku). Dále bylo pipetováno 250  $\mu\text{l}$  blokovacího roztoku (BS) na jamku k zablokování nespecifických míst. Při pokojové teplotě se destička nechala inkubovat na třepačce po dobu 1 h, poté byla přes noc ponechána v lednici.

Další den nejdříve probíhala příprava vzorků – vzorky mitochondriální frakce byly rozmrazeny a zvortexovány. Do skleněných zkumavek bylo odebráno 100  $\mu\text{l}$  z každého vzorku (9 mg mitochondriálních proteinů/ml), dále přidáno 20  $\mu\text{l}$  redestilované  $\text{H}_2\text{O}$  a 10  $\mu\text{l}$  15% detergentu LM (konečná koncentrace 6,923 mg/ml, vzorky označené MITO). Z lednice byla vytažena mikrotitrační destička obsahující BS, po vycáknutí byla 3x promyta WS (250  $\mu\text{l}$  na jamku). Do prvních 4 jamek bylo napipetováno 100  $\mu\text{l}$  10% DMSO (2x B, 2x  $\text{S}_0$ ). Pro tvorbu kalibrační křivky bylo na destičku v duplikátech nanášeno 6 standardů se zvyšující se koncentrací potkaního rekombinantního proteinu (koncentrace 138,3 až 4838,7 ng na jamku, rozpuštěno v 10% DMSO). Do zbylých jamek byly v duplikátech napipetovány jednotlivé vzorky MITO (50  $\mu\text{l}$ ), v posledních dvou jamkách byl interní standard (50  $\mu\text{l}$ ). Vše bylo doplněno 10% DMSO do stejného objemu 100  $\mu\text{l}$ . Následně bylo aplikováno 50  $\mu\text{l}$  primární protilátky (PP), použita byla králičí polyklonální anti-ERAB (CSB-PA002392, Flarebio), naředěná 1 : 4000 v ředicím roztoku (DS). Destička se poté zakryla lepicí fólií a nechala se třepat 4 h při pokojové teplotě.

Po vycáknutí byla destička 4x promyta promývacím roztokem (WS, 250  $\mu\text{l}$ ). Následovala aplikace sekundární protilátky (SP) – prasečí polyklonální anti-králičí IgG/HRP (DAKO). 100  $\mu\text{l}$  této SP naředěné 1 : 6000 v DS bylo napipetováno do každé jamky. Zakrytá destička se třepala 1 h. Po vycáknutí byla 4x promyta WS (250  $\mu\text{l}$ ). Jako substrát byl použit roztok 3,3',5,5'-tetramethylbenzidinu (TMB, Sigma). Pipetováno bylo 150  $\mu\text{l}$  substrátu do jamky. Poté se nechala destička třepat přibližně 15 min, po zmodránání byla reakce zastavena 50  $\mu\text{l}$  0,5M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  na jamku. Barva se změnila ve žlutou a destička se nechala 3 min třepat. Následovalo měření destičky na spektrofotometru Multiskan EX při 450 nm. Hladiny 17 $\beta$ HSD10 byly vztaženy k celkové hladině mitochondriálních proteinů a vyjádřeny v ng 17 $\beta$ HSD10/ $\mu\text{g}$  mit. proteinů).

Detekční limit byl stanoven na 20 ng proteinu na jamku, intra-assay variace se rovnaly 3,7 % a inter-assay variace 9,6 % (stanoveno pro 276,5 ng na jamku).

#### **8.4.5 Stanovení hladin 17 $\beta$ HSD10 metodou semikvantitativní sandwichová ELISA v mitochondriích izolovaných z mozku potkana**

Při sandwichové ELISA byla pro aktivaci destičky použita králičí polyklonální PP anti-ERAB (CSB-PA002392, Flarebio). CS obsahoval 10  $\mu$ l PP (1 mg/ml) a 4,9 ml karbonátového pufru (2,04  $\mu$ g PP/ml). Do jamek destičky bylo napipetováno po 100  $\mu$ l CS (0,204  $\mu$ g PP na jamku), první dvě jamky byly vynechány (B). Zakrytá destička se třepala při pokojové teplotě po dobu 4 h. Po vycáknutí byla destička 3x promyta PBS. K zablokování nespecifických míst bylo dále pipetováno 250  $\mu$ l BS na jamku. Při pokojové teplotě se destička třepala 1 h, poté byla do druhého dne ponechána v lednici.

Další den nejprve proběhla příprava vzorků mitochondriální frakce, vzorky byly vytaženy z mrazáku a zvortexovány. Do skleněných zkumavek bylo odebráno 140  $\mu$ l z každého vzorku (9 mg mitochondriálních proteinů/ml), přidáno 28  $\mu$ l redestilované H<sub>2</sub>O a 14  $\mu$ l 15% detergentu LM (poměr 100 : 20 : 10; konečná koncentrace mitochondriálních proteinů ve vzorku MITO byla 6,923 mg/ml). Po vycáknutí byla destička 3x promyta WS. První 4 jamky obsahovaly 100  $\mu$ l 10% DMSO (2x B, 2x S<sub>0</sub>). Všechny vzorky MITO i interního standardu byly pipetovány v duplikátech (celkem 80  $\mu$ l, doplněno do 100  $\mu$ l 10% DMSO).

Po 5h třepání a vycáknutí byla destička 3x promyta WS. V dalším kroku byla aplikována druhá PP – myší polyklonální anti-17 $\beta$ HSD10 (A01, Abnova), ředěná 1 : 3000 v DS. Pipetováno bylo 50  $\mu$ l na jamku. Po 2h třepání zakryté destičky při pokojové teplotě byla destička ponechána v lednici do dalšího dne.

Po vycáknutí byla destička 4x promyta WS. Aplikována byla SP anti-mouse IgG/HRP (Dako), naředěná v poměru 1 : 6000 v DS, pipetováno po 100  $\mu$ l na jamku. Po 1 h třepání a vycáknutí byla destička 4x promyta WS. Další postup byl totožný s předchozím experimentem (kvantitativní kompetitivní ELISA). Hladiny 17 $\beta$ HSD10 byly vztaženy k hladinám interního standardu a vyjádřeny v %.

#### **8.4.6 Stanovení hladin CypD metodou kvantitativní sandwichová ELISA v mitochondriích izolovaných z mozku potkana**

Pro tento experiment byl využit 96jamkový ELISA kit pro lidský CypD (Cat. No: MBS023478). Na přiloženém letáku byly pro toto stanovení uvedeny následující hodnoty: senzitivita 0,1 ng/ml, detekční rozsah 0,625 ng/ml – 20 ng/ml, intra-assay a inter-assay variace menší než 15 %. Hladiny CypD jsou vyjádřeny v ng/ml.

#### **8.4.7 Stanovení hladin konformačně změněného A $\beta$ (1-42) a celkového A $\beta$ metodou semikvantitativní sandwichová ELISA v mitochondriích izolovaných z mozku potkana**

Měření proběhlo na mikrotitračních destičkách předpřipravených firmou ELISA Development, s.r.o. Destičky byly pasivně pokryty kozím anti-myším IgG (Fitzgerald Industries International), 1  $\mu$ g na jamku. Poté byly destičky aktivovány myší monoklonální PP anti-Abeta 13-28 (Sigma), 100 ng na jamku (všechny jamky kromě prvních dvou) a převezeny do laboratoře NUDZ, kde jsme na takto upravených destičkách začali experiment.

Ve skleněných zkumavkách byly připraveny vzorky MITO (450  $\mu$ l vzorku rozmražené a zvortexované mitochondriální frakce + 90  $\mu$ l 15% LM). První jamky destiček obsahovaly pouze 100  $\mu$ l redestilované H<sub>2</sub>O, dále bylo pipetováno v duplikátech 100  $\mu$ l MITO na jamku a nakonec 100  $\mu$ l interního standardu. Zakryté destičky se nechaly třepat při pokojové teplotě 5 h, po vycáknutí byly 3x promyty WS. Následovala aplikace dvou různých druhých PP. Na první destičku byla použita králičí monoklonální protilátka anti-Abeta 1-42 (Abcam AB201060, konformačně specifická) naředěná 1 : 7000 v DS. Na druhou destičku byla použita králičí polyklonální protilátka anti-Abeta 1-14 (Abcam AB2539), naředěná 1 : 9000 v DS. Pipetováno bylo v obou případech 50  $\mu$ l na jamku, zakryté destičky byly třepány při pokojové teplotě do druhého dne.

Po vycáknutí byly destičky 4x promyty WS. Dále byla aplikována SP, prasečí anti-králičí IgG/HRP (DAKO), naředěná 1 : 6000 v DS, 100  $\mu$ l na jamku. Po 1h třepání při pokojové teplotě a vycáknutí byly destičky 4x promyty WS. Další postup byl stejný jako u metody kvantitativní kompetitivní ELISA. Hladiny A $\beta$ (1-42) i celkového A $\beta$  byly vztaženy k hodnotám interního standardu S a vyjádřeny v %.

#### **8.4.8 Stanovení hladin komplexů 17βHSD10 s celkovým Aβ metodou semikvantitativní sandwichová ELISA v mitochondriích izolovaných z mozku potkana**

Měření komplexů 17βHSD10 s celkovým Aβ proběhlo opět na destičce předpřipravené firmou ELISA Development, s.r.o. Všechny jamky destičky byly pasivně pokryty kozím anti-králičím IgG (Fitzgerald Industries International) v množství 1 μg na jamku. Dále byla destička aktivována první PP, králičí polyklonální anti-ERAB (CSB-PA002392, Flarebio) v množství 200 ng na jamku (všechny jamky kromě prvních dvou). Další experimenty proběhly v laboratoři NUDZ.

Nejdříve byly ve skleněných zkumavkách připraveny vzorky MITO (200 μl rozmraženého a zvortexovaného vzorku mitochondriální frakce + 40 μl 15% LM). Do prvních čtyř jamek destičky bylo napipetováno 100 μl redestilované H<sub>2</sub>O (2x B<sub>1</sub>, 2x B<sub>2</sub>), další jamky obsahovaly v duplikátech 100 μl MITO nebo 100 μl interního standardu. Po 5h třepání zakryté destičky při pokojové teplotě a vycáknutí byla destička 3x promyta WS. Dalším krokem byla aplikace druhé PP, myší anti-Aβ (Sigma, proti všem fragmentům), ředění 1 : 2666 v DS, pipetováno bylo 50 μl na jamku. Zakrytá destička se nechala třepat při pokojové teplotě po dobu 1 h, poté byla vložena do lednice, kde byla ponechána do druhého dne.

Po vycáknutí byla destička 4x promyta WS. Dále byla aplikována SP, králičí anti-myší IgG/HRP (DAKO). 1,5 μl této SP bylo naředěno 9 ml DS obsahujícím inertní králičí sérum (Fitzgerald Industries International), ředění pro SP tedy bylo v poměru 1 : 6000, finální ředění pro králičí sérum pak 1 : 1000. Pipetováno bylo 100 μl této SP a poté následovala 1h inkubace. Po vycáknutí byla destička 4x promyta WS. Další postup byl stejný jako u metody kvantitativní kompetitivní ELISA. Hladiny komplexů 17βHSD10 s celkovým Aβ byly vztaženy k hladinám interního standardu a vyjádřeny v %.

#### **8.4.9 Stanovení hladin komplexů 17βHSD10-CypD metodou semikvantitativní sandwichové ELISA v mitochondriích izolovaných z mozku potkana**

Pro aktivaci destičky byla použita králičí polyklonální PP anti-ERAB (CSB-PA002392, Flarebio). Na přípravu CS bylo použito 21 μl PP (1 mg/ml) ve 4,25 ml karbonátového pufru (2,46 μg PP/ml). První dvě jamky byly vynechány (B), do dalších bylo pipetováno 100 μl CS na jamku (0,246 μg PP na jamku). Zakrytá destička byla třepána 5h při pokojové teplotě. Po vycáknutí byla destička 3x promyta PBS. Následně bylo pipetováno 250 μl BS na jamku k zablokování nespecifických míst. Po 1 h třepání byla zakrytá destička přendána do lednice a tam ponechána do dalšího dne.

Následující den byly z mrazáku vytaženy vzorky mitochondriální frakce a důkladně zvortexovány. Příprava vzorků MITO ve skleněných zkumavkách proběhla následovně: 250 μl vzorku + 150 μl H<sub>2</sub>O + 25 μl 15% LM. Po vytažení z lednice a vycáknutí byla destička 3x promyta WS. Do prvních čtyř jamek bylo napipetováno 100 μl redestilované vody (2x B, 2x S<sub>0</sub>). Do zbylých jamek bylo napipetováno v duplikátech 100 μl MITO a interního standardu. Zakrytá destička byla inkubována 5 h při pokojové teplotě. Po vycáknutí byla 3x promyta WS. Jako druhá PP byla použita myší monoklonální protilátka anti-CypD (anti-PPID, M01, Abnova), ředění 1 : 3333 v DS; pipetováno bylo 50 μl na jamku. Zakrytá destička se nechala třepat 1 h a poté byla uložena do lednice, kde zůstala až do dalšího dne.

Po vycáknutí byla destička 4x promyta WS. Dále byla aplikována SP anti-mouse IgG/HRP (DAKO), ředění 1 : 6000 v DS, pipetováno bylo 100 μl na jamku a inkubováno 1 h. Po vycáknutí byla destička 4x promyta WS. Další postup byl stejný jako u metody kvantitativní kompetitivní ELISA. Hladiny komplexů 17βHSD10-CypD byly vztaženy k hladinám interního standardu a vyjádřeny v %.

#### **8.4.10 Stanovení hladin komplexu 17 $\beta$ HSD10-Parkin metodou semikvantitativní sandwichová ELISA v mozkomíšním moku pacientů s AD**

Mikrotitrační destička byla předpřipravená firmou ELISA Development, s.r.o. Nejdříve byla pasivně pokryta kozím anti-králičím IgG (Fitzgerald Industries International), 1  $\mu$ g na jamku. Poté byla destička aktivována králičí polyklonální PP anti-ERAB (CSB-PA002392, Flarebio), 200 ng na jamku (všechny jamky kromě prvních dvou).

Po rozmražení byly vzorky mozkomíšních moků zvortexovány. První dvě jamky obsahovaly 100  $\mu$ l redestilované H<sub>2</sub>O, další jamky potom po 100  $\mu$ l vzorků v duplikátech. Zakrytá destička se nechala třepat při pokojové teplotě 4 h, po vycáknutí byla 3x promyta WS. Dále byla aplikována druhá PP, myší polyklonální anti-Park2 (Abnova), naředěná 1 : 3000 v DS. Pipetováno bylo 50  $\mu$ l PP na jamku. Zakrytá destička se nechala třepat při pokojové teplotě 1 h, poté se přes noc ponechala v lednici.

Další den byla po vycáknutí destička 4x promyta WS. Poté byla aplikována SP, králičí anti-myší IgG/HRP (DAKO). 100  $\mu$ l SP, ředění 1 : 6000 v DS obsahujícím inertní králičí sérum (Fitzgerald Industries International), ředění pro králičí sérum 1 : 1000. Po 1 h třepání a následném vycáknutí byla destička 4x promyta WS. Další postup byl stejný jako u metody kvantitativní kompetitivní ELISA. Hladiny komplexů 17 $\beta$ HSD10-Parkin v mozkomíšním moku pacientů s AD byly vztaženy ke kontrolním vzorkům a vyjádřeny v %.

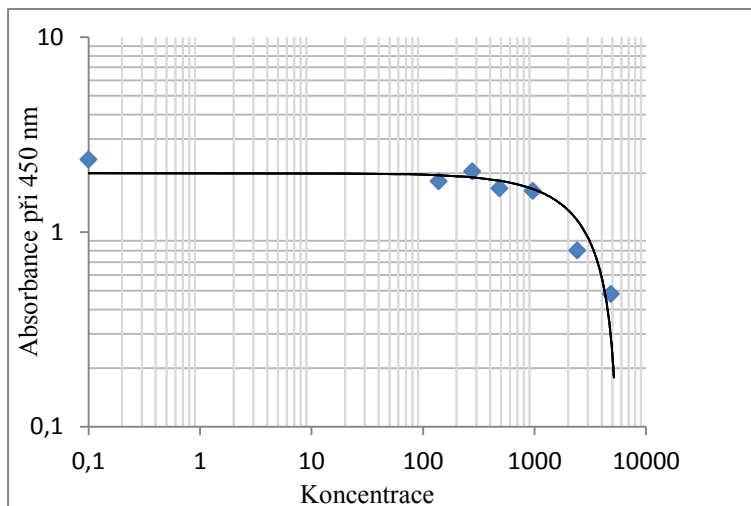
## 8.5 Analýza dat

Data byla vyhodnocena statistickým softwarem BMDP. Pro srovnání dvou skupin byl použit neparametrický Mann-Whitney-Wilcoxonův test (MWW).

Data jsou prezentována jako aritmetický průměr  $\pm$  směrodatná odchylka (SD).

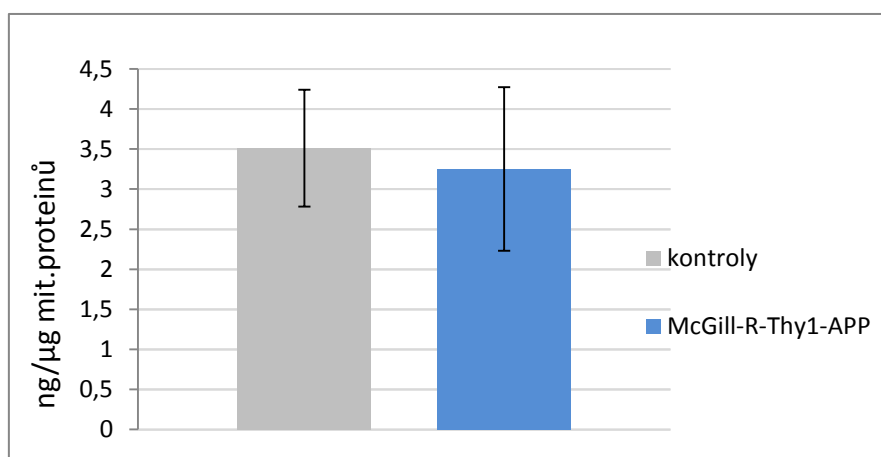
## 9 VÝSLEDKY

### 9.1 Hladiny 17 $\beta$ HSD10



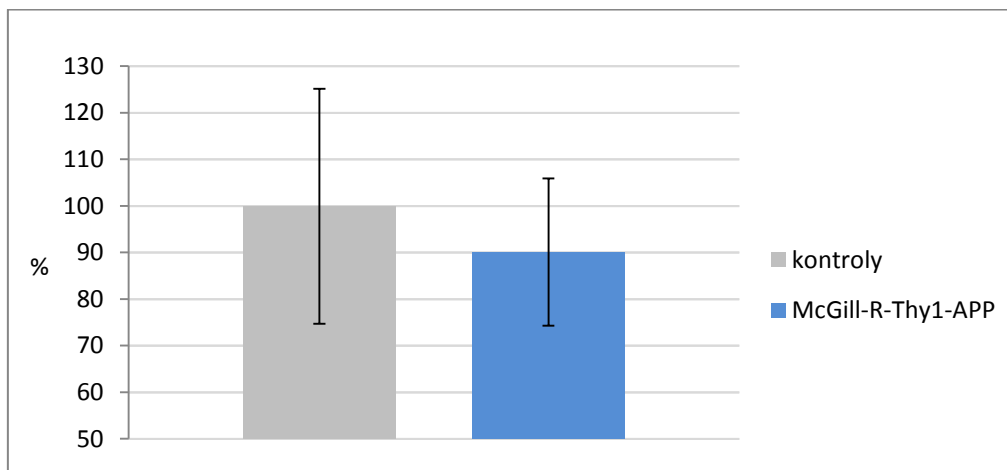
**Obr. 10: Kalibrační křivka pro stanovení hladin 17 $\beta$ HSD10 (kompetitivní ELISA).** Na ose  $x$  je logaritmické vyjádření koncentrací 17 $\beta$ HSD10 (138,3 až 4838,7 ng na jamku), na ose  $y$  absorbance v logaritmickém měřítku.

Graf na obr. 11 znázorňuje výsledky měření hladin 17 $\beta$ HSD10 metodou kvantitativní kompetitivní ELISA. U transgenických potkanů byl pozorován pokles na 92,3 % při srovnání s kontrolami, rozdíly mezi skupinami však nebyly statisticky významné. Průměrná hodnota získaná u kontrolních zvířat (3,514 ng/ $\mu$ g mitochondriálních proteinů) odpovídala po přepočtení ( $M = 26\,923$  Da) přibližně 1,1 $\mu$ M koncentraci 17 $\beta$ HSD10 v původní mitochondriální frakci naředěné na 9 mg/ml celkových mitochondriálních proteinů.



**Obr. 11: Hladiny 17 $\beta$ HSD10.** Hladiny jsou vyjádřeny v ng/ $\mu$ g mitochondriálních proteinů. Data jsou prezentována jako aritmetický průměr  $\pm$  SD. Statistická významnost (MWW test) byla spočtena při srovnání s kontrolními potkany ( $p = 0,3252$ ). Použitý počet zvířat: 10x McGill-R-Thy1-APP, 10x kontrola.

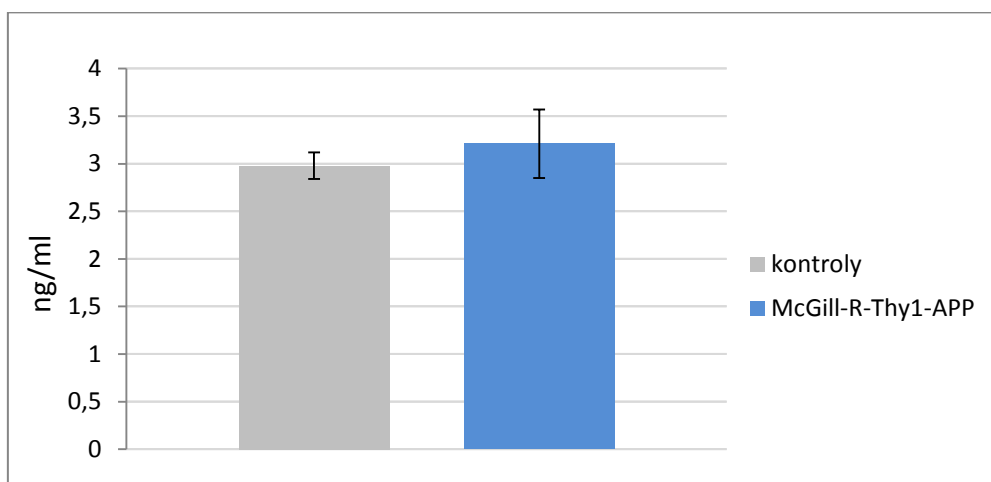
Graf na obr. 12 znázorňuje opět výsledky měření hladin 17 $\beta$ HSD10, tentokrát metodou semikvantitativní sandwichová ELISA. Výsledky jsou v souladu s předchozím měřením, je zde vidět mírný pokles hladin 17 $\beta$ HSD10 u potkanů McGill-R-Thy1-APP oproti kontrolám (na 90,1 %), rozdíly opět nejsou statisticky významné.



**Obr. 12: Hladiny 17 $\beta$ HSD10.** Hladiny jsou vztaženy k internímu standardu a vyjádřeny v %. Data jsou prezentována jako aritmetický průměr  $\pm$  SD. Statistická významnost (MWW test) byla spočtena při srovnání s kontrolními potkany ( $p = 0,3643$ ). Použitý počet zvířat: 10x McGill-R-Thy1-APP, 10x kontrola.

## 9.2 Hladiny CypD

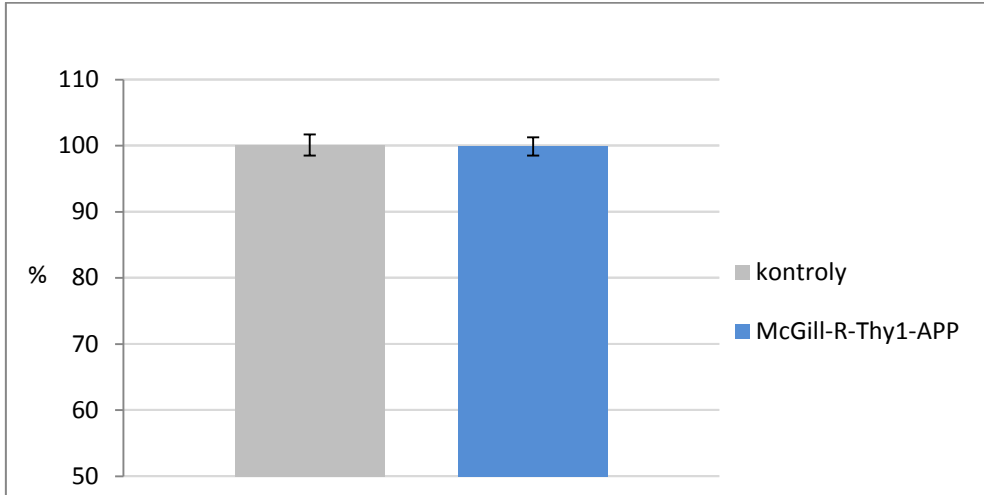
Na obr. 13 jsou vyneseny výsledky měření hladin CypD metodou kvantitativní sandwichová ELISA. Ačkoliv byl u transgenních potkanů pozorován mírný nárůst oproti kontrolám (zvýšení na 107,7 %), rozdíly nejsou statisticky významné. Průměrná hodnota získaná u kontrolních zvířat (2,98 ng/ml) odpovídala po přepočtení ( $M = 40\,764$  Da) přibližně 0,08nM koncentraci CypD v původní mitochondriální frakci naředěné na 9 mg/ml celkových mitochondriálních proteinů.



**Obr. 13: Hladiny CypD.** Hladiny jsou vyjádřeny v ng/ml. Data jsou prezentována jako aritmetický průměr  $\pm$  SD. Statistická významnost (MWW test) byla spočtena při srovnání s kontrolami ( $p = 0,1304$ ). Použitý počet zvířat: 10x McGill-R-Thy1-APP, 10x kontrola.

### 9.3 Hladiny A $\beta$ (1-42)

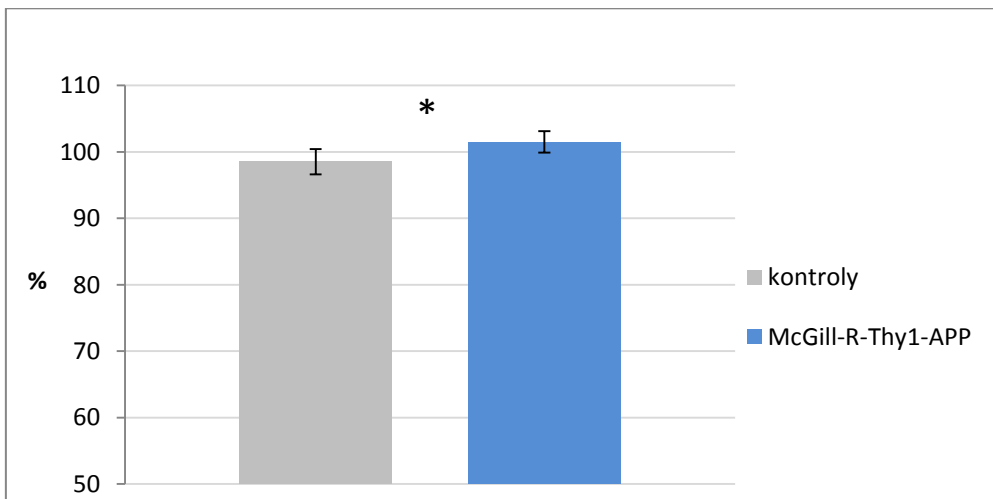
Graf na obr. 14 znázorňuje výsledky měření hladin konformačně změněného A $\beta$ (1-42) metodou semikvantitativní sandwichová ELISA. Hodnoty hladin byly prakticky totožné u obou skupin.



**Obr. 14: Hladiny A $\beta$ (1-42).** Hladiny jsou vztaženy k internímu standardu a vyjádřeny v %. Data jsou prezentována jako aritmetický průměr  $\pm$  SD. Statistická významnost (MWW test) byla spočtena při srovnání s kontrolami ( $p = 0,8094$ ). Použitý počet zvířat: 9x McGill-R-Thy1-APP, 8x kontrola.

### 9.4 Hladiny celkového A $\beta$

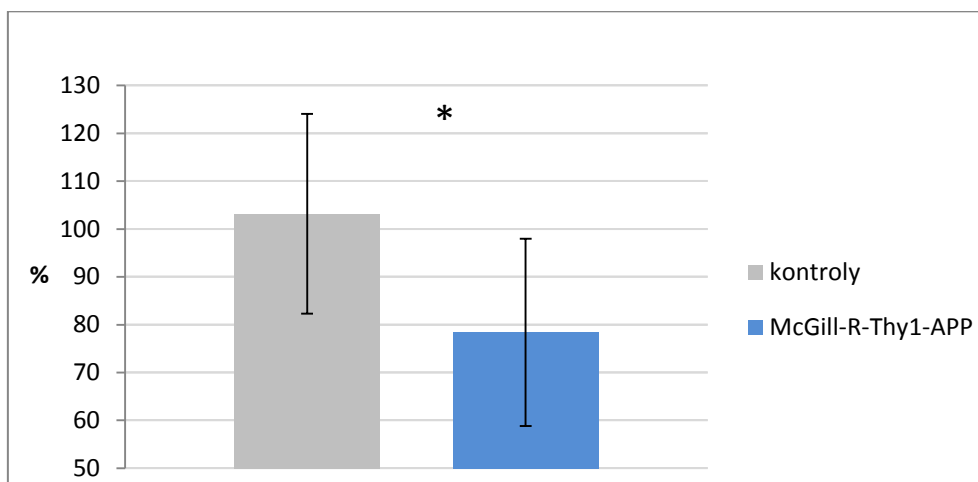
Graf na obr. 15 znázorňuje výsledky měření hladin celkového A $\beta$  metodou semikvantitativní sandwichová ELISA. Hladiny naměřené u transgenních zvířat byly signifikantně zvýšené oproti kontrolám (nárůst na 103,0 %).



**Obr. 15: Hladiny celkového A $\beta$ .** Hladiny jsou vztaženy k internímu standardu a vyjádřeny v %. Data jsou prezentována jako aritmetický průměr  $\pm$  SD. Statistická významnost (MWW test) byla spočtena při srovnání s kontrolami ( $p = 0,0107$ ). Použitý počet zvířat: 9x McGill-R-Thy1-APP, 8x kontrola.

## 9.5 Hladiny komplexů 17βHSD10-CypD

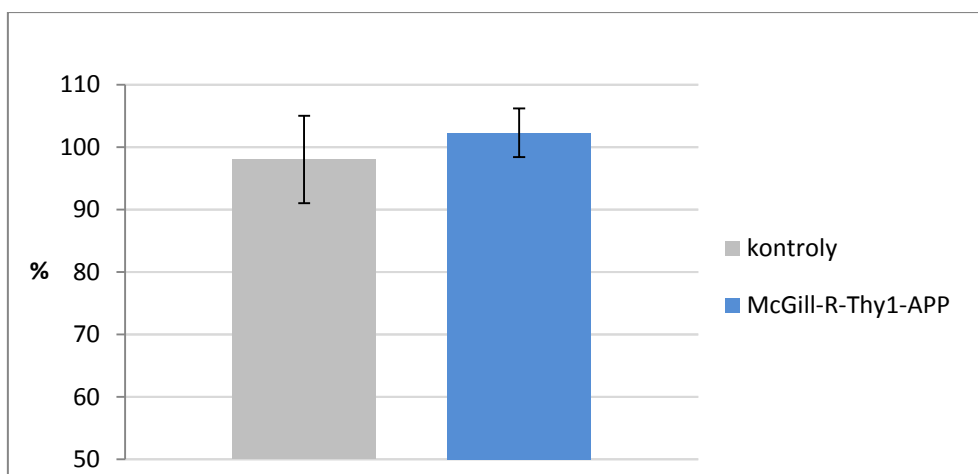
Graf na obr. 15 znázorňuje výsledky měření hladin komplexů 17βHSD10-CypD metodou semikvantitativní sandwichová ELISA. U transgenních zvířat byl naměřen výrazný a statisticky významný pokles v hladinách komplexů (na 76,0 %) oproti kontrolám.



**Obr. 16: Hladiny komplexů 17βHSD10-CypD.** Hladiny jsou vztaženy k internímu standardu a vyjádřeny v %. Data jsou prezentována jako aritmetický průměr ± SD. Statistická významnost (MWW test) byla spočtena při srovnání s kontrolami ( $p = 0,0274$ ). Použitý počet zvířat: 10x McGill-R-Thy1-APP, 9x kontrola.

## 9.6 Hladiny komplexů 17βHSD10 s celkovým Aβ

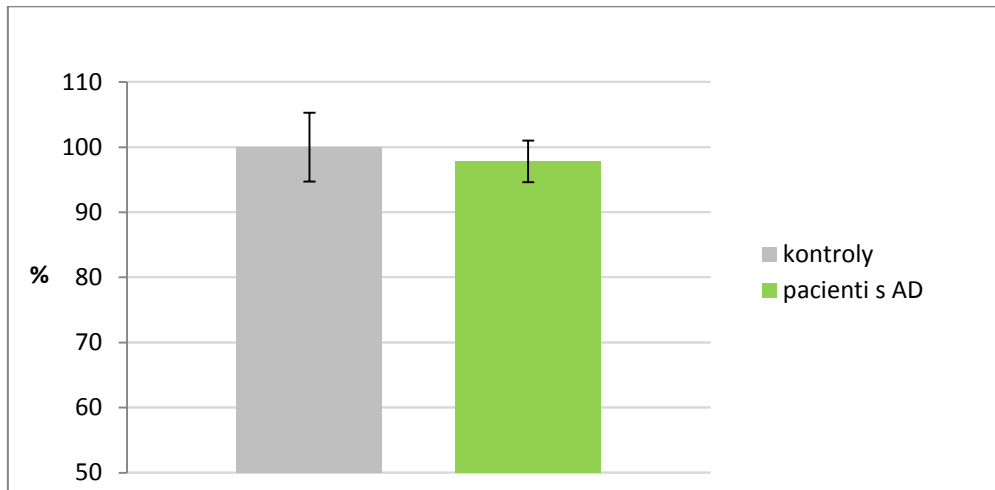
Graf na obr. 17 znázorňuje výsledky hladin komplexů 17βHSD10 s celkovým Aβ metodou semikvantitativní sandwichová ELISA. Ačkoliv byl pozorovaný trend ke zvýšení komplexů u transgenních zvířat oproti kontrolám (nárůst na 104,4 %), rozdíly mezi skupinami nebyly statisticky významné.



**Obr. 17: Hladiny komplexů 17βHSD10 s celkovým Aβ.** Hladiny jsou vztaženy k internímu standardu a vyjádřeny v %. Data jsou prezentována jako aritmetický průměr ± SD. Statistická významnost (MWW test) byla spočtena při srovnání s kontrolami ( $p = 0,1304$ ). Použitý počet zvířat: 10x McGill-R-Thy1-APP, 10x kontrola.

## 9.7 Hladiny komplexů 17βHSD10-Parkin

Graf na obr. 18 znázorňuje výsledky měření hladin komplexů 17βHSD10-Parkin metodou semikvantitativní sandwichová ELISA. Rozdíl hladin (pokles na 97,8 % u pacientů s AD oproti kontrolám) byl statisticky nevýznamný.



**Obr. 18: Hladiny komplexů 17βHSD10-Parkin.** Hladiny u pacientů s AD byly vztaženy ke kontrolám a vyjádřeny v %. Data jsou prezentována jako aritmetický průměr ± SD. Statistická významnost (MWW test) byla spočtena při srovnání s kontrolami ( $p = 0,2959$ ). Použitý počet vzorků: 16x pacient s AD, 12x kontrola.

## 10 DISKUZE

Cílem této práce bylo otestovat, zda změny v expresi 17 $\beta$ HSD10 v mitochondriích izolovaných z mozku potkana McGill-R-Thy1-APP odpovídají změnám pozorovaným v mozku lidí s AD a zda jsou interakce 17 $\beta$ HSD10 s CypD ovlivněny akumulací A $\beta$ . Dále jsme chtěli porovnat změny v interakcích mezi CypD a 17 $\beta$ HSD10 u AD se změnami vyvolanými roztroušenou sklerózou.

### 10.1 Hladiny 17 $\beta$ HSD10 v mitochondriích a jeho schopnost regulovat CypD

Dostupná literatura uvádí zvýšenou expresi mitochondriálního proteinu 17 $\beta$ HSD10 v mozku pacientů s AD i v mozku animálních modelů AD (Lustbader et al., 2004; Yang et al., 2014). Data lze podpořit i nalezenými zvýšenými koncentracemi 17 $\beta$ HSD10 v mozkomíšním moku lidí s AD (Kristofíková et al., 2009). Překvapivý nález nezměněných hladin 17 $\beta$ HSD10 v mitochondriích izolovaných z mozku transgenních potkanů McGill-R-Thy1-APP oproti kontrolám získaný metodou kvantitativní kompetitivní ELISA (obr. 11) a potvrzený metodou semikvantitativní sandwichová ELISA (obr. 12) lze interpretovat dvěma způsoby. První možností by mohlo být zpochybnění validity tohoto animálního modelu AD, druhou variantou je interpretace, že navzdory up-regulaci a následné overexpresi 17 $\beta$ HSD10 v mozku nedochází ke zvýšenému transportu proteinu do mitochondriální matrix.

Zpochybnění validity transgenního potkaního modelu McGill-R-Thy1-APP však nepovažujeme za správné. Potkani McGill-R-Thy1-APP jsou v současné době považováni za jeden z nejlepších animálních modelů AD, protože spolehlivě odrážejí patologii AD včetně intracelulární akumulace A $\beta$  v mozku. Behaviorální experimenty, včetně pokusů provedených naší skupinou, prokázaly na věku závislé poruchy učení a prostorové orientace, narušení motoriky, sociálního chování, emocionality a cirkadiálního systému podobně jako u lidí s AD (Leon et al., 2010; Galeano et al., 2014; Wilson et al., 2017; Petrusek et al., under review). U těchto zvířat starých 6 měsíců byly navíc potvrzeny i mitochondriální dysfunkce (Adami et al., 2015).

Nezměněné hladiny 17 $\beta$ HSD10 v mitochondriích izolovaných z mozku potkana McGill-R-Thy1-APP lze tedy interpretovat pravděpodobnou poruchou transportního mechanismu PINK1-Parkin-TOM/TIM a pravděpodobným hromaděním proteinu v cytoplasmě. Tento fakt lze doložit následovně.

1) Je známo, že akumulace A $\beta$  v mitochondriální membráně může blokovat transport proteinů kódovaných jádrem dovnitř mitochondrie (Reddy and Beal, 2008). Naše experimenty mitochondriální akumulaci celkového A $\beta$ , včetně jeho možného hromaděním v mitochondriální

membráně, přímo potvrzují (obr. 15). Nezměněné hladiny 17 $\beta$ HSD10 v mitochondriích lze podpořit i nálezem nulových změn v hladinách komplexů 17 $\beta$ HSD10 s celkovým A $\beta$  u transgenních zvířat oproti kontrolám (obr. 17). Je totiž velmi pravděpodobné, že by hladiny těchto komplexů byly zvýšené za podmínek zvýšení koncentrace obou látek, tj. 17 $\beta$ HSD10 i A $\beta$  (Kristofikova et al., 2013).

2) Údaje z literatury naznačují, že interakce Parkinu a 17 $\beta$ HSD10 v cytoplasmě regulují hladiny 17 $\beta$ HSD10 vstupujícího do mitochondriální matrix a že overexprese Parkinu vede ke zvýšení hladin 17 $\beta$ HSD10 v matrix (Bertolin et al., 2015). Lze tedy předpokládat, že zvýšený transport 17 $\beta$ HSD10 pomocí PINK1-Parkin-TOM/TIM mechanismu by se měl v případě up-regulace a overexprese 17 $\beta$ HSD10 projevit zvýšenými hladinami komplexů 17 $\beta$ HSD10-Parkin v cytoplasmě a následovně v mozkomíšním moku lidí s AD. Naše pokusy však žádnou změnu v mozkomíšním moku lidí s AD oproti kontrolám neprokázaly (obr. 18).

Signifikantní snížení hladin komplexů 17 $\beta$ HSD10-CypD u transgenních potkanů při srovnání s kontrolami (obr. 16), navzdory nezměněným hladinám 17 $\beta$ HSD10 (obr. 11 a 12) a CypD (obr. 13) naznačuje, že i 17 $\beta$ HSD10 transportovaný do matrix pomocí PINK1-Parkin-TOM/TIM systému nemusí být plně funkční a může pouze omezeně regulovat CypD. Nález je v souladu s hypotézou, že interakce 17 $\beta$ HSD10 s CypD v mitochondriální matrix jsou omezené v přítomnosti A $\beta$ , protože A $\beta$  se váže na oba tyto proteiny (Muirhead et al., 2010). Ačkoliv jsme nepozorovali signifikantní zvýšení hladin komplexů 17 $\beta$ HSD10 s A $\beta$  v mozku transgenních zvířat (obr. 17), výsledek může částečně souviset s mírným poklesem hladin 17 $\beta$ HSD10 (obr. 11 a 12). Lze ale předpokládat, že hlavní příčinou by mohla být interakce CypD s A $\beta$ . Hladiny komplexů CypD-A $\beta$  by mohly být vhodným cílem pro další experimenty. Pozorované snížení hladin komplexů 17 $\beta$ HSD10-CypD (obr. 16) také podporuje hypotézu, že nedostatečně regulovaný CypD translokuje k vnitřní mitochondriální membráně a způsobuje otevírání MTPT vedoucí k buněčné smrti (Yan and Stern, 2005).

## 10.2 Porovnání AD a roztroušené sklerózy

K up-regulaci a následovné overexpresi 17 $\beta$ HSD10 v mozku dochází při neurodegenerativní AD a pravděpodobně i při neurodegenerativní roztroušené skleróze (RS). Zatímco u AD byla overexprese potvrzena přímo v autoptické mozkové tkáni (Yan and Stern, 2005) a nepřímo i v mozkomíšním moku (Kristofikova et al., 2009), u RS jsou zatím dostupná data pouze z mozkomíšního moku (Kristofikova et al., 2009). Tato up-regulace vedoucí k overexpresi je považována za obecný neuroprotektivní mechanismus, který se ale u AD pravděpodobně následkem akumulovaného A $\beta$  stává mechanismem patologickým (Lustbader et al., 2004; Yan et al., 2007). Srovnání výsledků této diplomové práce s dalšími výsledky laboratoře NUDZ

provedenými na mozkomíšním moku lidí s RS (Kristofikova et al., under review) naznačuje výrazné rozdíly mezi oběma nemocemi, navzdory podobným změnám v koncentraci 17βHSD10 v mozkomíšním moku (Kristofikova et al., 2009).

U AD (a validních animálních modelů AD) se up-regulovaný 17βHSD10 pravděpodobně nedostává Pink1-Parkin-TOM/TIM mechanismem přes obě mitochondriální membrány do matrix. U AD toto potvrzují nezměněné hladiny 17βHSD10 v mitochondriích animálního modelu AD (obr. 11 a 12) a nezměněné hladiny komplexů 17βHSD10-Parkin v mozkomíšním moku lidí s AD (obr. 18). Dále se zdá, že 17βHSD10 v matrix není schopný u AD plně regulovat CypD, neboť hladiny komplexů 17βHSD10-CypD jsou v mitochondriích animálního modelu AD sníženy (obr. 16). V případě RS však experimentální data naznačují, že se up-regulovaný 17βHSD10 do matrix dostává a že by mohl být i plně funkční - viz zvýšené hladiny komplexů 17βHSD10-Parkin a nezměněné hladiny komplexů 17βHSD10-CypD v mozkomíšním moku lidí s RS (Kristofikova et al., under review). Naměřené hladiny proteinů/peptidů a jejich komplexů u RS a AD jsou pro srovnání vyneseny v Tab. 2.

**Tab. 2: Porovnání hladin proteinů/peptidů a jejich komplexů u RS a AD.**

\*↑ signifikantní zvýšení; \*↓ signifikantní snížení; n.s. – nesignifikantní změna  
CSF – mozkomíšní mok, Mit – mitochondrie

	RS	AD	
17βHSD10 v mozku		↑	
	CSF	CSF	Mit
17βHSD10	*↑	*↑	n.s.
CypD	n.s.		n.s.
Aβ(1-42)	n.s.	*↓	n.s.
celkový Aβ	n.s. / *↓?	n.s.	*↑
17βHSD10-CypD	n.s.		*↓
17βHSD10 s celkovým Aβ	n.s.	*↑	n.s.
17βHSD10-Parkin	*↑	n.s.	

Tabulka obsahuje výsledky této diplomové práce i další data získaná z literatury. U lidí s AD byla popsána zvýšená exprese 17βHSD10 v mozku (Yan and Stern, 2005) a zvýšená koncentrace v mozkomíšním moku (Kristofikova et al., 2009). Výsledky získané v mozkomíšním moku lidí s RS jsou popsány ve studii: (Kristofikova et al., 2009). V případě hladin Aβ(1-42) v mozkomíšním moku lidí s RS jsou výsledky nejasné, pozorovány buď nebyly žádné změny (Kristofikova et al., under review), některé studie však potvrzují změny podobající se změnám u AD, tj. významné snížení hladin Aβ(1-42) (Augutis et al., 2013; Pietroboni et al., 2018).

## 11 ZÁVĚR

Podle našich výsledků získaných na mozcích transgenních potkanů McGill-R-Thy1-APP zde nedochází ke zvýšení hladin proteinu 17 $\beta$ HSD10 v mitochondriích, navzdory jeho overexpresi v mozku při AD uváděné v literatuře. Tento animální model AD se osvědčil v mnoha studiích, a proto ho považujeme za validní. Zvýšená exprese 17 $\beta$ HSD10 tedy pravděpodobně nevede ke zvýšenému transportu do mitochondrií, ale spíše ke hromadění v cytoplasmě. Důvodem může být porucha v transportním systému PINK1-Parkin-TOM/TIM i akumulace A $\beta$  v mitochondriální membráně.

Dále jsme zjistili signifikantní snížení v hladinách komplexů 17 $\beta$ HSD10-CypD, což naznačuje možné snížení interakce obou proteinů. Tato interakce je důležitá pro regulaci CypD a její oslabení vede k dislokaci CypD a otevírání MPTP spouštějícího apoptózu. V narušení této vazby pravděpodobně hraje roli A $\beta$ , který se k oběma proteinům váže. Interakce 17 $\beta$ HSD10 s A $\beta$  jsme však zvýšené nepozorovali, je tedy možné, že výraznější interakce by pravděpodobně mohly být pozorovány u CypD s A $\beta$ . Komplexy CypD-A $\beta$  by proto byly vhodným cílem pro další experimenty.

Zdá se, že mechanismy vedoucí k dysfunkčním mitochondriím u AD a RS jsou odlišné. Ačkoliv u obou neurodegenerativních chorob byly nalezeny zvýšené hladiny 17 $\beta$ HSD10 v mozkomíšním moku, na rozdíl od AD se pravděpodobně v případě RS up-regulovaný 17 $\beta$ HSD10 do mitochondrií dostává a je schopný regulovat CypD.

## 12 POUŽITÁ LITERATURA

- Adami, P.V.M., Quijano, C., Magnani, N., Galeano, P., Evelson, P., Cassina, A., Do Carmo, S., Leal, M.C., Castaño, E.M., Cuello, A.C., et al. (2015). Synaptosomal bioenergetic defects are associated with cognitive impairment in a transgenic rat model of early Alzheimer's disease. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.*
- Alikhani, N., Ankarcona, M., and Glaser, E. (2009). Mitochondria and Alzheimer's disease: amyloid-beta peptide uptake and degradation by the presequence protease, hPreP. *J. Bioenerg. Biomembr.* *41*, 447–451.
- Augutis, K., Axelsson, M., Portelius, E., Brinkmalm, G., Andreasson, U., Gustavsson, M.K., Malmeström, C., Lycke, J., Blennow, K., Zetterberg, H., et al. (2013). Cerebrospinal fluid biomarkers of  $\beta$ -amyloid metabolism in multiple sclerosis. *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.* *19*, 543–552.
- Bayer, T.A., and Wirths, O. (2010). Intracellular Accumulation of Amyloid-Beta – A Predictor for Synaptic Dysfunction and Neuron Loss in Alzheimer's Disease. *Front. Aging Neurosci.* *2*.
- Bekris, L.M., Yu, C.-E., Bird, T.D., and Tsuang, D.W. (2010). Genetics of Alzheimer Disease. *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.* *23*, 213–227.
- Benedikz, E., Kloskowska, E., and Winblad, B. (2009). The rat as an animal model of Alzheimer's disease. *J. Cell. Mol. Med.* *13*, 1034–1042.
- Benek, O., Aitken, L., Hroch, L., Kuca, K., Gunn-Moore, F., and Musilek, K. (2015). A Direct Interaction Between Mitochondrial Proteins and Amyloid- $\beta$  Peptide and its Significance for the Progression and Treatment of Alzheimer's Disease. *Curr. Med. Chem.* *22*, 1056–1085.
- Benilova, I., Karran, E., and De Strooper, B. (2012). The toxic A $\beta$  oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. *Nat. Neurosci.* *15*, 349–357.
- Bertolin, G., Jacoupy, M., Traver, S., Ferrando-Miguel, R., Saint Georges, T., Grenier, K., Ardila-Osorio, H., Muriel, M.-P., Takahashi, H., Lees, A.J., et al. (2015). Parkin maintains mitochondrial levels of the protective Parkinson's disease-related enzyme 17- $\beta$  hydroxysteroid dehydrogenase type 10. *Cell Death Differ.* *22*, 1563–1576.
- Bird, T.D. (2008). Genetic aspects of Alzheimer disease. *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* *10*, 231–239.
- Blennow, K., de Leon, M.J., and Zetterberg, H. (2006). Alzheimer's disease. *The Lancet* *368*, 387–403.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* *72*, 248–254.
- Brion, J.-P. (2006). Immunological demonstration of tau protein in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* *9*, 177–185.
- Butterfield, D.A., and Poon, H.F. (2005). The senescence-accelerated prone mouse (SAMP8): a model of age-related cognitive decline with relevance to alterations of the gene expression and protein abnormalities in Alzheimer's disease. *Exp. Gerontol.* *40*, 774–783.

- Chen, H., and Chan, D.C. (2009). Mitochondrial dynamics—fusion, fission, movement, and mitophagy—in neurodegenerative diseases. *Hum. Mol. Genet.* *18*, R169–R176.
- Chen, J.X., and Yan, S.S. (2010). Role of Mitochondrial Amyloid- $\beta$  in Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis.* *20*, 569–578.
- Chiaravalloti, A., Barbagallo, G., Ricci, M., Martorana, A., Ursini, F., Sannino, P., Karalis, G., and Schillaci, O. (2017). Brain metabolic correlates of CSF Tau protein in a large cohort of Alzheimer's disease patients: a CSF and FDG PET study. *Brain Res.*
- Dawkins, E., and Small, D.H. (2014). Insights into the physiological function of the  $\beta$ -amyloid precursor protein: beyond Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* *129*, 756–769.
- Deutschmann, A.J., Amberger, A., Zavadil, C., Steinbeisser, H., Mayr, J.A., Feichtinger, R.G., Oerum, S., Yue, W.W., and Zschocke, J. (2014). Mutation or knock-down of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 10 cause loss of MRPP1 and impaired processing of mitochondrial heavy strand transcripts. *Hum. Mol. Genet.* *23*, 3618–3628.
- Do Carmo, S., and Cuello, A.C. (2013). Modeling Alzheimer's disease in transgenic rats. *Mol. Neurodegener.* *8*, 37.
- Duyckaerts, C., Delatour, B., and Potier, M.-C. (2009). Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *118*, 5–36.
- Farinde, A. (2012). EXPLORING ALZHEIMER'S DISEASE (ALZHEIMER'S TYPE DEMENTIA). *Pharma Innov. J.* *1*, 33–46.
- Frey, H.J., Mattila, K.M., Korolainen, M.A., and Pirttilä, T. (2005). Problems associated with biological markers of Alzheimer's disease. *Neurochem. Res.* *30*, 1501–1510.
- Galeano, P., Martino Adami, P.V., Do Carmo, S., Blanco, E., Rotondaro, C., Capani, F., Castaño, E.M., Cuello, A.C., and Morelli, L. (2014). Longitudinal analysis of the behavioral phenotype in a novel transgenic rat model of early stages of Alzheimer's disease. *Front. Behav. Neurosci.* *8*.
- Goedert, M. (2009). Oskar Fischer and the study of dementia. *Brain* *132*, 1102–1111.
- Goggins, S., Naz, C., J. Marsh, B., and G. Frost, C. (2015). Ratiometric electrochemical detection of alkaline phosphatase. *Chem. Commun.* *51*, 561–564.
- Götz, J., Deters, N., Doldissen, A., Bokhari, L., Ke, Y., Wiesner, A., Schonrock, N., and Ittner, L.M. (2007). A Decade of Tau Transgenic Animal Models and Beyond. *Brain Pathol.* *17*, 91–103.
- Hempel, H., and Lista, S. (2012). Alzheimer disease: from inherited to sporadic AD—crossing the biomarker bridge. *Nat. Rev. Neurol.* *8*, 598–600.
- Hansson Petersen, C.A., Alikhani, N., Behbahani, H., Wiehager, B., Pavlov, P.F., Alafuzoff, I., Leinonen, V., Ito, A., Winblad, B., Glaser, E., et al. (2008). The amyloid beta-peptide is imported into mitochondria via the TOM import machinery and localized to mitochondrial cristae. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 13145–13150.
- Hanzel, C.E., Pichet-Binette, A., Pimentel, L.S.B., Iulita, M.F., Allard, S., Ducatenzeiler, A., Do Carmo, S., and Cuello, A.C. (2014). Neuronal driven pre-plaque inflammation in a transgenic rat model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* *35*, 2249–2262.

- He, X.-Y., Wegiel, J., and Yang, S.-Y. (2005). Intracellular oxidation of allopregnanolone by human brain type 10 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Brain Res.* *1040*, 29–35.
- Heggland, I., Storkaas, I.S., Soligard, H.T., Kibro-Flatmoen, A., and Witter, M.P. (2015). Stereological estimation of neuron number and plaque load in the hippocampal region of a transgenic rat model of Alzheimer's disease. *Eur. J. Neurosci.* *41*, 1245–1262.
- Hernandez-Zimbron, L.F., Luna-Muñoz, J., Mena, R., Vazquez-Ramirez, R., Kubli-Garfias, C., Cribbs, D.H., Manoutcharian, K., and Gevorkian, G. (2012). Amyloid- $\beta$  Peptide Binds to Cytochrome C Oxidase Subunit 1. *PLoS ONE* *7*.
- Hirai, K., Aliev, G., Nunomura, A., Fujioka, H., Russell, R.L., Atwood, C.S., Johnson, A.B., Kress, Y., Vinters, H.V., Tabaton, M., et al. (2001). Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *21*, 3017–3023.
- Hoover, B.R., Reed, M.N., Su, J., Penrod, R.D., Kotilinek, L.A., Grant, M.K., Pitstick, R., Carlson, G.A., Lanier, L.M., Yuan, L.-L., et al. (2010). Tau mislocalization to dendritic spines mediates synaptic dysfunction independently of neurodegeneration. *Neuron* *68*, 1067–1081.
- Hovorkova, P., Kristofikova, Z., Horinek, A., Ripova, D., Majer, E., Zach, P., Sellinger, P., and Ricny, J. (2008). Lateralization of 17Beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 10 in Hippocampi of Demented and Psychotic People. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* *26*, 193–198.
- Iulita, M.F., Allard, S., Richter, L., Munter, L.-M., Ducatenzeiler, A., Weise, C., Do Carmo, S., Klein, W.L., Multhaup, G., and Cuello, A.C. (2014). Intracellular A $\beta$  pathology and early cognitive impairments in a transgenic rat overexpressing human amyloid precursor protein: a multidimensional study. *Acta Neuropathol. Commun.* *2*, 61.
- Jacob, H.J., and Kwitek, A.E. (2002). Rat genetics: attaching physiology and pharmacology to the genome. *Nat. Rev. Genet.* *3*, 33–42.
- Javadov, S., and Kuznetsov, A. (2013). Mitochondrial Permeability Transition and Cell Death: The Role of Cyclophilin D. *Front. Physiol.* *4*.
- Jesse, S., Brettschneider, J., Süßmuth, S.D., Landwehrmeyer, B.G., Arnim, C.A.F. von, Ludolph, A.C., Tumani, H., and Otto, M. (2011). Summary of cerebrospinal fluid routine parameters in neurodegenerative diseases. *J. Neurol.* *258*, 1034–1041.
- Keil, U., Bonert, A., Marques, C.A., Strosznajder, J.B., Müller-Spahn, F., Müller, W.E., and Eckert, A. (2004). Elevated nitric oxide production mediates beta-amyloid-induced mitochondria failure. *Pol. J. Pharmacol.* *56*, 631–634.
- Kissinger, C.R., Rejto, P.A., Pelletier, L.A., Thomson, J.A., Showalter, R.E., Abreo, M.A., Agree, C.S., Margosiak, S., Meng, J.J., Aust, R.M., et al. (2004). Crystal structure of human ABAD/HSD10 with a bound inhibitor: implications for design of Alzheimer's disease therapeutics. *J.Mol.Biol.* *342*, 943–952.
- Kristofiková, Z., Bocková, M., Hegnerová, K., Bartos, A., Klaschka, J., Rícný, J., Rířpová, D., and Homola, J. (2009). Enhanced levels of mitochondrial enzyme 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 10 in patients with Alzheimer disease and multiple sclerosis. *Mol. Biosyst.* *5*, 1174–1179.
- Křiřtofiková, Z., Rířpová, D., Bartoš, A., Bocková, M., Hegnerová, K., Řiřný, J., Čechová, L., Vrajová, M., and Homola, J. (2013). Neuroinflammation and complexes of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 10--amyloid  $\beta$  in Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* *10*, 165–173.

- Kristofikova, Z., Ricny, J., Vyhnaek, M., Hort, J., Laczo, J., Sirova, J., Klaschka, J., and Ripova, D. (2015). Levels of 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 10 in Cerebrospinal Fluid of People with Mild Cognitive Impairment and Various Types of Dementias. *J. Alzheimers Dis. JAD* 48, 105–114.
- Kristofikova, Z., Ricny, J., Kaping, D., Klaschka, J., Kotoucova, J., Bartos, A. Levels of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 10 in CSF are not a valuable biomarker for multiple sclerosis. Under review in *Biomarkers in Medicine*.
- LaFerla, F.M., and Green, K.N. (2012). *Animal Models of Alzheimer Disease*. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2.
- Lecanu, L., Greeson, J., and Papadopoulos, V. (2006). Beta-amyloid and oxidative stress jointly induce neuronal death, amyloid deposits, gliosis, and memory impairment in the rat brain. *Pharmacology* 76, 19–33.
- Leon, W.C., Caneva, F., Partridge, V., Allard, S., Ferretti, M.T., DeWilde, A., Vercauteren, F., Atifeh, R., Ducatzenzeiler, A., Klein, W., et al. (2010). A novel transgenic rat model with a full Alzheimer's-like amyloid pathology displays pre-plaque intracellular amyloid-beta-associated cognitive impairment. *J. Alzheimers Dis. JAD* 20, 113–126.
- Lewis, J., Dickson, D.W., Lin, W.-L., Chisholm, L., Corral, A., Jones, G., Yen, S.-H., Sahara, N., Skipper, L., Yager, D., et al. (2001). Enhanced Neurofibrillary Degeneration in Transgenic Mice Expressing Mutant Tau and APP. *Science* 293, 1487–1491.
- Lovell, M.A., Xiong, S., Markesbery, W.R., and Lynn, B.C. (2005). Quantitative proteomic analysis of mitochondria from primary neuron cultures treated with amyloid beta peptide. *Neurochem. Res.* 30, 113–122.
- Lustbader, J.W., Cirilli, M., Lin, C., Xu, H.W., Takuma, K., Wang, N., Caspersen, C., Chen, X., Pollak, S., Chaney, M., et al. (2004). ABAD directly links Abeta to mitochondrial toxicity in Alzheimer's disease. *Science* 304, 448–452.
- Magnani, E., Fan, J., Gasparini, L., Golding, M., Williams, M., Schiavo, G., Goedert, M., Amos, L.A., and Spillantini, M.G. (2007). Interaction of tau protein with the dynactin complex. *EMBO J.* 26, 4546–4554.
- Manczak, M., and Reddy, P.H. (2013). Abnormal interaction of oligomeric amyloid- $\beta$  with phosphorylated tau: implications to synaptic dysfunction and neuronal damage. *J. Alzheimers Dis. JAD* 36, 285–295.
- Marchant, N.L., and Howard, R.J. (2015). Cognitive debt and Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis. JAD* 44, 755–770.
- Mattson, M.P. (2007). Mitochondrial regulation of neuronal plasticity. *Neurochem. Res.* 32, 707–715.
- Mattson, M.P., Gleichmann, M., and Cheng, A. (2008). Mitochondria in Neuroplasticity and Neurological Disorders. *Neuron* 60, 748–766.
- Morais, V.A., and De Strooper, B. (2010). Mitochondria dysfunction and neurodegenerative disorders: cause or consequence. *J. Alzheimers Dis. JAD* 20 Suppl 2, S255-263.

- Morley, J.E., Armbrecht, H.J., Farr, S.A., and Kumar, V.B. (2012). The senescence accelerated mouse (SAMP8) as a model for oxidative stress and Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta* *1822*, 650–656.
- Mosconi, L., Santi, S.D., Li, J., Tsui, W.H., Li, Y., Boppana, M., Laska, E., Rusinek, H., and Leon, M.J. de (2008). HIPPOCAMPAL HYPOMETABOLISM PREDICTS COGNITIVE DECLINE FROM NORMAL AGING. *Neurobiol. Aging* *29*, 676.
- Muirhead, K.E.A., Borger, E., Aitken, L., Conway, S.J., and Gunn-Moore, F.J. (2010). The consequences of mitochondrial amyloid  $\beta$ -peptide in Alzheimer's disease. *Biochem. J.* *426*, 255–270.
- Murphy, M.P., and LeVine, H. (2010). Alzheimer's disease and the amyloid-beta peptide. *J. Alzheimers Dis. JAD* *19*, 311–323.
- Newmeyer, D.D., and Ferguson-Miller, S. (2003). Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell* *112*, 481–490.
- Nilsen, L.H., Melø, T.M., Sæther, O., Witter, M.P., and Sonnewald, U. (2012). Altered neurochemical profile in the McGill-R-Thy1-APP rat model of Alzheimer's disease: a longitudinal in vivo <sup>1</sup>H MRS study. *J. Neurochem.* *123*, 532–541.
- Nilsen, L.H., Witter, M.P., and Sonnewald, U. (2014a). Neuronal and astrocytic metabolism in a transgenic rat model of Alzheimer's disease. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* *34*, 906–914.
- Nilsen, L.H., Melø, T.M., Witter, M.P., and Sonnewald, U. (2014b). Early Differences in Dorsal Hippocampal Metabolite Levels in Males But Not Females in a Transgenic Rat Model of Alzheimer's Disease. *Neurochem. Res.* *39*, 305–312.
- O'Brien, R.J., and Wong, P.C. (2011). Amyloid Precursor Protein Processing and Alzheimer's Disease. *Annu. Rev. Neurosci.* *34*, 185–204.
- Oddo, S. (2008). The ubiquitin-proteasome system in Alzheimer's disease. *J. Cell. Mol. Med.* *12*, 363–373.
- Oddo, S., Billings, L., Kesslak, J.P., Cribbs, D.H., and LaFerla, F.M. (2004). A $\beta$  Immunotherapy Leads to Clearance of Early, but Not Late, Hyperphosphorylated Tau Aggregates via the Proteasome. *Neuron* *43*, 321–332.
- Ongali, B., Nicolakakis, N., Lecrux, C., Aboukassim, T., Rosa-Neto, P., Papadopoulos, P., Tong, X.-K., and Hamel, E. (2010). Transgenic Mice Overexpressing APP and Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 Feature Cognitive and Vascular Hallmarks of Alzheimer's Disease. *Am. J. Pathol.* *177*, 3071–3080.
- Pagani, L., and Eckert, A. (2011). Amyloid-Beta Interaction with Mitochondria. *Int. J. Alzheimers Dis.* *2011*.
- Parada, C., Parvas, M., and Bueno, D. (2007). Cerebrospinal Fluid Proteomes: From Neural Development to Neurodegenerative Diseases. *Curr. Proteomics* *4*, 89–106.
- Patterson, C., Feightner, J.W., Garcia, A., Hsiung, G.-Y.R., MacKnight, C., and Sadovnick, A.D. (2008). Diagnosis and treatment of dementia: 1. Risk assessment and primary prevention of Alzheimer disease. *Can. Med. Assoc. J.* *178*, 548–556.

- Petrasek, T., Skurlova, M., Maleninska, K., Vojtechova, I., Kristofikova, Z., Matuskova, H., Sirova, J., Vales, K., Ripova, D., and Stuchlik, A. (2016). A Rat Model of Alzheimer's Disease Based on Abeta42 and Pro-oxidative Substances Exhibits Cognitive Deficit and Alterations in Glutamatergic and Cholinergic Neurotransmitter Systems. *Front. Aging Neurosci.* 8.
- Petrasek, T., Vojtechova, I., Lobellova, V., Popelikova, A., Janikova, M., Brožka, H., Houdek, P., Sládek, M., Sumová, A., Kristofikova, Z., Vales, K., Stuchlik, A. Behavioral characterization of the McGill rat model of familial Alzheimer's disease. Under review in *Frontiers in Aging Neuroscience*.
- Pietroboni, A.M., Scarioni, M., Carandini, T., Basilico, P., Cadioli, M., Giulietti, G., Arighi, A., Caprioli, M., Serra, L., Sina, C., et al. (2018). CSF  $\beta$ -amyloid and white matter damage: a new perspective on Alzheimer's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 89, 352–357.
- Platt, B., Drever, B., Koss, D., Stoppelkamp, S., Jyoti, A., Plano, A., Utan, A., Merrick, G., Ryan, D., Melis, V., et al. (2011). Abnormal Cognition, Sleep, EEG and Brain Metabolism in a Novel Knock-In Alzheimer Mouse, PLB1. *PLOS ONE* 6, e27068.
- Priller, C., Bauer, T., Mitteregger, G., Krebs, B., Kretschmar, H.A., and Herms, J. (2006). Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 7212–7221.
- Qi, Y., Klyubin, I., Harney, S.C., Hu, N., Cullen, W.K., Grant, M.K., Steffen, J., Wilson, E.N., Do Carmo, S., Remy, S., et al. (2014). Longitudinal testing of hippocampal plasticity reveals the onset and maintenance of endogenous human A $\beta$ -induced synaptic dysfunction in individual freely behaving pre-plaque transgenic rats: rapid reversal by anti-A $\beta$  agents. *Acta Neuropathol. Commun.* 2, 175.
- Qiu, C., Kivipelto, M., and von Strauss, E. (2009). Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention. *Dialogues Clin. Neurosci.* 11, 111–128.
- Querfurth, H.W., and LaFerla, F.M. (2010). Alzheimer's Disease. *N. Engl. J. Med.* 362, 329–344.
- Rajapakse, N., Shimizu, K., Payne, M., and Busija, D. (2001). Isolation and characterization of intact mitochondria from neonatal rat brain. *Brain Res. Protoc.* 8, 176–183.
- Rauschenberger, K., Schöler, K., Sass, J.O., Sauer, S., Djuric, Z., Rumig, C., Wolf, N.I., Okun, J.G., Kölker, S., Schwarz, H., et al. (2010). A non-enzymatic function of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 10 is required for mitochondrial integrity and cell survival. *EMBO Mol. Med.* 2, 51–62.
- Reddy, P.H., and Beal, M.F. (2008). Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease. *Trends Mol. Med.* 14, 45–53.
- Reitz, C. (2012). Alzheimer's Disease and the Amyloid Cascade Hypothesis: A Critical Review. *Int. J. Alzheimers Dis.* 2012.
- Rezin, G.T., Amboni, G., Zugno, A.I., Quevedo, J., and Streck, E.L. (2009). Mitochondrial Dysfunction and Psychiatric Disorders. *Neurochem. Res.* 34, 1021.
- SantaCruz, K., Lewis, J., Spires, T., Paulson, J., Kotilinek, L., Ingelsson, M., Guimaraes, A., DeTure, M., Ramsden, M., McGowan, E., et al. (2005). Tau Suppression in a Neurodegenerative Mouse Model Improves Memory Function. *Science* 309, 476–481.

Sastre, M., Richardson, J.C., Gentleman, S.M., and Brooks, D.J. (2011). Inflammatory risk factors and pathologies associated with Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* 8, 132–141.

Selfridge, J.E., E, L., Lu, J., and Swerdlow, R.H. (2013). Role of mitochondrial homeostasis and dynamics in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* 51, 3–12.

Shafqat, N., Marschall, H.-U., Filling, C., Nordling, E., Wu, X.-Q., Björk, L., Thyberg, J., Mårtensson, E., Salim, S., Jörnvall, H., et al. (2003). Expanded substrate screenings of human and *Drosophila* type 10 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases (HSDs) reveal multiple specificities in bile acid and steroid hormone metabolism: characterization of multifunctional 3 $\alpha$ /7 $\alpha$ /7 $\beta$ /17 $\beta$ /20 $\beta$ /21-HSD. *Biochem. J.* 376, 49–60.

Shimura, H., Hattori, N., Kubo, S. i, Mizuno, Y., Asakawa, S., Minoshima, S., Shimizu, N., Iwai, K., Chiba, T., Tanaka, K., et al. (2000). Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat. Genet.* 25, 302–305.

Swerdlow, R.H., and Khan, S.M. (2004). A “mitochondrial cascade hypothesis” for sporadic Alzheimer's disease. *Med. Hypotheses* 63, 8–20.

Swerdlow, R.H., Burns, J.M., and Khan, S.M. (2010). The Alzheimer's Disease Mitochondrial Cascade Hypothesis. *J. Alzheimers Dis. JAD* 20, 265–279.

Takuma, K., Yao, J., Huang, J., Xu, H., Chen, xi, Luddy, J., Trillat, A.-C., M Stern, D., Arancio, O., and Shidu Yan, S. (2005). ABAD enhances A $\beta$ -induced cell stress via mitochondrial dysfunction. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 19, 597–598.

Talesa, V.N. (2001). Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. *Mech. Ageing Dev.* 122, 1961–1969.

Tieu, K., Perier, C., Vila, M., Caspersen, C., Zhang, H.-P., Teismann, P., Jackson-Lewis, V., Stern, D.M., Yan, S.D., and Przedborski, S. (2004). L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase II protects in a model of Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 56, 51–60.

Tillement, L., Lecanu, L., and Papadopoulos, V. (2011). Alzheimer's disease: Effects of  $\beta$ -amyloid on mitochondria. *Mitochondrion* 11, 13–21.

Toga, A.W., and Thompson, P.M. (2003). Mapping brain asymmetry. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 37–48.

Torroja, L., Ortuño-Sahagún, D., Ferrús, A., Hämmerle, B., and Barbas, J.A. (1998). scully, an Essential Gene of *Drosophila*, is Homologous to Mammalian Mitochondrial Type II 1-3-hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase/Amyloid- $\beta$  Peptide-binding Protein. *J. Cell Biol.* 141, 1009–1017.

Walko, T.D., Bola, R.A., Hong, J.D., Au, A.K., Bell, M.J., Kochanek, P.M., Clark, R.S.B., and Aneja, R.K. (2014). Cerebrospinal fluid mitochondrial DNA: a novel DAMP in pediatric traumatic brain injury. *Shock Augusta Ga* 41, 499–503.

Wilson, E.N., Abela, A.R., Do Carmo, S., Allard, S., Marks, A.R., Welikovitch, L.A., Ducatenzeiler, A., Chudasama, Y., and Cuello, A.C. (2017). Intraneuronal Amyloid Beta Accumulation Disrupts Hippocampal CRTC1-Dependent Gene Expression and Cognitive Function in a Rat Model of Alzheimer Disease. *Cereb. Cortex N. Y. N 1991* 27, 1501–1511.

Wiltfang, J., Lewczuk, P., Riederer, P., Grünblatt, E., Hock, C., Scheltens, P., Hampel, H., Vanderstichele, H., Iqbal, K., Galasko, D., et al. (2005). Consensus paper of the WFSBP Task Force on Biological Markers of Dementia: the role of CSF and blood analysis in the early and differential diagnosis of dementia. *World J. Biol. Psychiatry Off. J. World Fed. Soc. Biol. Psychiatry* 6, 69–84.

Yan, S.D., and Stern, D.M. (2005). Mitochondrial dysfunction and Alzheimer's disease: role of amyloid-beta peptide alcohol dehydrogenase (ABAD). *Int. J. Exp. Pathol.* 86, 161–171.

Yan, Y., Liu, Y., Sorci, M., Belfort, G., Lustbader, J.W., Yan, S.S., and Wang, C. (2007). Surface plasmon resonance and nuclear magnetic resonance studies of ABAD-Abeta interaction. *Biochemistry (Mosc.)* 46, 1724–1731.

Yang, S.-Y., He, X.-Y., and Schulz, H. (2005). 3-Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase and short chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase in human health and disease. *FEBS J.* 272, 4874–4883.

Yang, S.-Y., He, X.-Y., Olpin, S.E., Sutton, V.R., McMenamin, J., Philipp, M., Denman, R.B., and Malik, M. (2009). Mental retardation linked to mutations in the HSD17B10 gene interfering with neurosteroid and isoleucine metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 14820–14824.

Yang, S.-Y., He, X.-Y., Isaacs, C., Dobkin, C., Miller, D., and Philipp, M. (2014). Roles of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 10 in neurodegenerative disorders. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 143, 460–472.

Yao, J., Taylor, M., Davey, F., Ren, Y., Aiton, J., Coote, P., Fang, F., Chen, J.X., Yan, S.D., and Gunn-Moore, F.J. (2007). Interaction of amyloid binding alcohol dehydrogenase/A $\beta$  mediates up-regulation of peroxiredoxin II in the brains of Alzheimer's disease patients and a transgenic Alzheimer's disease mouse model. *Mol. Cell. Neurosci.* 35, 377–382.

Yoshiyama, Y., Higuchi, M., Zhang, B., Huang, S.-M., Iwata, N., Saido, T.C., Maeda, J., Suhara, T., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M.-Y. (2007). Synapse Loss and Microglial Activation Precede Tangles in a P301S Tauopathy Mouse Model. *Neuron* 53, 337–351.

Zhao, X.-L., Wang, W.-A., Tan, J.-X., Huang, J.-K., Zhang, X., Zhang, B.-Z., Wang, Y.-H., YangCheng, H.-Y., Zhu, H.-L., Sun, X.-J., et al. (2010). Expression of  $\beta$ -Amyloid Induced Age-Dependent Presynaptic and Axonal Changes in *Drosophila*. *J. Neurosci.* 30, 1512–1522.

Zimmer, E.R., Parent, M.J., Cuello, A.C., Gauthier, S., and Rosa-Neto, P. (2014). MicroPET imaging and transgenic models: a blueprint for Alzheimer's disease clinical research. *Trends Neurosci.* 37, 629–641.

#### **Internetové zdroje:**

[online databáze] <https://www.alzforum.org/research-models/alzheimers-disease> (seen 28/12/2017)

**Část výsledků této práce byla prezentována na:**

9th International Conference on Alzheimer's Disease & Dementia

(16-18 October 2017, Rome, Italy) – přednáška a poster

Hofmannova A, Kristofikova Z., Ricny J. Animal model of Alzheimer disease (Tg McGill-R-Thy1-APP rats) and mitochondrial dysfunction.

**Dále jsou výsledky přijaty a budou prezentovány na:**

The 43rd FEBS Congress

(7-12 July 2018, Prague, Czech Republic) – poster (spolu s výsledky optického biosenzoru)

Kristofikova Z., Hofmannova A. Interactions of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 10 and cyclophilin D in Alzheimer disease.

10th World Congress on Dementia and Alzheimer's Disease

(16-18 August 2018, Copenhagen, Denmark) - poster

Kristofikova Z., Hofmannova A., Hromadkova L., Bartos A. Interactions of mitochondrial matrix proteins 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 10 and cyclophilin D in people with Alzheimer Disease and multiple sclerosis.

## Animal model of Alzheimer disease (Tg McGill-R-Thy1-APP rats) and mitochondrial dysfunction



A. Hofmannova, Z. Kristofikova and Jan Rícný

National Institute of Mental Health, Topolova 748, 250 67 Klecany, Czech Republic



### INTRODUCTION

Double transgenic rats McGill-R-Thy1-APP are one of the best animal models of Alzheimer disease (AD). Intraneuronal pathology (observed already in 3-month old rats) is accompanied by a significant elevation of soluble amyloid  $\beta$  1-42 ( $A\beta$  1-42) and by cognitive deficits, several months prior to amyloid plaque deposition (1, 2). Mitochondrial dysfunction has not been studied yet in more details, however, mitochondrial bioenergetic capacity is not fully conserved via defects in complex I enzymatic activity already in 6-month old hemizygous animals (3).

The nucleus-encoded mitochondrial matrix protein 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 10 (17 $\beta$ -HSD10) operates via multiple enzymatic as well as non-enzymatic functions. Its deficiency, overexpression or loss of function is associated with various pathologies. Experiments on transgenic animals overexpressing 17 $\beta$ -HSD10 and displaying higher baseline ATP levels have demonstrated a protective phenotype in models of oxidative/metabolic stress or in a pharmacological model of Parkinson disease. In people with AD or in animal models of AD, 17 $\beta$ -HSD10 overexpression in the brain and the enhanced concentrations in cerebrospinal fluid have been reported, too (4, 5).

Cytosolic 17 $\beta$ -HSD10 is imported into the mitochondrial matrix via the translocase of the outer mitochondrial membrane (TOM) and the translocase of the inner mitochondrial membrane (TIM), and its regulation by Parkin probably occurs through PINK1-Parkin-TOM/TIM pathway. PINK1-Parkin-TOM/TIM pathway participates in clearance of dysfunctional mitochondria and 17 $\beta$ -HSD10 levels in mitochondria could be one of the mechanisms by which Parkin preserves mitochondrial quality (6). 17 $\beta$ -HSD10 is known as a binding partner of intracellular  $A\beta$  accumulated in mitochondria of AD people. Under normal conditions, 17 $\beta$ -HSD10 localised in the mitochondrial matrix binds cyclophilin D (CycD) and, by preventing its translocation to the inner mitochondrial membrane, can regulate the opening of the mitochondrial permeability transition pore (PTP) mediated by CycD. Under conditions of increased accumulation of mitochondrial  $A\beta$  leading to dysfunctional mitochondria, interactions of  $A\beta$  and 17 $\beta$ -HSD10 or those of  $A\beta$  and CycD could mitigate the regulation of CycD by 17 $\beta$ -HSD10. Therefore, the translocation of CycD from the matrix and its interactions with mitochondrial PTP could be enhanced, which should lead to apoptosis in necrosis (7).

### AIMS OF THE STUDY

To evaluate the ability of 17 $\beta$ -HSD10 to regulate CycD in mitochondria isolated from the brains of Tg McGill-R-Thy1-APP rats.

### MATERIALS AND METHODS

**Animals:** 11-month old homozygous Tg McGill-R-Thy1-APP male rats (10x) and age- and sex-related WT animals (10x), 7-month old male Wistar rats as control rats (2x)

**Isolation of mitochondria:** Mitochondria were isolated via Percoll gradient from the left hemisphere (WT and Tg rats) or from both hemispheres (controls). All samples contained 9 mg/ml of mitochondrial proteins.

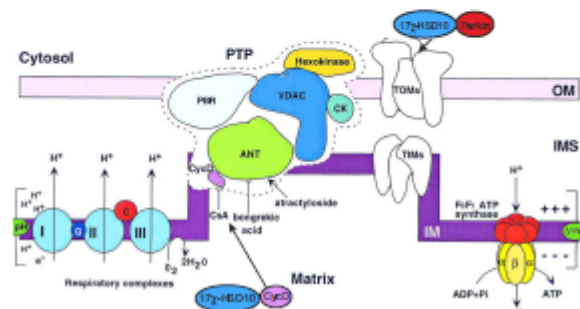
**ELISA measurements:** 17 $\beta$ -HSD10 (quantitative competitive ELISA by recombinant full length rat protein and polyclonal rabbit anti-17 $\beta$ -HSD10, both from Flarebio), CycD (quantitative sandwich ELISA, by a kit from MyBioSource), 17 $\beta$ -HSD10 - CycD complexes (semiquantitative sandwich ELISA, by polyclonal rabbit anti-17 $\beta$ -HSD10 (Flarebio) as a capture antibody and mouse monoclonal anti-CycD (Abnova) as primary antibody).

**Statistical significance:** BMDP statistical software was used. Results are presented as means  $\pm$  S.D. Levels of complexes were related to those from control mitochondria and expressed in %.

**Table 1:**  
Results of experiments performed on mitochondria isolated from the brains of Tg McGill-R-Thy1-APP rats

	17 $\beta$ -HSD10 ng/ $\mu$ g of proteins	CycD ng/ml	17 $\beta$ -HSD10 - CycD %
WT rats	3.51 $\pm$ 0.73	2.98 $\pm$ 0.14	103.2 $\pm$ 20.9
Tg rats	3.25 $\pm$ 1.02	3.21 $\pm$ 0.36	78.4 $\pm$ 19.6*
ANOVA	p = 0.5067	p = 0.0828	p = 0.0160

**Fig. 1:**  
Scheme of PINK1-Parkin-TOM/TIM-mediated transport of cytosolic 17 $\beta$ -HSD10 and of regulation of mitochondrial PTP via interactions of CycD and 17 $\beta$ -HSD10 in mitochondrial matrix



### RESULTS AND DISCUSSION

- Concentrations of 17 $\beta$ -HSD10 are not elevated in brain mitochondria isolated from Tg compared to WT rats. The result indicates that the up-regulation of 17 $\beta$ -HSD10 protein (observed in people with AD and in many animal models of AD) does not have to be followed by its increased transport into mitochondrial matrix via the PINK1-Parkin-TOM/TIM pathway.
- 17 $\beta$ -HSD10 - CycD complexes are significantly decreased but levels of 17 $\beta$ -HSD10 and CycD are not altered. The result can be interpreted via a weakened ability of 17 $\beta$ -HSD10 to regulate CycD in mitochondrial matrix in AD.

### REFERENCES

- Leon WC et al., Journal of Alzheimer's Disease 2010, 20: 113-126.
- Iulita MF et al., Acta Neuropathologica Communications 2014, 2:61.
- Martino Adami PV et al., Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism 2017, 37: 69-84.
- Yan SD and Stern DM, International Journal of Experimental Pathology 2005, 86: 161-171.
- Kristofikova Z et al., Current Alzheimer Research 2013, 10: 165-173.
- Bentolin G et al., Cell Death and Differentiation 2015, 22: 1563-1576.
- Muirhead KB et al., Biochemical Journal 2010, 426: 255-270.

### Acknowledgement:

The study was supported by the Czech Science Foundation (P304-12G069 project).

9th International Conference on Alzheimer's Disease & Dementia  
(16-18 October 2017, Rome, Italy)