

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra fyziologie živočichů

Diplomová práce

Exprese cholinergního genového místa u myšího modelu Alzheimerovy nemoci

Expression of cholinergic gene locus in a mouse
model of Alzheimer's disease



Bc. Pavel Zimčík

Praha 2010

**Vedoucí práce: MUDr. Vladimír Doležal, DrSc
(FgÚ AV ČR, Oddělení Neurochemie)**

Prohlášení:

Prohlašuji, že předkládanou diplomovou práci jsem vypracoval samostatně a použitou literaturu jsem řádně citoval.

27. 4. 2010

Bc. Pavel Zimčík

Poděkování:

V úvodním odstavci bych rád poděkoval svému školiteli MUDr. Vladimíru Doležalovi, DrSc za vedení při psaní této diplomové práce. Dík patří také RNDr. Vladimíru Rudajevovi, Mgr. Evě Machové a Bc. Heleně Kurfürst za pomoc při vypracování experimentální části diplomové práce, Mgr. Janu Jakubíkovi za korekturu textu a ostatním kolegům z Oddělení Neurochemie FgÚ AV ČR.

Abstrakt (český jazyk)

V současné době nejběžnější senilní demence, Alzheimerova choroba (AD), je charakterizována postižením paměti a vyšších kognitivních funkcí. Typickými post-mortem nálezy na mozcích pacientů s AD jsou extracelulární amyloidní plaky, intracelulární neurofibrilární klubíčka a poškozené cholinergní i ostatní neurotransmitterové systémy. Do dnes není známo spojení mezi poškozeným centrálním cholinergním systémem a hromaděním beta-amyloidu. Naše experimenty se zaměřily na parietální kůru sedmiměsíčních APP^{swe}/PS1^{dE9} transgenních myší, v jejichž mozcích dochází k vysoké produkci amyloidních fragmentů. Cholinerní synapse těchto myší vykazují funkční presynaptické (stimulované uvolňování acetylcholinu) i postsynaptické (aktivace G-proteinů muskarinovými receptory) poruchy a úbytek cholinergních markerů. Pomocí qPCR jsme stanovili hodnoty exprese mRNA pro cholinacetyltransferázu, váčkový přenašeč pro acetylcholin a M₁-M₄ podtypy muskarinových receptorů u transgenních a kontrolních myší ze stejného vrhu. Získané hodnoty exprimované mRNA se u žádného genu signifikantně nelišily. Tyto výsledky ukazují, že úbytek cholinergních proteinů je důsledkem dějů na posttranskripční úrovni.

Abstrakt (anglický jazyk)

The most common senile dementia, Alzheimer disease (AD), is characterized by a decline of memory and high cognitive functions. Typical post-mortem brain lesions are extracellular amyloid deposits, intracellular neurofibrillary tangles and ruined cholinergic and other neurotransmitters systems. Connection between damaged central cholinergic system and beta-amyloid accumulation remains obscure. We examined parietal cortex of young adult (7-month-old) female APP^{swe}/PS1^{dE9} double transgenic mice which develop beta-amyloid fragments at high rate. Cholinergic synapses of these mice demonstrate functional presynaptic (stimulated acetylcholine release) as well as postsynaptic (muscarinic receptor-induced G-protein activation) deficits and reduction of cholinergic markers. The mRNA levels of choline acetyltransferase, vesicular acetylcholine transporter and M₁ to M₄ subtypes of muscarinic receptors were determined in transgenic and littermate controls using qPCR. Obtained experimental data does not show any changes in measured mRNA levels. These observations indicate that reduction of cholinergic synaptic markers and function is due to posttranscriptional events.

Obsah:

Prohlášení	2
Poděkování	3
Abstrakt (český jazyk)	4
Abstrakt (anglický jazyk)	5
Obsah	6
Seznam zkratk	7
1. Úvod	8
2. Cholinergní neurotransmise	10
2.1. Cholinergní genový lokus	11
2.1.1. Váčkový přenašeč pro acetylcholin	11
2.1.2. Cholinacetyltransferáza	12
2.2. Genové uspořádání cholinergního genového místa a regulace exprese	13
2.3. Acetylcholinové receptory	16
2.3.1. Acetylcholinový receptor nikotinového typu	16
2.3.2. Acetylcholinový receptor muskarinového typu	17
2.4. Cholinergní systém v CNS	18
3. Patogeneze Alzheimerovy choroby	20
3.1. Protein prekurzor amyloidu a vznik β -amyloidu	21
3.2. Protein τ	24
3.3. β -amyloid a cholinerní neurotransmise	25
3.4. Alzheimerova choroba a diabetes mellitus	26
3.5. Strategie léčby Alzheimerovy choroby	26
4. Zvířecí modely Alzheimerovy choroby	28
4.1. Bezobratlí	28
4.2. Obratlovci	29
Cíle diplomové práce	30
Materiál a metody	31
Výsledky	37
Diskuze	41
Závěr	44
Literární zdroje	45
Přílohy	55

Seznam zkratek

A.U.	poměrné (arbitrární) jednotky
AD	Alzheimerova choroba (Alzheimer disease)
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesteráza
AK	aminokyselina
ApoE	apolipoprotein E
APP	protein prekursor amyloidu (amyloid precursor protein)
APPLP	proteiny podobné APP (APP like proteins)
A β	β -amyloid
CNS	centrální nervová soustava
GABA	kyselina γ -aminomáselná
GAPDH	glyceraldehydfosfát dehydrogenáza
ChAT	cholinacetyltransferáza
mAChR	acetylcholinový receptor muskarinového typu
nAChR	acetylcholinový receptor nikotinového typu
PCR	polymerázová řetězová reakce
PS	presenilin
qPCR	kvantitativní (real-time) PCR
TM	transmembránový
VAcHT	váčekový přenašeč pro acetylcholin
VMAT	váčekové přenašeče pro monoaminy

1. Úvod

V současné době jen několik málo výzkumných témat budí stejně velký zájem jako je tomu v případě Alzheimerovy nemoci (AD). Stále vznikají nová výzkumná centra, zakládají se nové výzkumné skupiny a studium patogeneze AD zaměstnává více a více vědeckých pracovníků. Adekvátně k přibývajícím vědecké síle rostou také finanční investice, které do tohoto výzkumu celosvětově plynou.

Závažných důvodů vzrůstajícího zájmu o tento vědní obor je několik. Během posledních desetiletí došlo k výraznému nárůstu doby lidského života (např. v České republice došlo mezi lety 1981 – 2005 ke zvýšení naděje na dožití u mužů resp. žen ze 67,1 resp. 74,1 let na 72,9 resp. 79,1 let www.czso.cz). Vyšší procento lidí tedy dosáhne věku, kdy se začínají vyskytovat neurodegenerativní onemocnění, mezi kterými je nejčastější právě AD. V současné době trpí AD celosvětově přibližně 30 milionů lidí. Odhaduje se, že se tento počet každých dvacet let zdvojnásobí. Finanční prostředky, které se následně vydají na léčbu a sociální pomoc nemocným jsou odhadovány na 315 miliard dolarů ročně (www.medicinenet.com).

AD je neurodegenerativní onemocnění, které postihuje centrální nervovou soustavu (CNS). U pacientů se projevuje poruchami chápání, krátkodobé paměti, zapomínáním a změnami v chování, které v konečném stadiu nemoci vedou až neschopnosti postarat se o sama sebe. Posmrtně se AD diagnostikuje přítomností extracelulárních plaků tvořených β -amyloidem ($A\beta$) a intracelulární přítomností neurofibrilárních klubíček složených ze spárovaných a jednoduchých vláken tvořených z velké části hyperfosforylovanou formou proteinu τ (tau, protein asociovaný s mikrotubuly). Onemocnění spouští zvýšení koncentrace $A\beta$, který se vyštěpuje z transmembránového proteinu prekurzoru amyloidu (APP, Amyloid Prekursor Protein). $A\beta$ je polypeptid s délkou 39 – 43 aminokyselin. Nejčastější jsou fragmenty o délce 40 a 42 aminokyselin. Fragmenty $A\beta$ se nejdříve shlukují v rozpustné oligomery a poté nerozpustné fibrily a vytváří amyloidní plaky. Předpokládá se, že škodlivé působení $A\beta$ zprostředkovávají jeho rozpustné oligomery, které doposud ne zcela jasným způsobem spouštějí patogenní mechanismy. Počáteční poruchy jsou funkční, avšak s postupujícím časem dochází k rozsáhlému morfologickému poškození a buněčné smrti neuronů a degeneraci některých mozkových částí (Selkoe 2001). V pokročilém stadiu nemoci jsou poté postiženy mnohé neuropřenašečové systémy i nenervové buňky (gliové buňky).

I přes vzrůstající počet vědeckých publikací nejsou u většiny pacientů dosud známy přesné příčiny vzniku a mechanismy vývoje AD, a tedy chybí i efektivní léčba této choroby. V současné době existují pouze farmaka, která podporují oslabený nervový přenos u

selhávajících neurotransmiterových systémů. Medikace tedy řeší pouze důsledky AD nikoliv její příčiny.

2. Cholinergní neurotransmise

Acetylcholin (ACh) se jako neurotransmitter účastní nervového přenosu na řadě míst v rámci centrální i periferní nervové soustavy. Na periferních synapsích přenáší nervový signál především na nervosvalových ploténkách příčně pruhovaných svalů včetně srdce (nervus vagus), na synapsích parasymptického nervového systému u hladkých svalů a na synapsích ganglií sympatického i parasymptického nervového systému. Dále se uplatňuje na mnoha místech centrální nervové soustavy, kde cholinergní síť hraje důležitou roli např. při učení, paměti, spánku a pohybu. Acetylcholin byl popsán jako první neurotransmitter na počátku 20. století O. Loewim a H. Dalem. Za tento objev byli později oceněni Nobelovou cenou za lékařství.

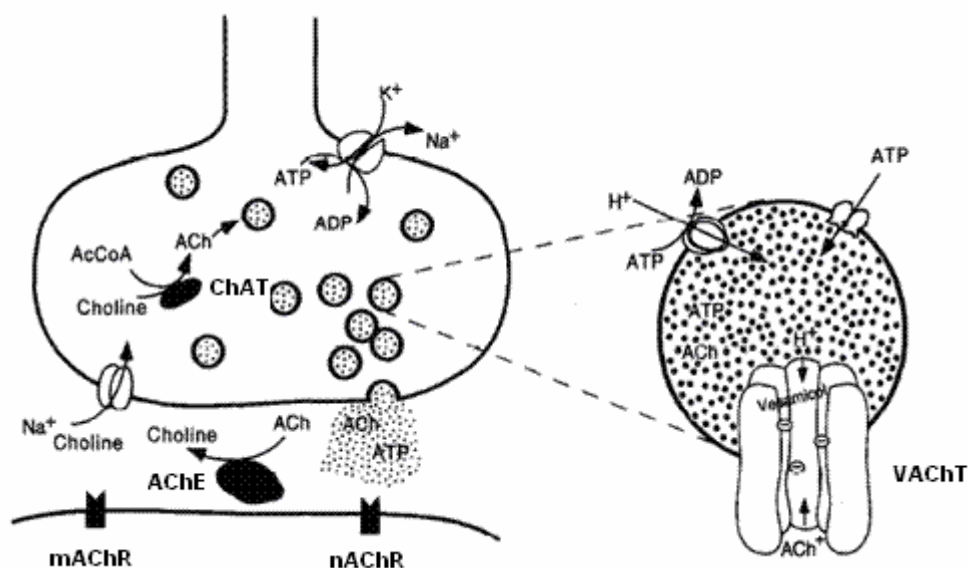
Cholinergním neuronem označujeme buňku, která ACh syntetizuje, transportuje do synaptických váčků a po příchodu akčního potenciálu uvolňuje do synaptické štěrby. Proteiny, které se účastní metabolismu ACh a proteiny spojené s jeho signalizací lze rozdělit do dvou skupin dle jejich rozmístění – na presynaptické a postsynaptické.

Mezi proteiny presynaptického segmentu patří především cholin acetyltransferáza (ChAT), enzym zodpovědný za syntézu ACh; váčkový přenašeč pro ACh (VACHT, Vesicular Acetylcholine Transporter), který transportuje ACh z intracelulárního prostoru do synaptických váčků; vysokoafinní cholinový transportér (ChT1, Choline Transporter 1), který přenáší cholin do buňky.

V mezibuněčném prostoru se nachází enzym acetylcholinesteráza (AChE), který ACh rozkládá na cholin a acetát. ACh je jediný neurotransmitter, jehož signalizační působení je ukončeno štěpením.

Postsynaptický segment nese ACh receptory, které zprostředkovávají přenos signálu na následující neuron. Jedná se o ionotropní nikotinové receptory (nAChR) a metabotropní muskarinové receptory (mAChR). Receptory pro ACh se nachází i na presynaptických zakončeních kde slouží k zpětnovazební modulaci uvolňování ACh (obr. 1).

Cholinergní proteiny hrají kromě AD roli i v dalších onemocněních (např.: Parkinsonova nemoc, epilepsie, schizofrenie, deprese, autizmus, myasthenia gravis, atd.)



Obr. 1: Synapse cholinergního neuronu a metabolismus ACh (upraveno podle Usdin a kol. 1995)

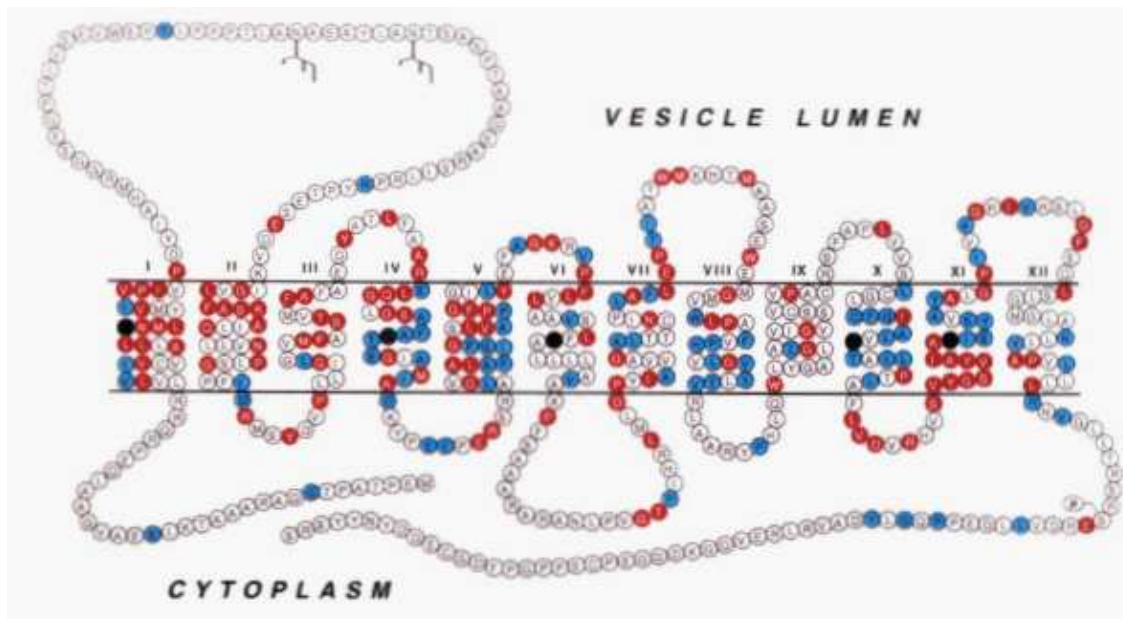
2.1 Cholinergní genový lokus

Cholinergní fenotyp neuronu je mimo jiné determinován expresí tzv. cholinergního genového loku (cholinergic gene locus). Lokus o délce asi 80kb je umístěn na lidském chromozomu 10q11.2. a nese geny pro proteiny ChAT a VACHT a regulační sekvence pro jejich expresi. Geny jsou zde lokalizovány tak, že gen pro VACHT je vložen do prvního intronu genu pro ChAT. Je důležité zmínit, že oba geny leží ve stejné transkripční orientaci.

2.1.1 Váčekový přenašeč pro acetylcholin

Vesikulární acetylcholinový transportér je transmembránový protein o délce 500–600 aminokyselin (v závislosti na živočišném druhu). Po sekvenaci mRNA, zhodnocením indexu hydrofobicity a předpovědi sekundární struktury bylo zjištěno, že VACHT obsahuje celkem 12 transmembránových (TM) domén. Oba proteinové konce jsou umístěny extravesikulárně. Mezi 1. a 2. TM doménou se nachází dlouhá intravesikulární glykozylovaná smyčka (obr. 2).

Tyto popsané charakteristiky řadí VACHT do rodiny transportních proteinů, kam lze zařadit unc-1 (předpokládaný gen pro vesikulární transportér u *Caenorhabditis elegans*) a přenašece pro další neurotransmitery (dopamin, serotonin, noradrenalin) označované jako váčekové monoaminové transportéry (vesicular monoamine transporters, VMATs). Tyto proteiny jsou mezi sebou více či méně sekvenčně homologní a mají pravděpodobně společný původ v proteinech označovaných jako TEXANs (toxin exporting and proton exchanging antiporters), které se vyskytují jak u bakterií tak i eukaryot (Usdin a kol. 1995; Eiden 1998).



Obr. 2: Předpokládaná struktura VACHT v plazmatické membráně. Vyznačeny jsou glykozylační místa a 12 TM domén (převzato z Erickson a kol. 1994)

Transport ACh z cytoplazmy do váčku je poháněn protonovým elektrochemickým gradientem. Gradient je produkován ATPázou typu V, která transportuje protony do váčku za současného rozkladu ATP. Tím produkuje jak chemický (uvnitř kyselý), tak elektrický (uvnitř kladný) gradient. Gradient je využíván proteinem VACHT, který transportuje ACh do váčků. Poměr přenosu ACh/H⁺ byl stanoven na 1:2 (Nguyen a kol. 1998). Specifickým blokátorem VACHT je vezamikol, který inhibuje cholinergní transmissi. Na rozdíl od antagonistů acetylcholinu, které blokují postsynaptické nikotinové acetylcholinové receptory, se vezamikol váže na VACHT a blokuje ACh transport do váčků a tím i jeho uvolnění. VACHT byl u myši (*Mus musculus*) a u parejnoka (*Torpedo marmorata*) identifikován právě použitím vezamikolu, a proto se také označoval jako vezamikol-vážící (senzitivní) transportér. Inhibitory dalších členů proteinové rodiny VMAT jsou například rezepin nebo tetrabenazin (Erickson a kol. 1994).

2.1.2 Cholinacetyltransferáza

Enzym ChAT (cholin-O-acetyltransferáza, EC 2.3.1.6) syntetizuje ACh v nervovém zakončení cholinergního neuronu, substrátem je mu cholin a acetylkoenzym A. V případě ACh se jedná pouze o jednokrokovou syntézu a je tedy méně energeticky a enzymaticky náročná v porovnání se syntézou jiných neurotransmiterů.

Syntéza ChAT probíhá v těle neuronu a do nervového zakončení je transportována pomalým i rychlým axoplazmatickým tokem. Z cholinergních buněk bylo izolováno více typů mRNA pro ChAT, které se sekvenčně liší. Tento jev je zapříčiněn přepisem ChAT genu z

více promotorů a různým způsobem sestřihu primárních transkriptů. Tyto transkripty se označují podle svého prvního exonu: R-, N- a M-typ, přičemž M forma je v neuronu nejzastoupenější. Transkripty se liší na své nepřekládané oblasti na 5' konci (Misawa a kol. 1992). U hlodavců vzniká translací všech typů mRNA stejný enzym. U člověka M-typ kóduje malou i velkou formu enzymu, zatímco R- a N-typ pouze malou formu ChAT, která odpovídá ChAT u hlodavců (Oda 1999).

Další zajímavostí tohoto enzymu je jeho výskyt v nervovém zakončení ve volné (soluble, rozpuštěné v cytoplasmě) a membránově vázané (membrane-bound) formě. Studium na octomilce (*Drosophila*) dokázalo, že obě tyto formy mají stejnou molekulovou váhu (75kDa). Solubilní formy se v buňce vyskytuje 80-90% a 10-20% připadá na membránově vázanou formu. U octomilky se vázaná forma ChAT nachází asociována pouze s plazmatickou membránou (Pahud a kol. 1998), kdežto v hipokampální tkáni potkana byla zjištěna přítomnost ChAT vázané i na synaptické váčky (Carroll 1994).

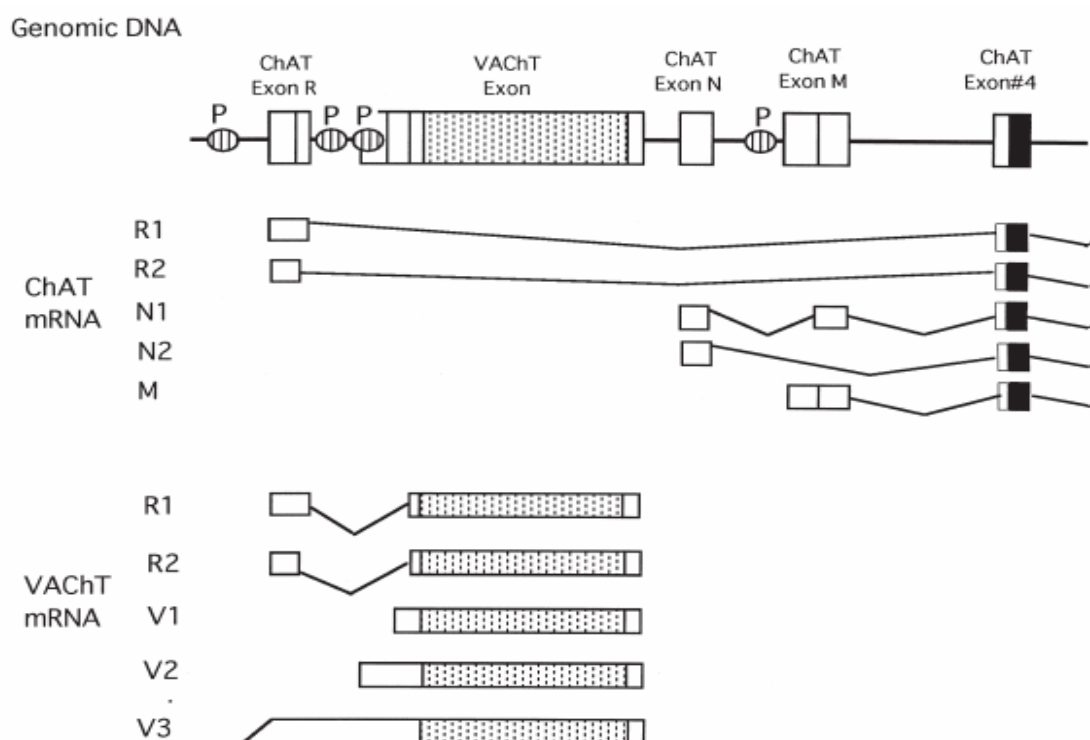
V závislosti na živočišném druhu se délka řetězce ChAT pohybuje mezi 630-750 aminokyselinami. U člověka může probíhat translace mRNA M-typu ze dvou různých iniciačních kodónů a dát tak vzniku malé (630 AK) a velké (748 AK) formě ChAT. Experimentálně bylo dokázáno, že malá i velká forma se v míře své aktivity neliší (Oda a kol. 1996).

2.2 Genové uspořádání cholinergního genového místa a regulace exprese

Jak již bylo řečeno výše, celý gen pro VACHT leží na prvním intronu genu pro ChAT. První pozorování bylo provedeno na hlístici (*Caenorhabditis elegans*), kde gen *cha-1* (kódující protein ChAT) nese ve svém prvním intronu gen *unc-17* (kódující protein VACHT). Přepis celého úseku dá vzniknout primárnímu dlouhému transkriptu. Z tohoto dlouhého úseku je mRNA pro ChAT a VACHT vyštěpena procesem alternativního splicingu. V případě nematod je finální mRNA pro VACHT složena ze 4 od sebe oddělených exonů a mRNA pro ChAT je složena z 11 exonů, přičemž první exon je společný oběma genům. Předpokládá se, že každá mRNA je vystřižena z jednoho společného transkriptu, který je přepisován pouze od jednoho promotoru (Alfonso a kol. 1994). U savců nastává odlišná situace. Gen pro VACHT je v intronu uložen celý a nepřerušovaný.

Transkripce cholinergního loku může vycházet z více možných promotorů a primární transkript poté prochází alternativním sestřihem. To má za následek, že v savcích cholinergních neuronech lze identifikovat více skupin mRNA pro VACHT i ChAT. Podtypy

mRNA pro oba proteiny jsou označeny podle své skladby, která se liší v obsahu tří exonů označených jako R, N a M (obr. 3) (Misawa a kol. 1992; Bejanin a kol. 1994).



Obr. 3: Uspořádání kódujících sekvencí pro geny VACHT a ChAT v rámci cholinergního genového loku. Vyznačeny jsou sestřihové varianty genů a promotory (P); (převzato z Oda 1999)

Řada experimentů se snažila prokázat umístění promotorů na cholinergním loku a zjistit, zda existují promotory společné pro oba geny. Geny (VACHT i ChAT) označené jako R mají společný promotor, který je umístěn před R exonem a tedy může generovat mRNA pro oba proteiny. V tomto případě jsou ChAT i VACHT mRNA produkovány tehdy, pokud se transkripce nezastaví na sekvenci kódující polyadenylační konec VACHT mRNA. Pokud je zde transkripce přerušena, je generována VACHT mRNA typu V3 nebo její sestřihem upravené verze R1 a R2. Transkripcí celého úseku od R-exonu až po terminační úsek za genem pro ChAT vzniká dlouhá pre-mRNA, ze které je vystřižen celý úsek (7kb) VACHT genu. Tento proces vede ke vzniku R variant ChAT mRNA. VACHT mRNA označená jako V1 a V2 má promotory situované mezi exonem R a sekvencí kódující VACHT. Varianty mRNA genu ChAT označované N a M mají promotory umístěné za kódující sekvencí genu VACHT (Cervini a kol. 1995; Mallet a kol. 1998).

Proteiny cholinergního loku mohou být exprimovány společně nebo každý zvlášť. Toto tvrzení se odvíjí od přítomnosti regulačních míst na loku, která jsou oběma genům společná a regulačních míst vlastních pouze jednomu z genů. Současné odborné práce se

zabývají studiem těchto míst a hlavně látek, které mají vliv na zesílení či zeslabení exprese (enhancers, silencers).

Uspořádání genů v rámci cholinergního místa by se dalo připodobnit operonovému modelu, který se vyskytuje u prokaryot. Tento model popisuje uspořádání více genů (například enzymů pro syntézu určité aminokyseliny při jejím nedostatku) jdoucích sekvenčně za sebou. Celé sekvenci připadá pouze jedno regulační místo. V buňce je tedy přítomen buď celý enzymatický aparát, nebo žádný z enzymů spadající do daného operonu. I cholinergní genový lokus má jedno nebo více společných regulačních míst. Expese obou genů zároveň z jedné pre-mRNA vede pak k R-modelu popsanému výše. Tento model je ale zastoupen minoritně.

Častější je jiný případ koexpese. V rámci neuronu existují signální kaskády, které jsou spouštěny jednou signální molekulou, indukující expresi ChAT i VACHT proteinu, ale ne přes společný transkript. Mezi dané molekuly patří např. cholinergní diferenciacní faktor/leukémii inhibující faktor, kyselina retinová a cAMP (Berse a Blusztajn 1995). Nervový růstový faktor (NGF, Nerve Growth Factor) také zvyšuje expresi obou proteinů (Berse a kol. 1999). Společných regulačních míst (cis-acting element) je na cholinergním loku více, každý element pak spadá pod kontrolu jiné/jiných regulačních molekul. Toto vede k tvrzení, že regulace cholinergního místa je komplexní záležitostí, na které se podílí řada signálních kaskád. U výše uvedených látek byl prokázán vliv na zvýšenou expresi cholinergních proteinů. V roce 2000 byla u myši identifikována látka (morphogenetic protein 9), která nejen že zvyšuje expresi, ale je zodpovědná i za indukci exprese ChAT a VACHT a tím i za cholinergní fenotyp neuronu (Lopez-Coviella a kol. 2000).

To, zda se budou oba geny exprimovat společně, nebo se bude každý z genů exprimovat zvlášť, závisí na umístění neuronu v rámci nervové soustavy a jeho vývojovém a funkčním stavu. Význam poměru společná versus oddělená exprese můžou nastítnit experimenty prováděné na potkanech. *In situ* hybridizací bylo zjištěno, že u embryí potkana je ve všech předpokládaných cholinergních neuronech vyšší koncentrace mRNA pro protein VACHT v porovnání s ChAT mRNA. U dospělého jedince se v cholinergních oblastech CNS a motorických neuronech tento poměr vyrovná, zatímco v periferních cholinergních gangliích je exprimováno více proteinu VACHT (Schutz a kol. 2001). Oddělená exprese těchto genů může mít za následek velikost ACh kvant obsažených ve váčcích. Afinita proteinu VACHT k ACh byla stanovena přibližně na 1mM, což je také odhadovaná hodnota koncentrace ACh v cytoplazmě cholinergního neuronu zajištěná funkcí ChAT. Poměr těchto proteinů v nervovém zakončení pak tedy ovlivní i míru plnění váčků (Weihe a kol. 1998).

2.3 Acetylcholinové receptory

Receptory pro ACh se dělí podle svých selektivních agonistů na receptor nikotinového a muskarinového typu.

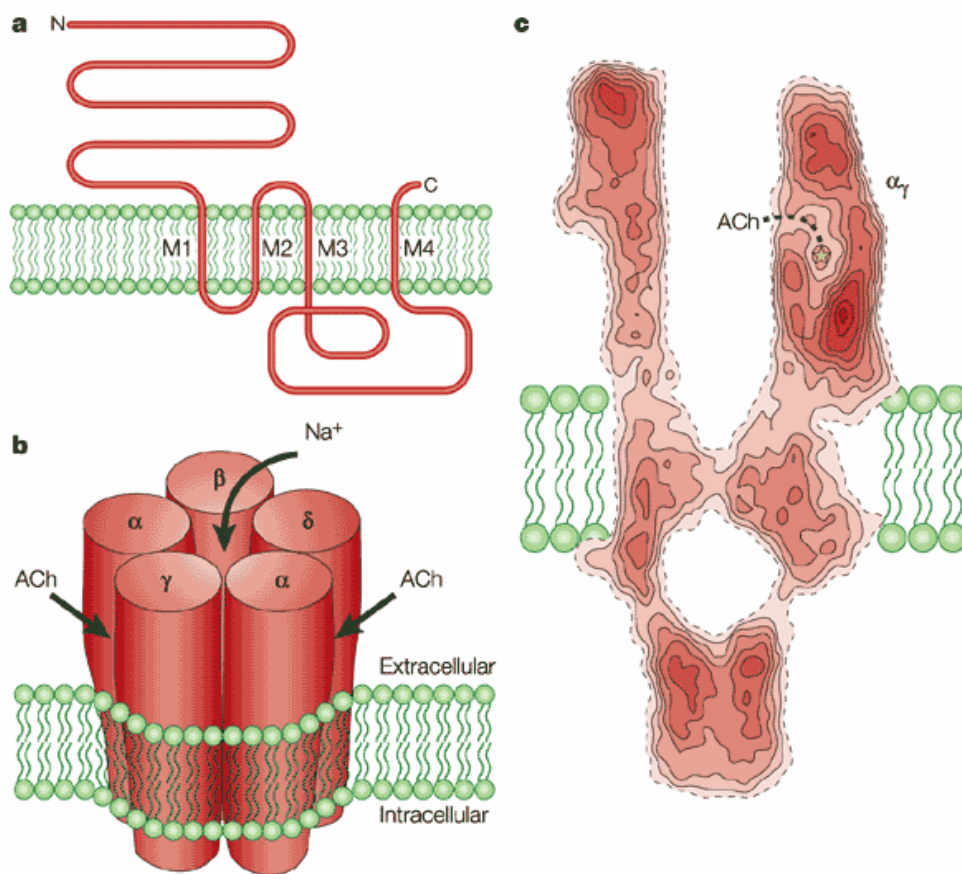
2.3.1 Acetylcholinový receptor nikotinového typu

Nikotinový receptor je prvním a nejlépe popsaným neurotransmitterovým receptorem. Jedná se o neselektivní iontový kanál s propustností pro kationty. Jeho přirozeným blokátorem je tubokurarin. Společně s GABA_A receptorem, glycinovým receptorem a serotoninovým receptorem typu 3 patří nikotinový receptor do rodiny ligandem řízených iontových kanálů.

Jedná se o pentamer složený z různých kombinací podjednotek $\alpha(1-9)$, $\beta(1-4)$, γ , δ , ϵ , které jsou uspořádány kolem centrálního iontového kanálu. Podjednotkové složení se liší v závislosti na umístění receptoru a vývojovém stádiu organismu. Neuronální receptory jsou složeny z podjednotek $\alpha 2$ - $\alpha 9$ a $\beta 2$ - $\beta 4$ a mohou existovat jako hetero (podjednotky $\alpha 2$ - $\alpha 6$ a $\beta 2$ - $\beta 4$) i homomery (podjednotky $\alpha 7$ - $\alpha 9$); svalové receptory pak z $\alpha 1$, $\beta 1$, γ , δ a ϵ . Podjednotky $\alpha 3$, $\alpha 5$ a $\alpha 7$ jsou kromě neuronální tkáně exprimovány také v non-neuronálních buňkách, kam patří gliové buňky, buňky epitelu dýchacích cest, střeva, epidermis, endoteliální buňky, červené krvinky atd. (Wessler a kol. 2003).

Vazebná místa pro ACh jsou nejčastěji dvě a to obecně na rozhraní α a β podjednotky. U homomerních receptorů je pak 5 vazebných míst na rozhraní všech α podjednotek. Homomerní receptor je inhibován α -bungarotoxinem (Colquhoun a Patrick 1997).

Nikotinový receptor se vyskytuje ve třech základních stavech: zavřený, otevřený a desensitizovaný. Stav desensitizace se však liší ve své míře, která je závislá na době, po kterou je receptor vystaven působení agonisty (Reitstetter a kol. 1999). Na periférii je nAChR umístěn převážně na nervosvalové ploténce a slouží k přenosu signálu z neuronu na svalové vlákno. Základní funkcí nAChR v CNS je modulovat výlev ostatních neurotransmiterů. Svoji pozicí v presynaptickém segmentu zvyšuje výlev téměř všech neurotransmiterů (Role a Berg 1996). Nikotinový receptor svou přítomností v postsynaptické membráně dále umožňuje rychlou ACh zprostředkovanou transmissi v hipokampu a sensorické kůře (Alkondon a kol. 1998) (obr. 4).



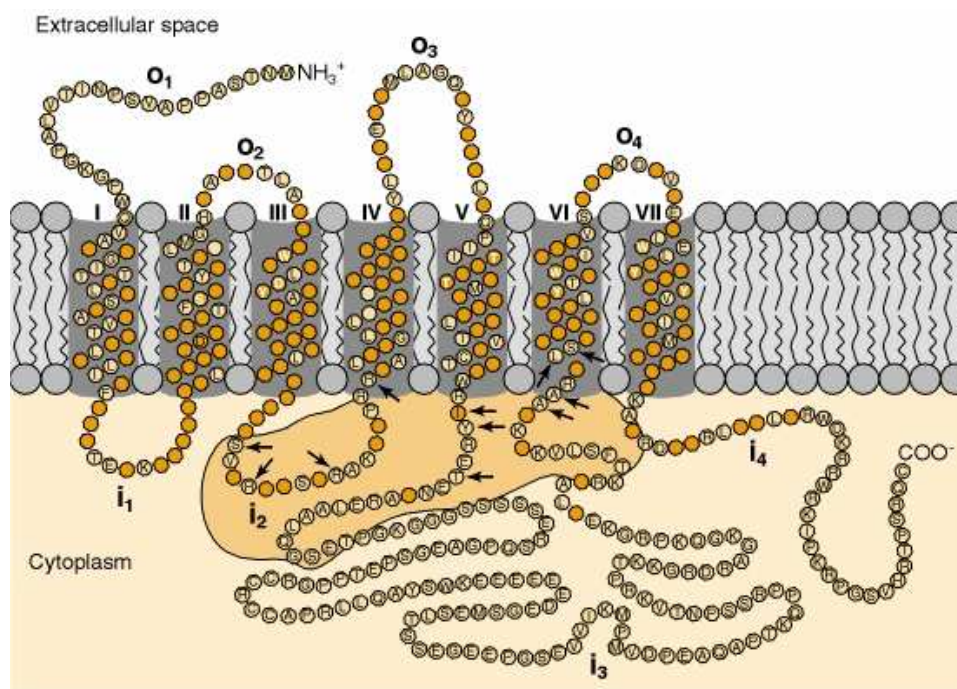
Obr. 4: Nikotinový acetylcholinový receptor. Složení receptorové podjednotky v membráně (a); kvartérní uspořádání podjednotek svalového typu receptoru s vyznačenými vazebnými místy pro ACh (b); krystalografický snímek receptoru (c); (převzato z www.nature.com/nrn/journal/v3/n2/images/)

2.3.2 Acetylcholinový receptor muskarinového typu

Muskarinové receptory se od nAChR liší nejen svojí strukturou, ale i způsobem přenosu signálu do buňky. Patří do velké skupiny tzv. metabotropních receptorů, kam se řadí GABA_B receptory, většina serotoninových receptorů, histaminové receptory, opioidní receptory, dopaminové receptory atd. Přenos signálu do intracelulárního prostoru buňky je zprostředkován heterotrimerními G proteiny (proto označí GPCR – GProtein Coupled Receptors). Po aktivaci trimerního proteinu je provedena výměna GDP za GTP na α podjednotce, která je separována od $\beta\gamma$ komplexu a obě části poté slouží jako signální molekuly.

GPCR jsou o membránové proteiny se 7 TM doménami, třemi intracelulárními a třemi extracelulárními smyčkami, extracelulárním N koncem a intracelulárním C koncem (obr. 5). Muskarinové receptory se dělí na 5 podtypů označovaných M₁ – M₅, které jsou sekvenčně homologní v místě vazby ACh na receptor a liší se především v sekvenci třetí intracelulární kličky. Tato klička se účastní vazby G proteinu na receptor (Kubo 1993). Podle odpovědi,

jakou mAChR vyvolají, je lze dělit na dvě skupiny. Liché podtypy (M_1, M_3, M_5) prostřednictvím G_q a G_{11} proteinů aktivují fosfolipázu C a prostřednictvím G_s proteinů stimuluje činnost adenylátcyklázy. Sudé podtypy (M_2, M_4) mají za partnery G_i a G_o proteiny, které činnost adenylátcyklázy inhibují. Komplex $\beta\gamma$, který se odděluje po aktivaci G_i a G_o proteinů, reguluje draslíkové, dovnitř usměrňující kanály (Kofuji a kol. 1995), nebo napětím řízené vápníkové kanály (Herlitze a kol. 1996).

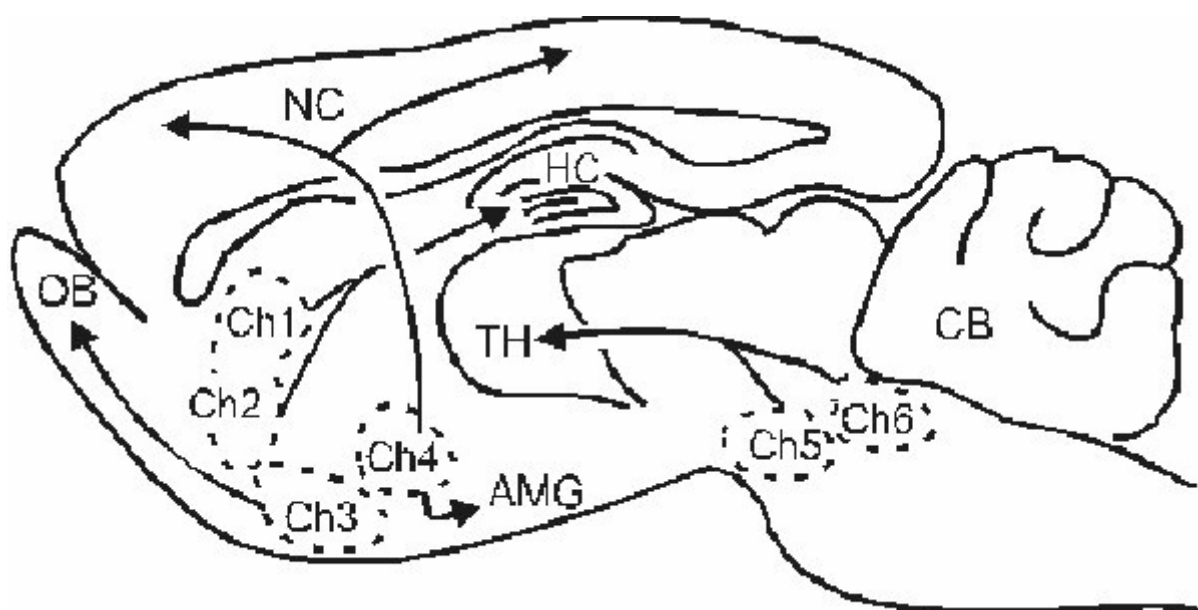


Obr. 5: Struktura lidského M_1 receptoru. Extracelulární segmenty jsou označeny jako o_1 - o_4 ; intracelulární jako i_1 - i_4 ; oranžově jsou označeny aminokyseliny, které jsou konzervované u M_1 - M_4 podtypů; černé šipky vyznačují aminokyseliny, které jsou zodpovědné za rozpoznání příslušného G-proteinu (převzato z <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/>).

2.4 Cholinergní systém v CNS

Cholinergní neurony centrálního nervového systému lze dělit do dvou skupin, na projekční neurony a interneurony. Projekční neurony jsou uloženy především v bazální části předního mozku a ve vyšších oblastech mozkového kmene, zatímco interneurony nalezneme v bazálních gangliích (nucleus caudatus, putamen, nucleus accumbens). V bazální části předního mozku jsou uloženy 4 základní oblasti (CH1 – CH4) cholinergních neuronů, které poskytují masivní inervaci telencefala, a tudíž se podílí na udržování pozornosti, paměti a emocích. Cholinergní neurony mediálního septálního jádra (CH1) a vertikální větve diagonálního Brocova svazku (CH2) zajišťují inervaci hipokampu (obr. 6). Horizontální větve diagonálního Brocova svazku (CH3) inervuje čichové váčky a cholinergní neurony nucleus basalis Meynerti (CH4) inervují některé části mozkové kůry. Konkrétně je to mediální korová oblast zahrnující gyrus cinguli (CH4am); frontoparietální kůra, operculární oblasti a amygdalu

(CH4al); laterodorzální, frontoparietální a peristriatální oblasti (CH4i); temporální a temporopolární oblasti (CH4p) (Mesulam 2004). Oblasti CH5 a CH6 leží v mozkovém kmeni, podílí se na inervaci thalamu a společně s CH1-CH4 tvoří retikulární aktivační systém (Mesulam a kol. 1983; Selden a kol. 1998; Schliebs a Arendt 2006). Cholinergní vlákna prostupují všemi vrstvami mozkové kůry a mají tedy vztah k chování a celkovému vědomí organismu. Pokusy s blokátorem muskarinových receptorů skopolaminem potvrdily spojitost cholinergní inervace s pamětí, kdy u lidí docházelo k jejímu zhoršení. Farmakologické experimenty na zvířatech prokázaly důležitost cholinergních neuronů v amygdale při konsolidaci paměti (Mesulam 2004).



Obr. 6: Cholinergní systém v mozku potkana. AMG (amygdala); OB (čichový lalok); CB (mozeček); HC (hipokampus); NC (neokortex); (převzato z www.uku.fi/neuro)

3. Patogeneze Alzheimerovy choroby

AD byla poprvé popsána německým neuropatologem a psychiatrem Aloisem Alzheimerem v roce 1907 (angl. překlad Alzheimer a kol. 1995). Od popsání AD uběhlo tedy více než 100 let. Během této doby byla formulována řada teorií o patogenezi AD. Příčiny onemocnění jsou dosud objasněné pouze u tzv. familiární (dědičné, časné) formy AD, kde jsou za vypuknutí choroby zodpovědné mutace v genech pro APP na chromozomu 21, presenilin 1 (PS1) na chromozomu 14 nebo presenilin 2 (PS2) na chromozomu 1 (Goate a kol. 1991; Chartier-Harlin a kol. 1991; Citron a kol. 1992; Schellenberg a kol. 1992; Haass a kol. 1995; Levy-Lahad a kol. 1995; Sherrington a kol. 1995). Dalším důkazem o klíčové roli APP při patogenezi AD je fakt, že všichni pacienti postižení Downovým syndromem (trisomie chromozomu 21) onemocní AD (Mann a Esiri 1989). U dědičných případů často dochází k projevům AD již ve středním věku. Avšak pouze 2 – 5 % všech případů AD je dědičná forma nemoci. Zbýlé případy tvoří tzv. sporadická (pozdní) forma AD, kde se příčiny stále hledají. Bylo zjištěno, že za vznik některých případů sporadické formy choroby (5 – 15 %) může být zodpovědný genetický polymorfismus, tedy součet nepříznivých genetických faktorů. V tomto ohledu se nejčastěji mluví o alele $\epsilon 4$ genu pro apolipoprotein E (ApoE) (Strittmatter a kol. 1993). Mezi další genetické predispozice patří polymorfizmy v genech pro $\alpha 2$ -makroglobulin (Blacker a kol. 1998), katepsin D (Papassotiropoulos a kol. 1999), katepsin G (Bhojak a kol. 2001), cystatin C (Deng a kol. 2001), protein spřažený s lipoproteinovým receptorem (Kamboh a kol. 1998), lipoproteinový receptor (VLDLR) (Okuiuzumi a kol. 1995), bleomycin hydrolázu (Montoya a kol. 1998) a další (přehled např. v Bird 2008). U převážné části (až 85%) všech případů AD však nebyly nalezeny žádné genetické podmíněné souvislosti. Ačkoliv mají sporadická a familiární forma AD různé příčiny, klinicky se projevují stejně. Rozdíl je však ve věku pacientů. Nástup dědičné AD nastává často již před 65. rokem života. Pozdní AD vypuká až po 65. roce.

Klinický projev AD spočívá ve zhoršujících se poruchách paměti, prostorové orientace a kognice. Mezi hlavní a typické patologické nálezy na mozcích pacientů s AD patří výskyt neuritických plaků a neurofibrilárních klubíček a to především v kůře a hipokampu. Neuritické amyloidní plaky jsou na počátku onemocnění popisovány jako amorfnní nefibrilární oblasti s vysokým obsahem $A\beta$, které lze prokázat pouze imunohistochemií. Tyto amorfnní plaky jsou tvořeny delší formou $A\beta_{1-42}$, která má lepší schopnost agregace než kratší forma $A\beta_{1-40}$ (Carter a Lippa 2001). V pozdějších fázích AD se tyto depozity metamorfují na vláknité a nerozpustné struktury (Glennner a Wong 1984) s obsahem kratší i delší formy $A\beta$. Postupem času a rozvojem nových metod byly identifikovány další složky, které jsou

v neuritických placích zastoupeny. Jedná se především o zbytky atrofovaných neuronů, aktivované buňky imunitního systému (mikroglie) a reaktivní astrocyty. Další nedílnou složkou plaků jsou zánětlivé proteiny (cytokiny, chemokiny, proteiny komplementu), proteiny extracelulární matrix (chondroitin, keratin), ionty kovů (Fe, Cu, Zn, Cr, atd.), proteázy (trypsin, lyzozomální peptidázy, ubiquitin, α_2 -makroglobulin), apolipoprotein E a další (Atwood a kol. 2002). Zdá se ale, že amyloidové plaky představují spíše méně aktivní formu amyloidu, která však může působit jako zásobárna škodlivých rozpustných oligomerických forem (Snyder a kol. 1994).

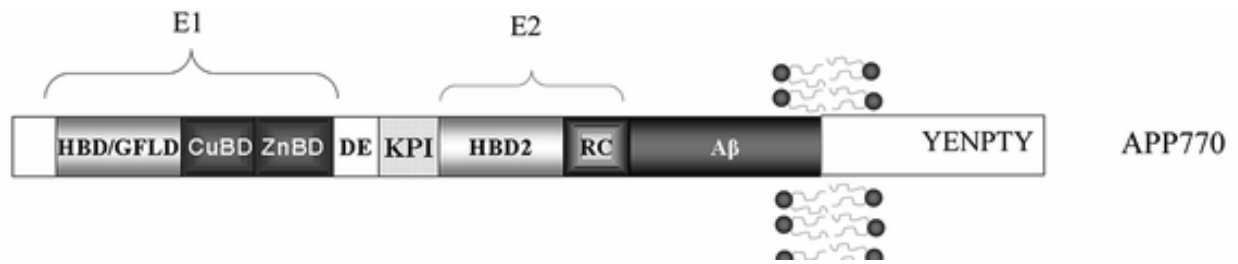
3.1 Protein prekurzor amyloidu a vznik β -amyloidu

Protein prekurzor amyloidu byl poprvé naklonován a popsán v roce 1987 (Kang a kol. 1987). V patogenezi AD je APP a jeho štěpný produkt $A\beta$ klíčovým proteinem a amyloidogenní štěpení APP stojí patrně na začátku celého procesu AD.

APP patří do rodiny transmembránových proteinů společně s proteiny podobnými APP (APP like proteins 1 a 2, APPLP1 a APPLP2) (Wasco a kol. 1992; Wasco a kol. 1993).

Sekvence kódující APP leží na genovém lokusu 21q21, je přibližně 240kb dlouhá (Yoshikai a kol. 1991) a obsahuje v sobě 18 dosud zjištěných exonů (Lamb a kol. 1993). Alternativním sestřihem mRNA dochází ke vzniku řady variant, které dávají vzniknout proteinu 356 – 770 aminokyselin dlouhému. Nejčastěji exprimované varianty jsou dlouhé 695, 751 a 770 aminokyselin (označení: APP695, APP751 a APP770). Varianty APP751 a APP 770 jsou exprimovány v různých tkáních, varianta APP695 především v neuronech (Sisodia a kol. 1993).

Tato rodina proteinů obsahuje 1 transmembránový úsek, dále dlouhý extracelulární N-konec a krátký intracelulární C-konec. Extracelulární úsek se obecně dělí na 2 domény E1 a E2, každá z nich lze rozdělit na další funkční subdomény (E1: heparin-vázající/růstovému faktoru podobná doména, měď vázající doména a zinek vázající doména; E2: jiný typ heparin-vázající/růstovému faktoru podobnou doménu, náhodně sbalená doména) (Gralle a Ferreira 2007; Jacobsen a Iverfeldt 2009). Za E2 doménou je úsek obsahující sekvenci $A\beta$, která je unikátní pro APP. Intracelulární část obsahuje internalizační signál (obr. 7).



Obr. 7: Struktura lidské varianty APP770. HBD (heparin vázající doména); GFLD (růstovému faktoru podobná doména); CuBD (měď vázající doména); ZnBD (zinek vázající doména); RC (náhodně sbalená doména); DE (kyselý motiv); KPI (doména inhibující proteázu Kunitzova typu); A β (β -amyloid); (upraveno podle Jacobsen a Iverfeldt, 2009)

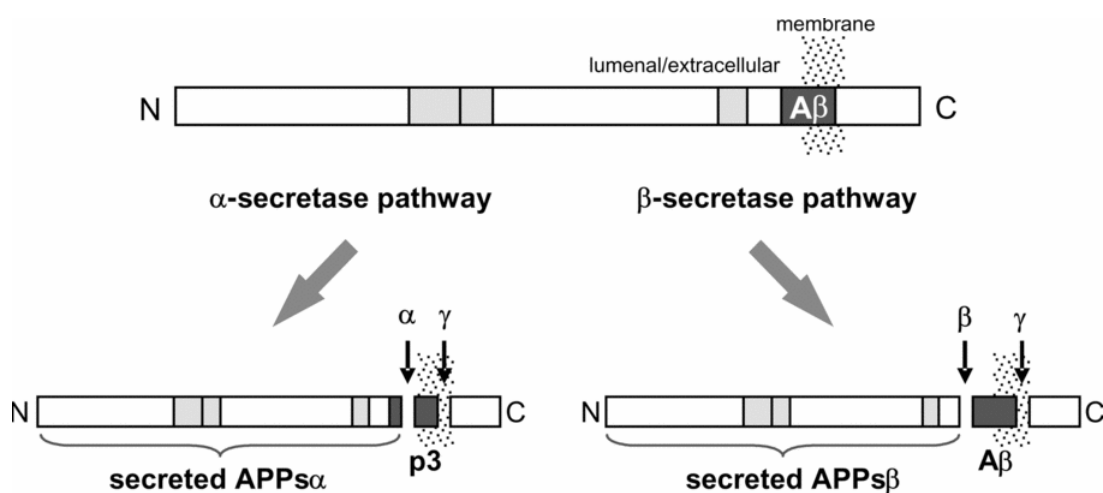
Hlavní role APP v organismu zůstává stále nejasná. Z hlediska množství možných izoform, bylo po řadě in-vivo a in-vitro experimentů popsáno několik funkcí, které APP zastává. Tyto studie shrnuje tvrzení, že APP může sloužit v buňkách zároveň jako receptor i jako ligand.

- Buněčná adheze – byla prokázána vazba APP na proteiny extracelulární matrix (laminin a heparin-sulfátové proteoglykany) (Narindrasorasak a kol. 1992). Rentgenová krystalografie odhalila schopnost extracelulární domény APP tvořit homodimery nebo případně vázat i příbuzné proteiny APPLP1 a 2 (Soba a kol. 2005).
- Neuronální vývoj – po stimulaci buněčných kultur APP a jeho rozstným proteolytickým produktem sAPP α (viz. níže) byl pozorován zvýšený růst axonu a jeho větvení. Ze závěru těchto experimentů vyplývá teorie, že APP zprostředkovává spojení mezi nervovým růstovým faktorem a vývojem neuronu (Milward a kol. 1992; Perez a kol. 1997).
- Synaptogeneze – in-vivo experimenty na potkanech, prokázaly vliv dalšího proteolytického produktu APP (sAPP, aminokyseliny 319-335) na zvýšenou tvorbu synapsí ve frontoparietální kůře a zároveň delší uchování paměťové stopy (Moya a kol. 1994).
- Vazba adaptorových proteinů – intracelulární část APP obsahuje aminokyselinový motiv YENPTY. Tento motiv může sloužit jako vazebné místo pro řadu vnitrobuněčných adaptorových proteinů (FE65, X11, JIP, Shc, Grb2, Dab1 a Numb). APP tedy může mít prostřednictvím těchto proteinů vliv na genovou expresi či MAP kinázovou dráhu (Jacobsen a Iverfeldt 2009).
- Obezita a hypoglykémie – u adipocytů obézních jedinců byla zjištěna zvýšená exprese APP, která korelovala s inzulinovou rezistencí (Lee a kol. 2008).

- Proteázová inhibice – ne-neuronální izoformy APP770 a APP751 obsahují ve své struktuře aminokyselinový motiv homologní k serin-proteázovému inhibitoru Kunitzova typu (Hynes a kol. 1990). Například u krevních destiček slouží APP jako inhibitor faktoru XIa v rámci krevní koagulační kaskády (Smith a kol. 1990).

Vyřazení genu pro APP u myši nemělo letální následky a ani nemělo vliv na jejich vývoj (Zheng a kol. 1996). U starších knock-out myší došlo k poruchám kognitivních schopností a dlouhodobé potenciace (long-term potentiation), reaktivní glióze, snížení váhy, úbytku některých synaptických proteinů (synaptofyzin a synapsin), poklesu exprese dendritického markeru (protein asociovaný s mikrotubuly 2) (Dawson a kol. 1999) a hypoglykémii (Needham a kol. 2008). U těchto myší byla pravděpodobně funkce APP nahrazena APPLP2 (Heber a kol. 2000).

Jak již bylo řečeno, APP podléhá proteolytickému štěpení. Toto štěpení se může ubírat dvěma směry, a to podle toho, zda A β vzniká či ne (obr. 8). Proteázy, které se na štěpení podílí, lze rozdělit do tří skupin, podle toho, kde APP štěpí. Na počátku neamyloidogenní dráhy stojí α -sekretáza. Ta štěpí APP v sekvenci pro A β , který poté již nemůže vzniknout. Produktem je solubilní sAPP α (Esch a kol. 1990). Mezi proteázy s α -sekretázovou aktivitou patří proteázy označené jako ADAM (a disintegrin and metalloproteinase family). Konkrétně ADAM9, ADAM10, ADAM17/TACE (Allinson a kol. 2003).



Obr. 8: Schéma proteolytického štěpení APP α / β sekretázovou dráhou a vznik A β ; (převzato z www.biochemsoctrans.org)

Amyloidogenní dráha je zahájena β -sekretázou, která štěpí APP dále od plazmatické membrány, za sekvencí pro A β . Vzniká kratší solubilní produkt sAPP β (Seubert a kol. 1993).

Proteiny s β -sekretázovou aktivitou se označují jako BACE (β -site APP-cleaving enzyme) a byly identifikovány dva: BACE 1 a 2 (Vassar a kol. 1999).

Enzym γ -sekretáza poté štěpí zbylý transmembránový segment, a to za vzniku krátkého p3 fragmentu (neamyloidogenní dráha) a A β fragmentu (amyloidogenní dráha) o délce 39-43 aminokyselin (Esler a Wolfe 2001). Již bylo dokázáno, že γ -sekretáza je komplex enzymů, který štěpí zbylou část APP přibližně uprostřed jeho TM části. Součástí proteolytického komplexu jsou proteiny:

- presenilin (PS1 nebo PS2), proteiny o 9TM doménách, které obsahují proteolytickou doménu (Yu a kol. 1998).
- nicastrin – jeho účast v γ -sekretázovém komplexu pravděpodobně spočívá ve vazbě C-konce APP a ovlivnění produkce A β (Yu a kol. 2000).
- APH-1 (anterior pharynx defective 1) a PEN-2 (presenilin enhancer-2), jejich role není dosud přesně objasněna, pravděpodobně slouží ke stabilizaci celého komplexu (Francis a kol. 2002).

Kromě APP štěpí γ -sekretáza další substrát. Jedná se o 1 TM protein Notch. Notch signalizace je evolučně velmi konzervovanou a podílí se především na buněčném vývoji, neurogenezi, axonálním růstu, synaptické plasticitě a dlouhodobé potenciaci (Woo a kol. 2009). Právě z důvodu podílu γ -sekretázy na další důležité signální kaskádě není možné použít její specifický inhibitor k prevenci či léčbě AD. Experimenty s tímto inhibitorem měli fatální vliv na vývoj experimentálních zvířat (Wong a kol. 2004).

3.2 Protein τ (tau)

Tau je vysoce rozpustný protein s řadou fosforylačních míst. Ve své struktuře obsahuje mikrotubuly vážící domény, které mu umožňují stabilizovat a podporovat polymeraci mikrotubulů v neuronální buňce a právě fosforylace těchto domén je důležitá při regulaci tvorby mikrotubulárních vláken. V buňkách se může τ protein vyskytovat ve dvou formách, které vznikají alternativním sestřihem (alternative splicing) pre-mRNA. Tyto formy se liší počtem domén vážících mikrotubuly – kratší forma má 3 domény (3R), delší pak 4 (4R) (Mandelkow a kol. 2007). Poměr těchto forem v buňkách zdravých jedinců je stejný, u tautopatií však narůstá podíl 4R formy. Mutace v genu či rozdíl v zastoupení jednotlivých forem nakonec vede k hyperfosforylaci τ a jeho následné agregaci. Hyperfosforylace brání vazbě mikrotubulů na τ protein a vede k destabilizaci neuronálního cytoskeletu. Agregovaný τ se shlukuje do útvarů známých jako párová helikální filamenta a následně do

neurofibrilárních klubíček. U zdravých buněk je τ uložen v axonech, po agregaci dochází k jeho dislokaci mimo axony do neuronálních těl a dendritů (Ballatore a kol. 2007).

3.3 β -amyloid a cholinergní neurotransmise

V pokročilých stádiích AD dochází v CNS k významnému poškození mnoha mediátorových systémů a neurodegenerativním procesům, což vede k poruchám paměťových a kognitivních schopností. V současné době je za příčinu AD nejčastěji považováno hromadění fragmentů $A\beta$ a postupný vznik rozpustných oligomerů, amorfního amyloidu a amyloidních plaků v CNS a jejich toxické působení na různé neurotransmitterové systémy i nenervové buňky (amyloidová hypotéza) (Hardy 2009). Mezi známé příčiny zvýšení tvorby $A\beta$ a propuknutí AD patří již zmíněné genetické predispozice u hereditárních forem onemocnění. U sporadických forem není příčina jasná a bývá spojována s předchozím závažným poraněním hlavy, poruchami funkce štítné žlázy, vystavení vysokým koncentracím hliníku v potravě a obecně s nevhodnou potravou a stylem života. Otázky, které si vědci kladou, se týkají prvotní příčiny zvýšené tvorby $A\beta$ u sporadických forem onemocnění a patogenetických dějů, které vedou k manifestaci onemocnění. Do dnešní doby byla formulována řada hypotéz, které se pokouší počátek AD vysvětlit.

Ani řada experimentů, prokazujících toxické působení $A\beta$ na buňky, tkáň a živé organizmy, nepodala přesvědčivý důkaz o mechanismu jeho patologického působení. Avšak silným důkazem hlavní úlohy $A\beta$ v patogenezi AD potvrzuje fakt, že mutace podmiňující dědičnou formu nemoci souvisí přímo s metabolismem APP. Jednou z hypotéz, která se zabývá vazbou mezi zvýšenou tvorbou $A\beta$ a rozvojem onemocnění je tzv. „cholinergní hypotéza“.

Cholinergní hypotéza patogeneze AD byla formulována Raymondem T. Bartusem a jeho kolegy v roce 1982 (Bartus a kol. 1982). Tato hypotéza vidí jako prvotní příčinu projevu AD poškození cholinergního systému v CNS. Tvrzení je podporováno řadou klinických nálezů, při kterých byl pozorován rozvrat metabolismu ACh v mozcích pacientů s AD (Bowen a kol. 1976; Perry a kol. 1977; Francis a kol. 1985). Do dnes je však nejasné, proč je nejvíce a vždy poškozen právě cholinergní systém (Dolezal a Kasparova 2003).

Hledání vazby mezi poškozením cholinergního systému a $A\beta$ zahrnuje zkoumání jeho vlivu na proteiny metabolismu ACh stejně tak jako na životaschopnost celých neuronů. Experimenty prováděné s exogenním rozpustným $A\beta$ na různých modelech AD či buněčných kulturách prokázaly pokles v uvolňování ACh (Kar a kol. 1996), pokles intracelulárního ACh, sníženou aktivitu ChAT a pyruvát dehydrogenázy, poruchy v muskarinové transmisi a defekt

vysokoafiního systému pro transport cholinu do neuronu (Auld a kol. 1998; Kar a kol. 1998). Studie Wonga a kol. prokázala u transgenních myší vliv endogenního A β na reorganizaci cholinergního systému. V hipokampu a frontální kůře došlo k redukci hustoty a velikosti synapsí (Wong a kol. 1999). Nedávné pokusy prokázaly v mozkové kůře u transgenních myší presynaptické i postsynaptické poškození, která objevují výrazně dříve než behaviorální změny (Machova a kol. 2008; Machova a kol. 2010).

Mozky lidských pacientů vykazují také sníženou aktivitu ChAT korelující s kognitivními poruchami (Davies a Maloney 1976) a signifikantní ztrátu cholinergní inervace v předním mozku (Whitehouse a kol. 1982). Řada výzkumných skupin potvrdila úbytek $\alpha 4$ a $\alpha 7$ podjednotek nAChR v postižených mozcích (Teaktong a kol. 2004). Nejvýraznější ztráta cholinergní inervace u pacientů s AD spadá do regionu temporálních laloků a oblastí asociovaných s těmito laloky. Na druhou stranu další korové oblasti nevykazují výrazný pokles cholinergních vláken. Snížení inervace korových oblastí je následkem ztráty projekčních cholinergních neuronů v nucleus basalis Meynerti přičemž interneurony ve striatu a thalamu zůstává téměř beze změny (Geula a Mesulam 1996).

3.4 Alzheimerova choroba a diabetes mellitus

Na myšlenku propojení AD a cukrovky přivedly vědce experimenty na zvířatech s poruchou v insulinové signalizaci. Poškozená insulinová signalizace měla za následek poruchy v chování a paměti podobné poruchám, které se objevují při poškození cholinergního CNS systému. Insulinový systém hraje důležitou roli v kognitivních oblastech mozku, při jeho poškození dochází k paměťovým deficitům a může vyústit až v AD (Mayer a kol. 1990). V mozcích pacientů se sporadickou formou AD byla zjištěna zvýšená exprese insulinového receptoru, avšak jeho kinázová aktivita byla signifikantně redukována (Frolich a kol. 1999). Ve shodě s těmito výsledky, u pacientů se sporadickou AD byla také zjištěna zhoršená utilizace glukózy nervovými buňkami. Tato zjištění vedla k formulaci hypotézy hovořící o Alzheimerově chorobě jako o diabetu „mozkového typu“ (Hoyer 1998).

3.5 Strategie léčby Alzheimerovy choroby

Cholinergní hypotéza vede vědce k léčebným strategiím, které podporují cholinergní transmisi. Patří sem především inhibice AChE a příprava specifických ligandů pro muskarinové a nikotinové receptory. Inhibitory AChE, které zajistí delší přítomnost ACh v synaptické štěrbině, patří dnes k nejvíce užívaným prostředkům při léčbě AD (Geerts a Grossberg 2006). Mezi užívané inhibitory AChE patří donepezil, galantamin a rivastigmin.

Alkaloid ze sněženky (*Galanthus woronowii*), galantamin, nejenže přímo inhibuje AChE, ale zároveň i funguje jako allosterický modulátor ACh receptorů obou typů a stimuluje tak výlev ACh (Jones 2003).

Modulace receptorů pro ACh je další možnou cestou podpory selhávajícího cholinergního systému. U zvířat i člověka měl nikotin a další agonisté nAChR pozitivní vliv na řešení paměťových úkolů. Nebezpečí spojené s užíváním nikotinu spočívá v jeho dosud nepopsaných chronických účincích (White a Levin 1999). Slibné jsou také pokusy s modulátory mAChR. U zvířecích modelů AD vedlo použití M₁ agonistů ke zlepšení kognitivních schopností (Avery a kol. 1997).

V dnešní době jediné schválené medikamenty pro léčbu AD zahrnují látky, které podporují deficitní cholinergní neurotransmisys a účinně tak zpomalují progresivní dopad neurodegenerace. Cholinergní systém v CNS však není při AD postižen stejně a tyto látky ani nemají selektivitu pro centrální nervový systém či pro určitý typ acetylcholinových receptorů. Proto mají tyto látky též řadu vedlejších účinků.

Velké naděje se dnes vkládají do odlišné strategie léčby AD. K redukci amyloidních plaků by mohla přispět aktivní imunizace agregovaným β -amyloidem nebo pasivní imunizace protilátkami proti A β (Foster a kol. 2009). Oba typy imunoterapie se ukázaly účinné u zvířecích modelů AD. Klinické testování aktivní imunizace u člověka muselo být přerušeno pro výskyt meningoencefalitidy u některých pacientů. Někteří pacienti však vykazovali určité klinické zlepšení (Hock a kol. 2003; Gilman a kol. 2005). Řada aktivních i pasivních protilátek se v současné době testuje a zjišťuje se jejich léčebný efekt (Vasilevko a Cribbs 2006).

4. Zvířecí modely Alzheimerovy nemoci

Do dnešní doby byl popsán a prováděn výzkum na celé řadě modelových organizmů, které vykazují kognitivní, behaviorální a neuropatologické příznaky AD. Cesta při hledání vhodného zvířecího modelu AD vedla od bezobratlých octomilek až k obratlovcům jako jsou psi či lední medvědi (Tekirian a kol. 1996). I přes řadu nevýhod, které modelová zvířata nesou, jsou nezbytnou součástí celého výzkumu AD a bez jejich přispění by se výzkum významně zpomalil nebo zastavil.

Z hlediska kvalitního a progresivního výzkumu existuje několik kritérií, které by měl vhodný model splňovat. V první řadě je to krátký životní cyklus, kdy se případné symptomy projevují v krátké časové periodě. Dále se jedná především o krátkou dobu březosti a velké množství potomků. Tato podmínka následně zajistí dostatečný přísun jedinců do experimentu. V úvahu se bere také experimentální potenciál daného modelu z hlediska jeho konstruktivní, fenomenologické a prediktivní validity (tj. do jaké míry se shodují výsledky s teorií, zda daný model správně modeluje projevy onemocnění a jestli lze předvídat a vztahovat vlastnosti modelu na lidi).

První zvířecí modely senilní demence se objevili již v druhé polovině 20. stol. Jednalo se o staré jedince psů a opic, kteří vykazovali přítomnost senilních plaků. V 80. letech již byly popsány druhy nejen s amyloidními plaky (staří psi, medvědi, primáti) (Selkoe a kol. 1987), ale i s přítomností neurofibrilárních klubíček (staré ovce, medvědi, paviáni) (Cork a kol. 1988). Tyto symptomy se však u těchto druhů objevují spontánně a s malou pravděpodobností. To vedlo vědce k přípravě zvířecích modelů pomocí genetických, biochemických, dietních či chirurgických technik.

4.1 Bezobratlí

Zvířecí model s dlouhou a rozsáhlou historií genetického nástroje je octomilka (*Drosophila melanogaster*). Mozek octomilky sice obsahuje podstatně méně neuronů než lidský a jeho stavba je také velmi odlišná, ale buněčná fyziologie a organizace neurotransmiterových systémů u octomilky je lidské dostatečně podobná. Iijima a kol. vyvinuli transgenní druh octomilky, který ve své nervové soustavě exprimuje lidský A β ₄₂, což u ní vede k poruchám krátkodobé paměti a neurodegeneraci (Iijima a Iijima-Ando 2008).

Další model AD je háďátka obecné (*Caenorhabditis elegans*). Pro lepší charakterizaci tautopatií Kraemer a kol. vnesli mutovaný lidský gen pro τ protein do genomu háďátka. U transgenních jedinců docházelo k nekoordinovaným pohybům (u háďátek projev poškozeného

nervového systému) způsobených akumulací hyperfosforylovaných forem proteinu τ (Kraemer a kol. 2003).

4.2 Obratlovci

Nejčastěji používaní obratlovci v modelaci AD jsou myš domácí (*Mus musculus*), potkan obecný (*Rattus norvegicus*), králík domácí (*Oryctolagus cuniculus* f. *domesticus*), psi a primáti. Byla připravena řada transgenních linií, které více či méně modelovaly symptomy a patologii AD. Jedná se především o linie, které vykazují zvýšenou tvorbu $A\beta$ v důsledku zvýšené exprese přirozeného nebo mutovaného genu pro APP nebo mutovaných genů presenilin 1 a presenilin 2, a dále takové, které exprimují mutované geny pro protein τ nebo ApoE. Pro přípravu netransgenních jedinců, kteří také vykazují některé symptomy AD, existuje řada technik, kam patří neurochirurgické zákroky, chemická indukce mozkových lézí jako je například injekce $A\beta$, nebo navození patologických změn dietou. Jak je zmíněno výše, některé organizmy vykazují spontánní příznaky AD. Zajímavým modelem je Maki trpasličí (*Microcebus murinus*). Asi 20% starých jedinců trpí rozsáhlým ukládáním $A\beta$, tautopatií, ztrátou cholinergních neuronů a masivní mozkovou atrofií (Bons a kol. 2006). Tito jedinci ztrácejí poznávací schopnosti a narušují sociální vazby. Popsané vlastnosti jsou velmi podobné lidským symptomům AD.

Ve svých experimentech jsem pracoval s tkání transgenní myší linie označované jako APP^{swe}/PS1^{dE9}. Tyto myši nesou dvě mutace: tzv. švédskou mutaci v genu pro APP a lidský PS1 gen s delecí exonu 9. Linie byla založena v Baltimorské Univerzitě Johna Hopkinse (USA) v roce 2001, a dále udržována na Univerzitě v Kuopiu (Finsko). Mozek těchto myší vykazuje již v časném věku života (5.-6. měsíc) počínající přítomnost amyloidních plaků způsobenou nadprodukcí $A\beta_{1-42}$ fragmentů, ne však přítomnost neurofibrilárních klubíček (Jankowsky a kol. 2001; Jankowsky a kol. 2004). Behaviorální pokusy potvrdily poruchy prostorové a epizodické paměti u těchto zvířat, ale až v 12. měsíci věku (Savonenko a kol. 2005). U sedmiměsíčních jedinců však již dochází v mozkové kůře k poruchám na synapsích cholinergního systému v porovnání s netransgenními myšmi ze stejného vrhu. Tyto poruchy zahrnují snížené množství VAcHT (snížená vazba radioaktivně značeného vesamikolu), úbytek muskarinových receptorů (snížená vazba N-methyl skopolaminu), sníženou aktivitu butyrylcholinesterázy a zhoršené funkční spřahování G proteinů s mAChR (Machova a kol. 2008). Transgenní APP^{swe}/PS1^{dE9} myši ve věku 5–6 měsíců měli také snížené uvolňování ACh z korové a hipokampální tkáně (Machova a kol. 2010).

Cíle diplomové práce

Cílem mé diplomové práce bylo zavést a optimalizovat metody molekulární biologie (izolace RNA z tkáně, PCR, qPCR, návrh specifických primerů). Pomocí těchto metod následně stanovit hladinu mRNA pro proteiny cholinergního genového místa (ChAT, VACHT) a všech pěti podtypů muskarinových receptorů ($M_1 - M_5$) v myší mozkové kůře transgenního kmene APP^{swe}/PS1^{dE9} a porovnat je s kontrolními vzorky od myší ze stejného vrhu.

Materiál a metody

Vzorky

Vzorky pochází od samic APP^{swe}/PS1^{dE9} transgenních myší ve stáří 6-7 měsíců. Celkově se jednalo o 5 párů transgenních a normálních jedinců ze stejného vrhu. Usmrcené myši byl vyňat mozek a odpreparováno přibližně 15mg mozkové kůry. Vzorek byl umístěn do mikrozkušavky s roztokem inhibujícím RNázy RNAlater (Ambion) a zamražen na -80°C . Celá tato procedura proběhla na finské univerzitě v Kuopiu. Vzorky byly poté zaslány do ČR.

Izolace RNA

K izolaci veškeré RNA jsme postupně vyzkoušeli 3 komerčně dodávané soupravy - TriPure Isolation Reagent (Roche), RNAwiz (Ambion) a High Pure RNA Tissue Kit (Roche). Pro izolaci RNA ze vzorků jsme nakonec vybrali TriPure Isolation Reagent (Roche) z důvodu nejvyšší výtěžnosti RNA o vysoké čistotě. Množství izolované RNA bylo stanoveno spektrofotometrem NanoDrop. Vzorky RNA byly zamraženy na -80°C .

Reverzní transkripce

Pro následné kroky bylo třeba izolovanou RNA přepsat na cDNA. K přepisu jsme použili M-MLV reverzní transkriptázu (Promega) a jako její očko kotvené oligo T nukleotidy – Oligo(dT) Anchored (Sigma).

Reakce probíhala v konečném objemu 25 μl . Nejdříve byla směs RNA, Oligo(dT) a vody ohřáta na 70°C po dobu 5 minut. Poté byl přidán reakční pufr, dNTPmix a reverzní transkriptáza. Přepis probíhal po dobu 60 minut při teplotě 42°C . Enzym byl následně zničen teplotou 72°C po dobu 10 minut.

Z důvodů uniformity vzorků byl do reakce použit 1 μg RNA.

Reakční schéma reverz. transkripce:	celkový objem 25 μl
1. 70°C 5 min	RNA 1 μg
	H ₂ O kalkulace na celkový objem
	Oligo(dT) 2 μl

2. 42°C 60 min	dNTPmix 1,25 μl
	Reakční pufr 5 μl
	enzym 1 μl
3. 72°C 10 min	

Získaná cDNA byla zamražena na -20°C .

Primery

Navrhování primerů jsme provedli v programu PrimerSelect z balíku programů pro molekulární biologii LaserGene (DNASar). Sekvence genů jsme stáhli z internetové databáze www.ncbi.nlm.nih.gov. Při navrhování primerů jsme se drželi několika základních kritérií:

- 1) délka 17 - 24 bazí
- 2) teplota nasedání co nejbliže 60°C pro oba oligonukleotidy
- 3) co nejmenší rozdíl teplot nasedání páru primerů
- 4) umístění blízko polyA konce genu
- 5) sekvence primerů unikátní pro daný gen a druh (potvrzeno blastováním sekvence v internetové databázi www.ncbi.nlm.nih.gov)
- 6) obsah 50 – 60% GC párů
- 7) zabránění tvorbě sekundárních struktur a párování
- 8) délka PCR produktu 150 – 350 bp

Dodané oligonukleotidy jsme naředili na koncentraci 100 pmol/μl. Sekvence mRNA a místa nasedání primerů jsou uvedeny v příloze.

Sekvence použitých primerů a délka PCR produktu:

ChAT

upper 22: GGTGGGAGCGAGCCTTGTTGAC

lower 24: GGGGGATGGGAGCAGGGTTAGTAG

178bp

VACHT

upper 24: ATCCTTCGCGCCCTTAGTGGTCTC

lower 19: CCCTGCGGCGGTTTCATCAA

342bp

M₁

upper 21: CTCACCGGGGTCCTGCTATGC

lower 22: TGCCTGGACACTCTTCAAACC

321bp

M₂

upper 22: CCATCCCGGGAAAAGAAAGTGA

lower 22: TGAAGGTGGCGTTACAAAGTGC

208bp

M₃

upper 24: AGAAGAAGGCCGCCAGACTCA

lower 24: ACAGGGCATAGCACACGGGGTTCA

183bp

M₄

upper 19: GTAGGCGGCCCACTCTGA

lower 24: AGCCATCGTCCCCCATCTTCCTGA

198bp

M₅

upper 21: ACCGCCATTGCCGCTTTCTAT

lower 24: TTCCCGTTGTTGAGGTGCTTCTA

260bp

GAPDH

upper 19: GAACATCATCCCTGCATCC

lower 20: GTCTCACCACCTTCTTGATG

179bp

PCR (polymerázová řetězová reakce)

Klasickou PCR jsme prováděli na cycleru DNA Engine (DYAD) v celkovém objemu 100 μ l. Použili jsme HotStarTaq DNA Polymerase kit (Qiagen). První krok (95°C po dobu 15 minut) aktivoval polymerázu. Následně došlo k cyklování (kroky 2-4) celkem 45 krát. Poslední krok (72°C po dobu 10 minut) slouží k dosyntetizování nedokončených fragmentů.

Reakční schéma PCR:		total 100 μ l	
1. 95°C	15 min	Reakční pufr	10 μ l
2. 94°C	0,5 min	MgCl ₂	4 μ l
3. 58°C	0,5 min	dNTPmix	2 μ l
4. 72°C	1 min	enzym	0,5 μ l
5. 72°C	10 min	H ₂ O	78 μ l
		primery 100 pmol/ μ l	2x 0,25 μ l
		cDNAmix	5 μ l

Elektroforéza

Elektroforézu DNA jsme prováděli v 1,5% agarozovém gelu a TBE (Tris/borát/EDTA) pufru. Jako zdroj napětí jsme používali Power Pack (BIO RAD). Foréza probíhala při napětí 100 V a proudu 400 mA po dobu přibližně 2 hod. Gel jsme následně barvili v roztoku ethidium bromidu a analyzovali na přístroji BioDocAnalyze (Biometra).

Na izolaci DNA fragmentů z gelu jsme použili QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) a množství DNA jsme stanovili na spektrofotometru NanoDrop.

Kvantitativní PCR

Kvantitativní PCR (qPCR, real-time PCR) je metoda založená na měření vzrůstající či klesající fluorescence v jednotlivých vzorcích během polymerázové řetězové reakce. V našem případě jsme používali Roche Light Cycler Capillary System (Roche) a jako soupravu s fluorescenčním činidlem QuantiTect SYBRGreen PCR kit (Qiagen). Barva SYBRGreen má tu vlastnost, že po navázání na dsDNA změní své fluorescenční vlastnosti a tuto změnu lze snímat fotocitlivým čidlem přístroje.

Tato metoda je určena ke kvantitativnímu, velmi přesnému a citlivému stanovení množství cDNA ve vzorku. Citlivost qPCR je tak vysoká, že lze zachytit i jedinou cDNA molekulu daného typu ve vzorku. Označení real-time PCR vychází z možnosti pozorovat nárůst/úbytek fluorescence (a tedy i přibývajícím množství DNA) v reálném čase.

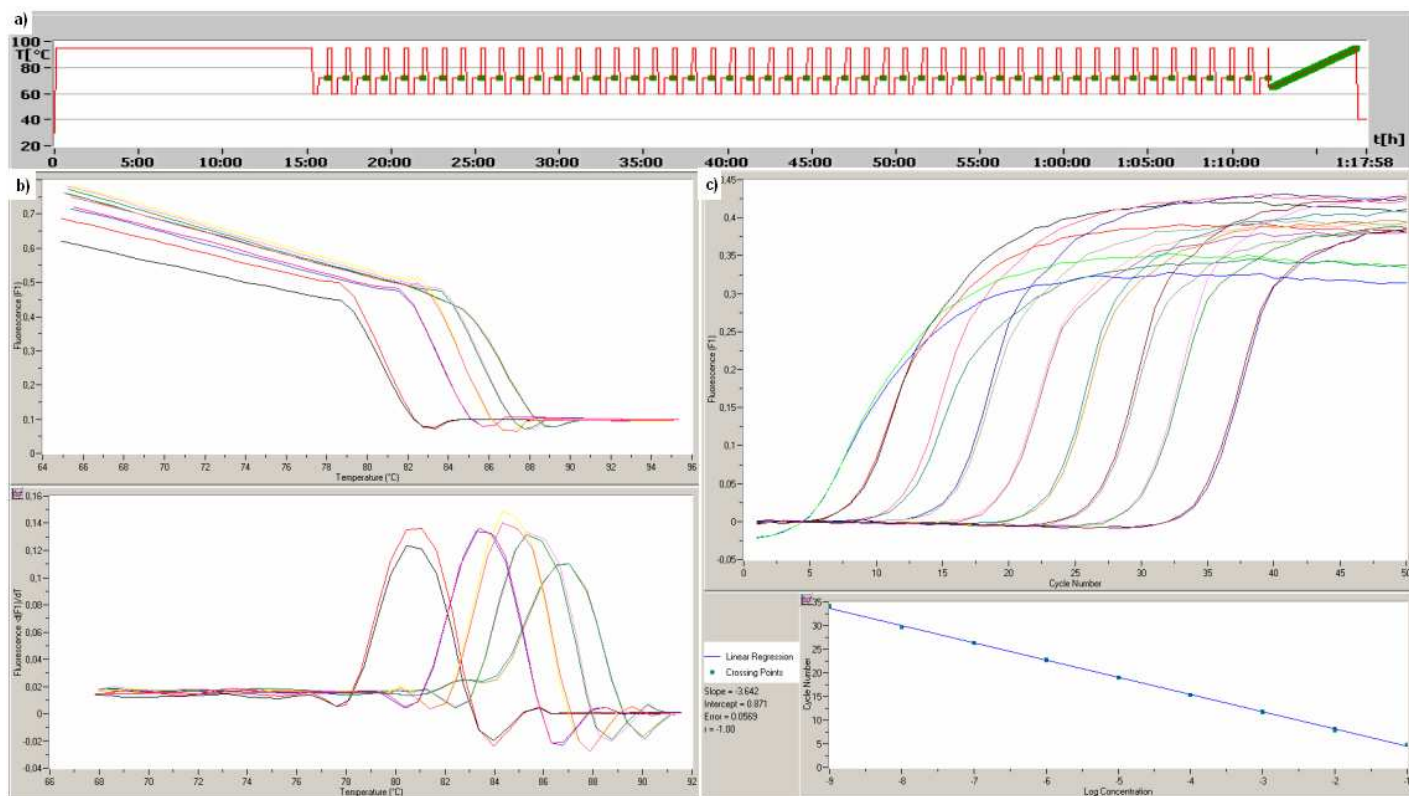
Na počátku experimentu byly vzorky zahřáty na 95°C po dobu 15 minut a došlo k aktivaci polymerázy. Následně bylo provedeno 50 cyklů (kroky 2-4; Obr. 9a). Následovala denaturační analýza. Během denaturační analýzy dochází k tání dsDNA a tedy k úbytku fluorescence. Tímto postupem lze stanovit teplotní bod, kdy dojde k denaturaci vzniklého fragmentu a lze odhalit případnou kontaminaci vzorků (Obr. 9b).

Reakční schéma qPCR:

1. 95°C 15min
2. 95°C 15s
3. 60°C 20s
4. 72°C 30s
5. 95°C

total 10 μ l

- | | |
|-------------------------|----------------|
| Reakční směs | 5 μ l |
| H ₂ O | 3,5 μ l |
| primery 10pmol/ μ l | 2x 0,5 μ l |
| cDNA mix | 0,5 μ l |



Obr. 9: Protokol zobrazující teplotní průběh během qPCR. Zeleně jsou označeny pozice snímání fluorescence – vždy na konci polymerační části cyklu a na závěr experimentu během denaturační analýzy (a); denaturační analýza různých fragmentů DNA (b); kalibrační měření a sestavená kalibrační přímka (c).

Vyhodnocení dat

Výsledky byly hodnoceny pomocí softwareového modulu LightCycler Data Analysis (Roche). Získaná data byla pro přehlednost importována do tabulkového editoru Excel (Microsoft). Statistické výpočty a vynesení do grafů proběhlo v programu GraphPad Prism 5 (GraphPad Software).

Základní hodnoty pro jednotlivé vzorky vychází z počtu cyklů, kterými musí vzorek projít, než je dosaženo prahové (tzv. threshold) fluorescence. Tato základní hodnota je tedy udávána v počtech cyklů, následně byla přepočítána na relativní koncentraci.

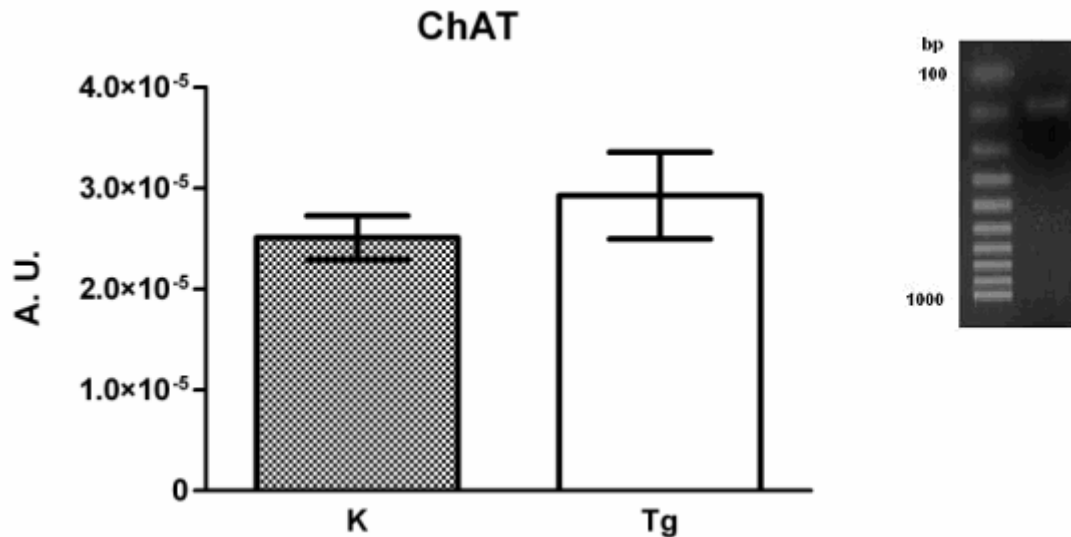
Kvantitativnímu stanovení exprese jednotlivých genů pomocí real-time PCR předcházela kalibrace pro daný genový fragment. Pomocí klasické PCR jsme namnožili

genový úsek DNA užitím specifických primerů. PCR směs jsme umístili na agarozový gel a nechali proběhnout elektroforézu. Z gelu jsme poté příslušný fragment izolovali. Fragment byl naředěn do kalibrační řady $1^{-1} - 1^{-10}$ a celá řada byla poté proměřena pomocí qPCR. Z těchto dat jsme sestavili kalibrační přímkou (Obr. 9c), která následně sloužila k přesnému stanovení exprese příslušného genu. Hodnoty koncentrace fragmentu byly zadávány pouze relativně v rámci ředící řady.

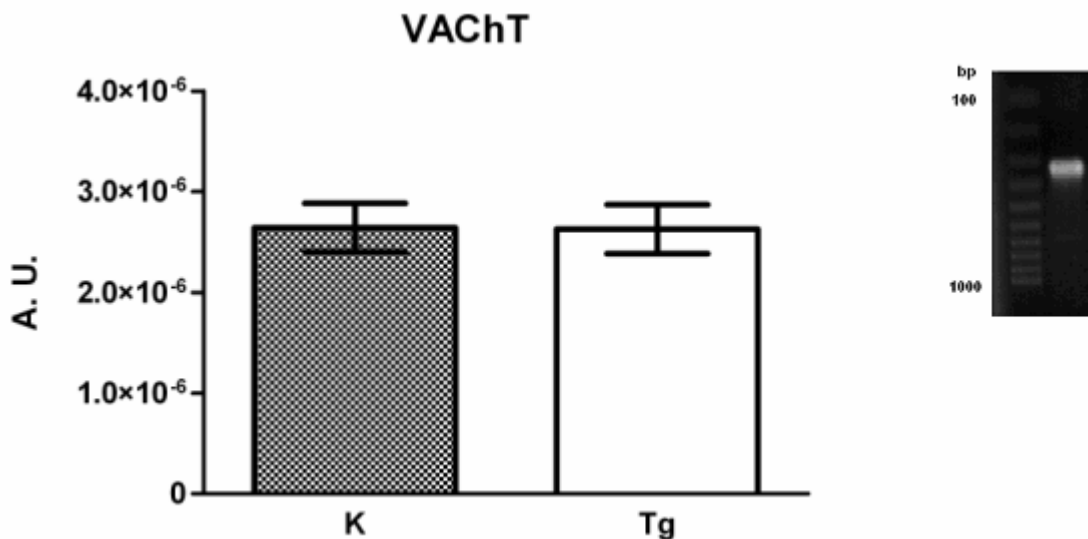
Pro vzájemné porovnání jednotlivých vzorků mezi sebou bylo nutné změřit expresi tzv. housekeeping genu (jedná se o gen, u kterého se předpokládá stejná míra exprese ve všech typech buněk). V našem případě se jednalo o glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenázu (GAPDH). Výsledná hodnota, ve které je vyjádřena míra exprese daných genů, je tedy poměr zjištěných hodnot – sledovaný gen ku housekeeping gen. Výsledky jsou poté uváděny v poměrných (arbitrárních) jednotkách (A.U.).

Výsledky

Exprese genů cholinergního místa

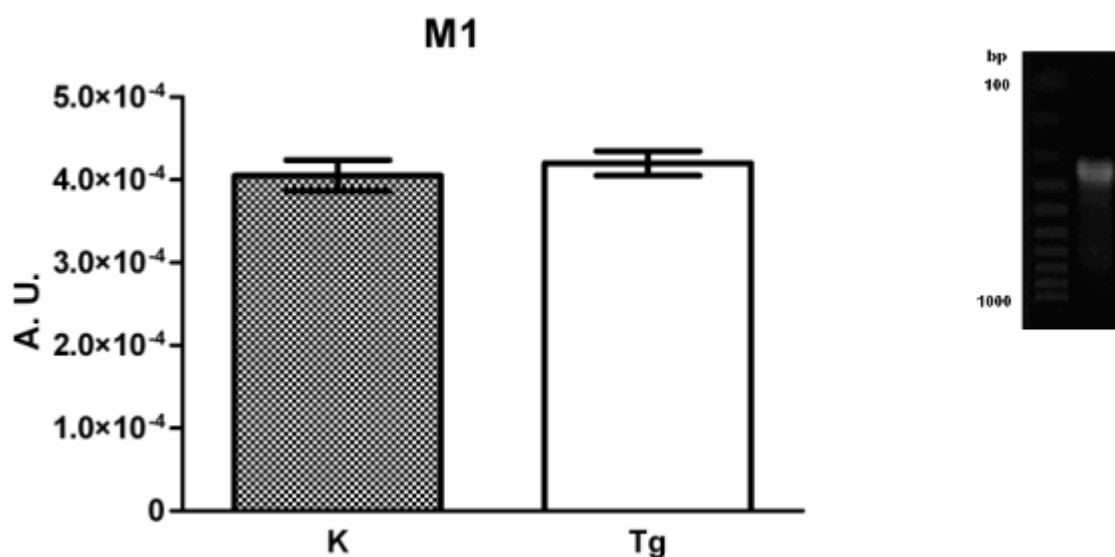


Graf 1: Porovnání množství mRNA genu ChAT u kontrolních (K) a transgenních (Tg) myší. Výsledky jsou uvedeny v poměrných jednotkách (A.U.) \pm SEM. Měření bylo provedeno v duplikátech na vzorcích od pěti myších párů (transgenní jedinec a kontrolní jedinec ze stejného vrhu). Zobrazen také DNA fragment na agarozovém gelu.

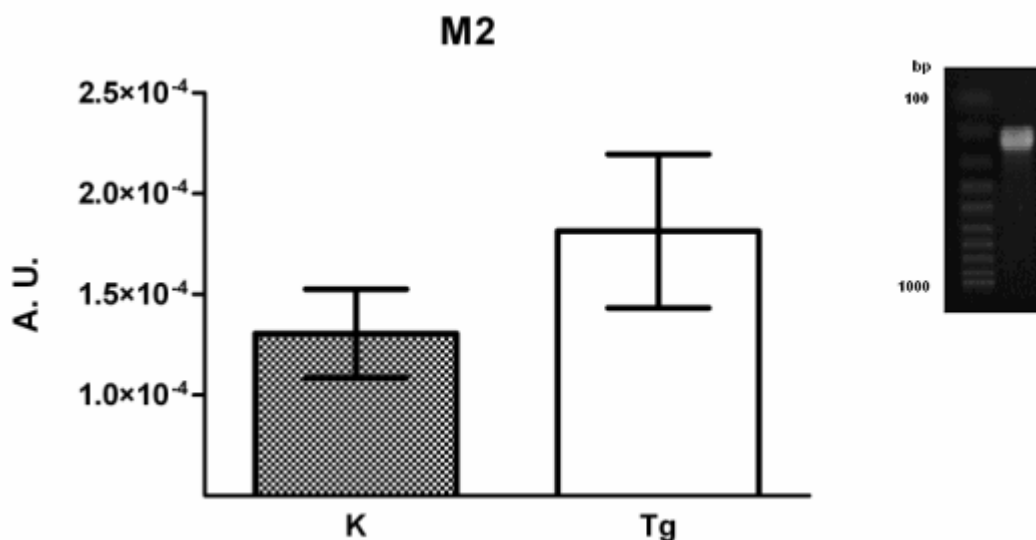


Graf 2: Porovnání množství mRNA genu VACHT u kontrolních (K) a transgenních (Tg) myší. Výsledky jsou uvedeny v poměrných jednotkách (A.U.) \pm SEM. Měření bylo provedeno v duplikátech na vzorcích od pěti myších párů (transgenní jedinec a kontrolní jedinec ze stejného vrhu). Zobrazen také DNA fragment na agarozovém gelu.

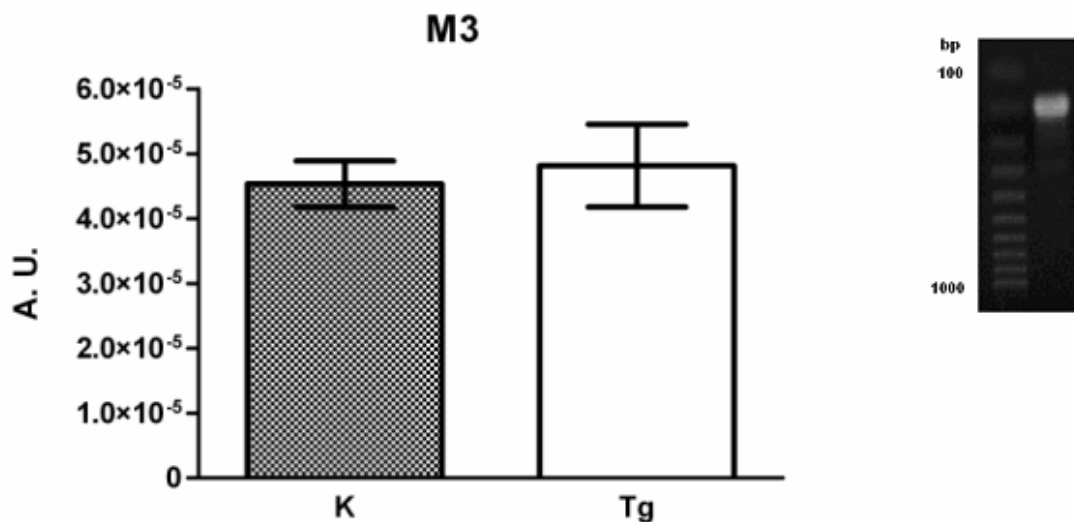
Exprese muskarinových receptorů



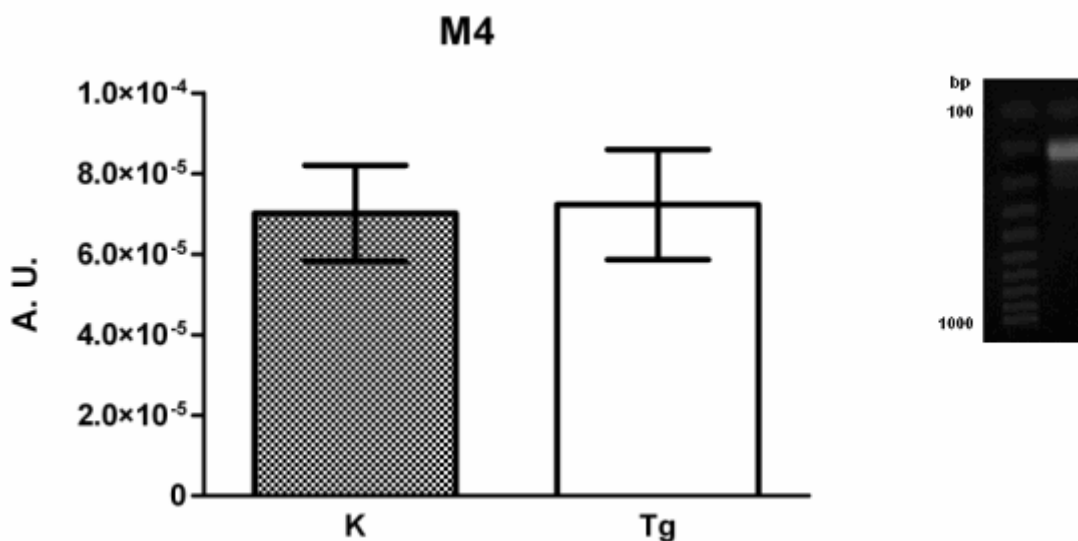
Graf 3: Porovnání množství mRNA genu pro M_1 podtyp muskarinového receptoru u kontrolních (K) a transgenních (Tg) myší. Výsledky jsou uvedeny v poměrných jednotkách (A.U.) \pm SEM. Měření bylo provedeno v duplikátech na vzorcích od pěti myších párů (transgenní jedinec a kontrolní jedinec ze stejného vrhu). Zobrazen také DNA fragment na agarozovém gelu.



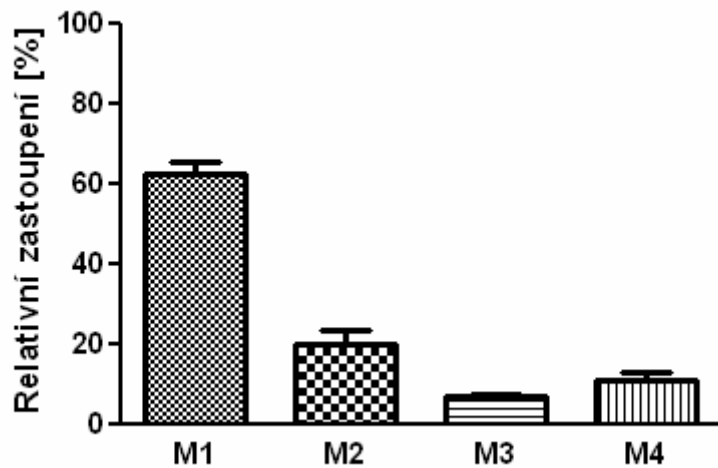
Graf 4: Porovnání množství mRNA genu pro M_2 podtyp muskarinového receptoru u kontrolních (K) a transgenních (Tg) myší. Výsledky jsou uvedeny v poměrných jednotkách (A.U.) \pm SEM. Měření bylo provedeno v duplikátech na vzorcích od pěti myších párů (transgenní jedinec a kontrolní jedinec ze stejného vrhu). Zobrazen také DNA fragment na agarozovém gelu.



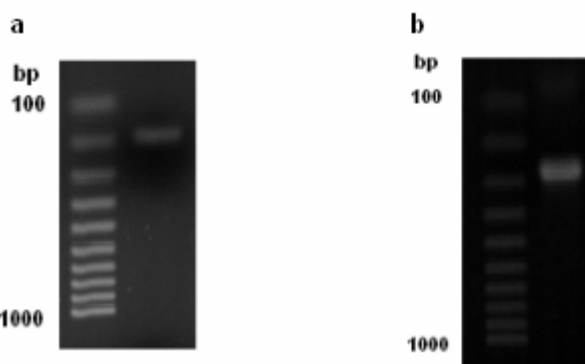
Graf 5: Porovnání množství mRNA genu pro M₃ podtyp muskarinového receptoru u kontrolních (K) a transgenních myší (Tg). Výsledky jsou uvedeny v poměrných jednotkách (A.U.) ± SEM. Měření bylo provedeno v duplikátech na vzorcích od pěti myších párů (transgenní jedinec a kontrolní jedinec ze stejného vrhu). Zobrazen také DNA fragment na agarozovém gelu.



Graf 6: Porovnání množství mRNA genu pro M₄ podtyp muskarinového receptoru u kontrolních (K) a transgenních (Tg) myší. Výsledky jsou uvedeny v poměrných jednotkách (A.U.) ± SEM. Měření bylo provedeno v duplikátech na vzorcích od pěti myších párů (transgenní jedinec a kontrolní jedinec ze stejného vrhu). Zobrazen také DNA fragment na agarozovém gelu.



Graf 7: Relativní zastoupení mRNA jednotlivých podtypů muskarinových receptorů v myší mozkové kůře, udáno v procentech \pm SEM. Měření bylo provedeno v duplikátech na vzorcích od 5 jedinců.



Obr. 10: Fragментy DNA pro GAPDH (a) a M₅ podtyp muskarinového receptoru (b) na agarozovém gelu.

Diskuze

Výsledky našich pokusů ukazují, že u sedmiměsíčních samic transgenních APP^{swe}/PS1^{dE9} myši nedochází ke změně exprese (hladin mRNA) ani jednotlivých genů cholinergního genového místa (Grafy 1 a 2) ani genů pro M₁-M₄ podtyp muskarinových receptorů (Grafy 3-6). Ačkoliv jsme pomocí PCR detekovali mRNA pro podtyp M₅ (Obr. 10), množství cDNA ve vzorcích nebylo dostatečné pro spolehlivou kvantifikaci pomocí qPCR. Tento podtyp je však v mozku obecně exprimován jen velmi málo. Selhání kvantifikace by mohlo být způsobeno rozpadem mRNA při skladování či chybami při reverzní transkripci. Není to však pravděpodobné, protože podobné problémy by se objevily i u ostatních podtypů muskarinových receptorů a byly by patrné zejména u málo exprimované M₃ mRNA. Poměrné zastoupení mRNA jednotlivých podtypů M₁>M₂>M₄>M₃ (Graf 7) se dobře shoduje s literárními údaji. Imunohistochemická analýza pomocí selektivních protilátek odhalila v mozkové kůře hlodavců nejvyšší zastoupení proteinů M₁, M₂ a M₄ podtypů mAChR. Prokázána byla i přítomnost M₃ a M₅ podtypů, ale ve velmi omezeném množství (Levey a kol. 1991). Analýza koncentrace mRNA pomocí Northern blot (Buckley a kol. 1988) a kvantitativní PCR (Krejci a Tuček 2002) v mozkové kůře ukázaly podobné pořadí (M₁>M₂>M₃>M₄).

Výzkum příčin a rozvoje Alzheimerovy choroby je komplikovaný především nedostatkem vzorků postižených lidských tkání. K dispozici jsou nejčastěji pouze vzorky mozkové tkáně odebrané post-mortem od jedinců, kteří již trpěli rozvinutou formou této choroby. Tato tkáň již vykazuje výrazná poškození, ke kterým však mohou přispívat i jiná souběžná onemocnění a proto je nelze jednoduše použít k určení příčin a průběhu AD. Ranná stádia nemoci lze tedy zkoumat pouze na zvířecích modelech AD. Pro tuto práci jsme použili transgenní myši kmen APP^{swe}/PS1^{dE9}. Tyto myši nesou vytvořený transgen, který obsahuje mutované lidské geny pro APP a PS1. Švédská mutace APP (APP^{swe}) spočívá v záměně Lys za Asn na kodonu 670 a Met za Leu na kodonu 671 u APP770 transkriptu. Mutace PS1^{dE9} je deleční mutace 9. exonu presenilinu-1, který je součástí komplexu γ -sekretázy. Expres APP^{swe} v kombinaci s deleční mutací PS1 způsobuje vysokou produkci fragmentů A β ₁₋₄₀ a A β ₁₋₄₂ již v mladém věku 7-10 týdnů, což bylo v naší laboratoři potvrzeno (Machova a kol. 2010). Transgenní myši v tomto věku vykazují ve srovnání s netransgenními kontrolami ze stejného vrhu přibližně 7-násobné zvýšení koncentrace rozpustných forem A β ₁₋₄₀ a 12-násobné zvýšení škodlivější formy A β ₁₋₄₂. Produkce A β se během stárnutí dále zvyšuje a ve věku 5-6 měsíců vykazuje v parietální kůře přibližně 12-násobné zvýšení koncentrace

rozpuštěného A β ₁₋₄₀, 19násobné zvýšení škodlivějšího A β ₁₋₄₂ a počínající tvorbu amyloidových plaků. Experimenty jsme prováděli na samicích, u kterých se patologie rozvíjí rychleji. Tkáň byla odebrána z parietálního kortexu, kde je akumulace A β nejméně výraznější (Jankowsky a kol. 2004). Naše laboratoř na tomto modelu provedla již řadu experimentů, jejichž dosavadní výsledky prokázaly poruchy na cholinergních synapsích, a to na presynaptické i postsynaptické části. Již u sedmiměsíčních jedinců dochází ke snížení množství proteinu VAcHT, který je lokalizován výhradně v zakončeních cholinergních neuronů, a ke snížení množství muskarinových receptorů, které jsou charakteristickými proteiny postsynaptické části cholinergních synapsí. Z hlediska funkce cholinergní synapse bylo na presynaptické úrovni zjištěno snížení stimulovaného uvolňování ACh, které odpovídá sníženému množství VAcHT a tudíž snížené kapacitě transportu ACh do synaptických váček. Na postsynaptické úrovni bylo zjištěno snížení aktivace G-proteinů po stimulaci muskarinových receptorů analogem přirozeného agonisty karcholem, které by mohlo být následkem snížení exprese muskarinových receptorů (Machova a kol. 2008). Tato zjištění nás tedy vedla k otázce, na jaké úrovni metabolismu cholinergních proteinů dochází k poruchám, které mají za následek zmíněné deficiency.

V našich experimentech jsme se zaměřili na měření hladin mRNA genů ChAT a VAcHT, které kódují charakteristické presynaptické proteiny, a podtypů muskarinových receptorů, které kódují charakteristické postsynaptické proteiny. Jak je uvedeno v literárním úvodu, regulace exprese proteinů cholinergního genového místa, které jsou klíčové pro funkci presynaptické části cholinergní synapse, je velmi komplexní záležitostí a je fyziologicky ovlivňována řadou faktorů. Transkripce stojí na počátku celé kaskády vzniku nových molekul proteinu a její snížení by mohlo být příčinou snížení koncentrace specifických presynaptických proteinů na cholinergních synapsích. Mezi patologicky působící faktory by mohla patřit i přítomnost vysoké hladiny rozpustných forem fragmentů A β , které jsou prvotní příčinou vzniku a rozvoje Alzheimerovy nemoci (Selkoe 2001), v bezprostředním okolí buněk. Výsledky našich pokusů však ukazují, že u sedmiměsíčních transgenních myší nedochází ke změně exprese (hladin mRNA) jednotlivých genů cholinergního genového místa (grafy 1 a 2). Podobně jako u presynaptických markerů jsme nenalezli žádné změny v hladinách mRNA pro jednotlivé podtypy muskarinových receptorů M₁-M₄ (grafy 3-6). Toto pozorování je důležité z praktického pohledu zejména v souvislosti s M₁ podtypem. Jedná se o podtyp, který je převažujícím podtypem v mozkové kůře a uplatňuje se nejen u kognitivních funkcí, ale i při neamyloidogenním štěpení APP. Účinek M₁ selektivních agonistů a alosterických modulátorů na muskarinové receptory se v poslední době zdá být jednou z

možných terapeutických cest při léčbě AD. Stimulace M_1 a M_3 podtypu u buněčných kultur mělo za následek zvýšení neamyloidogenního štěpení APP a tedy vedlo ke snížení produkce škodlivého $A\beta$ (Buxbaum a kol. 1992; Nitsch a kol. 1992). Přítomnost funkčních M_1 receptorů v počátečním stádiu tvorby amyloidních plaků tedy umožňuje jejich farmakologické ovlivnění a může případně vést k terapii AD.

Naše výsledky naznačují, že za snížení koncentrace proteinu VAcHT a muskarinových receptorů (Machova a kol. 2008) jsou odpovědné děje, které následují po transkripci. Akumulace $A\beta$ může působit na postranskripční modifikace pre-mRNA, translaci, postranskripční modifikace (glykozylace), zabudování proteinu do membrány synaptického váčku, transport proteinu z těla neuronu do synaptického zakončení. Na modelovém myším kmenu APP^{swe}/PS1^{dE9} byla již provedena řada experimentů. Prokazatelně u těchto myší dochází k hromadění $A\beta$ fragmentů a vzniku amyloidních plaků. Jak bylo dokázáno, tyto myši mají již v rané dospělosti poruchy cholinergního systému, které se později projeví i na kognitivních schopnostech. Postižení CNS transgenního kmene APP^{swe}/PS1^{dE9} tedy částečně modeluje i lidskou patogenezi AD ačkoliv prokazatelně vykazuje pouze jeden základní symptom. Tato nevýhoda se může stát výhodou ve chvíli, kdy je třeba striktně oddělit působení samotného $A\beta$ na organismus a dalších faktorů. Do této chvíle byla provedena řada experimentů, které potvrzují amyloidovou hypotézu AD spojením deficitního cholinergního systému a hromadícím se $A\beta$. Na druhou stranu nemalá skupina vědců se snaží přijít s jinou a odlišnou hypotézou, která by $A\beta$ „obešla“. Čím dál více se hovoří o proteinu τ , defektním genu pro ApoE protein, gliových buňkách či různých environmentálních vlivech. Americký národní institut pro stárnutí dokonce vypisuje granty, které by amyloidovou hypotézu vyvrátily. I přes celé století bádání, neznáme dosud u většiny případů příčiny propuknutí nemoci, molekulární mechanismy patogeneze a tedy ani efektivní léčbu.

Závěr

Provedl jsem optimalizaci metod izolace RNA z myší mozkové kůry, reverzní transkripce a kvantitativní PCR pro myší geny cholinacetyltransferázu, váčkový přenašeč pro acetylcholin, podtypy muskarinových receptorů M_1 - M_5 a housekeeping genu GAPDH. Pomocí optimalizovaných postupů jsem stanovil hladiny mRNA těchto genů v parietální kůře u sedmiměsíčních samic transgenních myší APP^{swe}/PS1^{dE9} a netransgenních kontrol ze stejného vrhu. Výsledky kvantitativní PCR ukázaly, že zvýšená koncentrace fragmentů A β u transgenních myší nemá vliv na hladiny mRNA pro žádný ze zkoumaných genů. Tyto výsledky naznačují, že v literatuře popsany úbytek muskarinových receptorů a váčkového přenašeče pro acetylcholin u sedmiměsíčních transgenních myší není způsoben snížením hladin mRNA. Posttranskripční děje, odpovědné za snížení hladin těchto proteinů, budou vyžadovat další zkoumání.

Literární zdroje

http://www.czso.cz/csu/redakce.nsf/i/nadeje_dozeni_a_prumerny_vek

<http://www.medicinenet.com/script/main/art.asp?articlekey=105735>

Alfonso A., Grundahl K., McManus J. R., Asbury J. M. and Rand J. B. (1994) Alternative splicing leads to two cholinergic proteins in *Caenorhabditis elegans*. *J Mol Biol* **241**, 627-630.

Alkondon M., Pereira E. F. and Albuquerque E. X. (1998) alpha-bungarotoxin- and methyllycaconitine-sensitive nicotinic receptors mediate fast synaptic transmission in interneurons of rat hippocampal slices. *Brain Res* **810**, 257-263.

Allinson T. M., Parkin E. T., Turner A. J. and Hooper N. M. (2003) ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases. *J Neurosci Res* **74**, 342-352.

Alzheimer A., Stelzmann R. A., Schnitzlein H. N. and Murtagh F. R. (1995) An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde". *Clin Anat* **8**, 429-431.

Atwood C. S., Martins R. N., Smith M. A. and Perry G. (2002) Senile plaque composition and posttranslational modification of amyloid-beta peptide and associated proteins. *Peptides* **23**, 1343-1350.

Auld D. S., Kar S. and Quirion R. (1998) Beta-amyloid peptides as direct cholinergic neuromodulators: a missing link? *Trends Neurosci* **21**, 43-49.

Avery E. E., Baker L. D. and Asthana S. (1997) Potential role of muscarinic agonists in Alzheimer's disease. *Drugs Aging* **11**, 450-459.

Ballatore C., Lee V. M. and Trojanowski J. Q. (2007) Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci* **8**, 663-672.

Bartus R. T., Dean R. L., 3rd, Beer B. and Lippa A. S. (1982) The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* **217**, 408-414.

Bejanin S., Cervini R., Mallet J. and Berrard S. (1994) A unique gene organization for two cholinergic markers, choline acetyltransferase and a putative vesicular transporter of acetylcholine. *J Biol Chem* **269**, 21944-21947.

Berse B. and Blusztajn J. K. (1995) Coordinated up-regulation of choline acetyltransferase and vesicular acetylcholine transporter gene expression by the retinoic acid receptor alpha, cAMP, and leukemia inhibitory factor/ciliary neurotrophic factor signaling pathways in a murine septal cell line. *J Biol Chem* **270**, 22101-22104.

Berse B., Lopez-Coviella I. and Blusztajn J. K. (1999) Activation of TrkA by nerve growth factor upregulates expression of the cholinergic gene locus but attenuates the response to ciliary neurotrophic growth factor. *Biochem J* **342** (Pt 2), 301-308.

Bhajak T. J., DeKosky S. T., Ganguli M. and Kamboh M. I. (2001) Genetic polymorphism in the cathepsin G gene and the risk of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* **309**, 138-140.

- Bird T. D. (2008) Genetic aspects of Alzheimer disease. *Genet Med* **10**, 231-239.
- Blacker D., Wilcox M. A., Laird N. M., Rodes L., Horvath S. M., Go R. C., Perry R., Watson B., Jr., Bassett S. S., McInnis M. G., Albert M. S., Hyman B. T. and Tanzi R. E. (1998) Alpha-2 macroglobulin is genetically associated with Alzheimer disease. *Nat Genet* **19**, 357-360.
- Bons N., Rieger F., Prudhomme D., Fisher A. and Krause K. H. (2006) *Microcebus murinus*: a useful primate model for human cerebral aging and Alzheimer's disease? *Genes Brain Behav* **5**, 120-130.
- Bowen D. M., Smith C. B., White P. and Davison A. N. (1976) Neurotransmitter-related enzymes and indices of hypoxia in senile dementia and other abiotrophies. *Brain* **99**, 459-496.
- Buckley N. J., Bonner T. I. and Brann M. R. (1988) Localization of a family of muscarinic receptor mRNAs in rat brain. *J Neurosci* **8**, 4646-4652.
- Buxbaum J. D., Oishi M., Chen H. I., Pinkas-Kramarski R., Jaffe E. A., Gandy S. E. and Greengard P. (1992) Cholinergic agonists and interleukin 1 regulate processing and secretion of the Alzheimer beta/A4 amyloid protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 10075-10078.
- Carroll P. T. (1994) Membrane-bound choline-O-acetyltransferase in rat hippocampal tissue is associated with synaptic vesicles. *Brain Res* **633**, 112-118.
- Carter J. and Lippa C. F. (2001) Beta-amyloid, neuronal death and Alzheimer's disease. *Curr Mol Med* **1**, 733-737.
- Cervini R., Houhou L., Pradat P. F., Bejanin S., Mallet J. and Berrard S. (1995) Specific vesicular acetylcholine transporter promoters lie within the first intron of the rat choline acetyltransferase gene. *J Biol Chem* **270**, 24654-24657.
- Citron M., Oltersdorf T., Haass C., McConlogue L., Hung A. Y., Seubert P., Vigo-Pelfrey C., Lieberburg I. and Selkoe D. J. (1992) Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature* **360**, 672-674.
- Colquhoun L. M. and Patrick J. W. (1997) Pharmacology of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Adv Pharmacol* **39**, 191-220.
- Cork L. C., Powers R. E., Selkoe D. J., Davies P., Geyer J. J. and Price D. L. (1988) Neurofibrillary tangles and senile plaques in aged bears. *J Neuropathol Exp Neurol* **47**, 629-641.
- Davies P. and Maloney A. J. (1976) Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* **2**, 1403.
- Dawson G. R., Seabrook G. R., Zheng H., Smith D. W., Graham S., O'Dowd G., Bowery B. J., Boyce S., Trumbauer M. E., Chen H. Y., Van der Ploeg L. H. and Sirinathsinghji D. J. (1999) Age-related cognitive deficits, impaired long-term potentiation and reduction in synaptic marker density in mice lacking the beta-amyloid precursor protein. *Neuroscience* **90**, 1-13.

- Deng A., Irizarry M. C., Nitsch R. M., Growdon J. H. and Rebeck G. W. (2001) Elevation of cystatin C in susceptible neurons in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* **159**, 1061-1068.
- Dolezal V. and Kasparova J. (2003) Beta-amyloid and cholinergic neurons. *Neurochem Res* **28**, 499-506.
- Eiden L. E. (1998) The cholinergic gene locus. *J Neurochem* **70**, 2227-2240.
- Erickson J. D., Varoqui H., Schafer M. K., Modi W., Diebler M. F., Weihe E., Rand J., Eiden L. E., Bonner T. I. and Usdin T. B. (1994) Functional identification of a vesicular acetylcholine transporter and its expression from a "cholinergic" gene locus. *J Biol Chem* **269**, 21929-21932.
- Esch F. S., Keim P. S., Beattie E. C., Blacher R. W., Culwell A. R., Oltersdorf T., McClure D. and Ward P. J. (1990) Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science* **248**, 1122-1124.
- Esler W. P. and Wolfe M. S. (2001) A portrait of Alzheimer secretases--new features and familiar faces. *Science* **293**, 1449-1454.
- Foster J. K., Verdile G., Bates K. A. and Martins R. N. (2009) Immunization in Alzheimer's disease: naive hope or realistic clinical potential? *Mol Psychiatry* **14**, 239-251.
- Francis P. T., Palmer A. M., Sims N. R., Bowen D. M., Davison A. N., Esiri M. M., Neary D., Snowden J. S. and Wilcock G. K. (1985) Neurochemical studies of early-onset Alzheimer's disease. Possible influence on treatment. *N Engl J Med* **313**, 7-11.
- Francis R., McGrath G., Zhang J., Ruddy D. A., Sym M., Apfeld J., Nicoll M., Maxwell M., Hai B., Ellis M. C., Parks A. L., Xu W., Li J., Gurney M., Myers R. L., Himes C. S., Hiesch R., Ruble C., Nye J. S. and Curtis D. (2002) *aph-1* and *pen-2* are required for Notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of betaAPP, and presenilin protein accumulation. *Dev Cell* **3**, 85-97.
- Frolich L., Blum-Degen D., Riederer P. and Hoyer S. (1999) A disturbance in the neuronal insulin receptor signal transduction in sporadic Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* **893**, 290-293.
- Geerts H. and Grossberg G. T. (2006) Pharmacology of acetylcholinesterase inhibitors and N-methyl-D-aspartate receptors for combination therapy in the treatment of Alzheimer's disease. *J Clin Pharmacol* **46**, 8S-16S.
- Geula C. and Mesulam M. M. (1996) Systematic regional variations in the loss of cortical cholinergic fibers in Alzheimer's disease. *Cereb Cortex* **6**, 165-177.
- Gilman S., Koller M., Black R. S., Jenkins L., Griffith S. G., Fox N. C., Eisner L., Kirby L., Rovira M. B., Forette F. and Orgogozo J. M. (2005) Clinical effects of Abeta immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial. *Neurology* **64**, 1553-1562.

- Glenner G. G. and Wong C. W. (1984) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* **120**, 885-890.
- Goate A., Chartier-Harlin M. C., Mullan M., Brown J., Crawford F., Fidani L., Giuffra L., Haynes A., Irving N., James L. and et al. (1991) Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* **349**, 704-706.
- Gralle M. and Ferreira S. T. (2007) Structure and functions of the human amyloid precursor protein: the whole is more than the sum of its parts. *Prog Neurobiol* **82**, 11-32.
- Haass C., Lemere C. A., Capell A., Citron M., Seubert P., Schenk D., Lannfelt L. and Selkoe D. J. (1995) The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by beta-secretase cleavage within the secretory pathway. *Nat Med* **1**, 1291-1296.
- Hardy J. (2009) The amyloid hypothesis for Alzheimer's disease: a critical reappraisal. *J Neurochem* **110**, 1129-1134.
- Heber S., Herms J., Gajic V., Hainfellner J., Aguzzi A., Rulicke T., von Kretschmar H., von Koch C., Sisodia S., Tremml P., Lipp H. P., Wolfer D. P. and Muller U. (2000) Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members. *J Neurosci* **20**, 7951-7963.
- Herlitz S., Garcia D. E., Mackie K., Hille B., Scheuer T. and Catterall W. A. (1996) Modulation of Ca²⁺ channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature* **380**, 258-262.
- Hock C., Konietzko U., Streffer J. R., Tracy J., Signorell A., Muller-Tillmanns B., Lemke U., Henke K., Moritz E., Garcia E., Wollmer M. A., Umbricht D., de Quervain D. J., Hofmann M., Maddalena A., Papassotiropoulos A. and Nitsch R. M. (2003) Antibodies against beta-amyloid slow cognitive decline in Alzheimer's disease. *Neuron* **38**, 547-554.
- Hoyer S. (1998) Is sporadic Alzheimer disease the brain type of non-insulin dependent diabetes mellitus? A challenging hypothesis. *J Neural Transm* **105**, 415-422.
- Hynes T. R., Randal M., Kennedy L. A., Eigenbrot C. and Kossiakoff A. A. (1990) X-ray crystal structure of the protease inhibitor domain of Alzheimer's amyloid beta-protein precursor. *Biochemistry* **29**, 10018-10022.
- Chartier-Harlin M. C., Crawford F., Houlden H., Warren A., Hughes D., Fidani L., Goate A., Rossor M., Roques P., Hardy J. and et al. (1991) Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nature* **353**, 844-846.
- Iijima K. and Iijima-Ando K. (2008) Drosophila models of Alzheimer's amyloidosis: the challenge of dissecting the complex mechanisms of toxicity of amyloid-beta 42. *J Alzheimers Dis* **15**, 523-540.
- Jacobsen K. T. and Iverfeldt K. (2009) Amyloid precursor protein and its homologues: a family of proteolysis-dependent receptors. *Cell Mol Life Sci* **66**, 2299-2318.

Jankowsky J. L., Slunt H. H., Ratovitski T., Jenkins N. A., Copeland N. G. and Borchelt D. R. (2001) Co-expression of multiple transgenes in mouse CNS: a comparison of strategies. *Biomol Eng* **17**, 157-165.

Jankowsky J. L., Fadale D. J., Anderson J., Xu G. M., Gonzales V., Jenkins N. A., Copeland N. G., Lee M. K., Younkin L. H., Wagner S. L., Younkin S. G. and Borchelt D. R. (2004) Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue beta-amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific gamma secretase. *Hum Mol Genet* **13**, 159-170.

Jones R. W. (2003) Have cholinergic therapies reached their clinical boundary in Alzheimer's disease? *Int J Geriatr Psychiatry* **18**, S7-S13.

Kamboh M. I., Ferrell R. E. and DeKosky S. T. (1998) Genetic association studies between Alzheimer's disease and two polymorphisms in the low density lipoprotein receptor-related protein gene. *Neurosci Lett* **244**, 65-68.

Kang J., Lemaire H. G., Unterbeck A., Salbaum J. M., Masters C. L., Grzeschik K. H., Multhaup G., Beyreuther K. and Muller-Hill B. (1987) The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* **325**, 733-736.

Kar S., Seto D., Gaudreau P. and Quirion R. (1996) Beta-amyloid-related peptides inhibit potassium-evoked acetylcholine release from rat hippocampal slices. *J Neurosci* **16**, 1034-1040.

Kar S., Issa A. M., Seto D., Auld D. S., Collier B. and Quirion R. (1998) Amyloid beta-peptide inhibits high-affinity choline uptake and acetylcholine release in rat hippocampal slices. *J Neurochem* **70**, 2179-2187.

Kofuji P., Davidson N. and Lester H. A. (1995) Evidence that neuronal G-protein-gated inwardly rectifying K⁺ channels are activated by G beta gamma subunits and function as heteromultimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 6542-6546.

Kraemer B. C., Zhang B., Leverenz J. B., Thomas J. H., Trojanowski J. Q. and Schellenberg G. D. (2003) Neurodegeneration and defective neurotransmission in a *Caenorhabditis elegans* model of tauopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 9980-9985.

Krejci A. and Tucek S. (2002) Quantitation of mRNAs for M(1) to M(5) subtypes of muscarinic receptors in rat heart and brain cortex. *Mol Pharmacol* **61**, 1267-1272.

Kubo T. (1993) Molecular basis of the muscarinic acetylcholine receptor. *Ann N Y Acad Sci* **707**, 210-224.

Lamb B. T., Sisodia S. S., Lawler A. M., Slunt H. H., Kitt C. A., Kearns W. G., Pearson P. L., Price D. L. and Gearhart J. D. (1993) Introduction and expression of the 400 kilobase amyloid precursor protein gene in transgenic mice [corrected]. *Nat Genet* **5**, 22-30.

Lee Y. H., Tharp W. G., Maple R. L., Nair S., Permana P. A. and Pratley R. E. (2008) Amyloid precursor protein expression is upregulated in adipocytes in obesity. *Obesity (Silver Spring)* **16**, 1493-1500.

- Levey A. I., Kitt C. A., Simonds W. F., Price D. L. and Brann M. R. (1991) Identification and localization of muscarinic acetylcholine receptor proteins in brain with subtype-specific antibodies. *J Neurosci* **11**, 3218-3226.
- Levy-Lahad E., Wasco W., Poorkaj P., Romano D. M., Oshima J., Pettingell W. H., Yu C. E., Jondro P. D., Schmidt S. D., Wang K. and et al. (1995) Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* **269**, 973-977.
- Lopez-Coviella I., Berse B., Krauss R., Thies R. S. and Blusztajn J. K. (2000) Induction and maintenance of the neuronal cholinergic phenotype in the central nervous system by BMP-9. *Science* **289**, 313-316.
- Machova E., Rudajev V., Smyckova H., Koivisto H., Tanila H. and Dolezal V. (2010) Functional cholinergic damage develops with amyloid accumulation in young adult APP^{swe}/PS1^{dE9} transgenic mice. *Neurobiol Dis.*
- Machova E., Jakubik J., Michal P., Oksman M., Iivonen H., Tanila H. and Dolezal V. (2008) Impairment of muscarinic transmission in transgenic APP^{swe}/PS1^{dE9} mice. *Neurobiol Aging* **29**, 368-378.
- Mallet J., Houhou L., Pajak F., Oda Y., Cervini R., Bejanin S. and Berrard S. (1998) The cholinergic locus: ChAT and VACHT genes. *J Physiol Paris* **92**, 145-147.
- Mandelkow E., von Bergen M., Biernat J. and Mandelkow E. M. (2007) Structural principles of tau and the paired helical filaments of Alzheimer's disease. *Brain Pathol* **17**, 83-90.
- Mann D. M. and Esiri M. M. (1989) The pattern of acquisition of plaques and tangles in the brains of patients under 50 years of age with Down's syndrome. *J Neurol Sci* **89**, 169-179.
- Mayer G., Nitsch R. and Hoyer S. (1990) Effects of changes in peripheral and cerebral glucose metabolism on locomotor activity, learning and memory in adult male rats. *Brain Res* **532**, 95-100.
- Mesulam M. M. (2004) The cholinergic innervation of the human cerebral cortex. *Prog Brain Res* **145**, 67-78.
- Mesulam M. M., Mufson E. J., Wainer B. H. and Levey A. I. (1983) Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6). *Neuroscience* **10**, 1185-1201.
- Milward E. A., Papadopoulos R., Fuller S. J., Moir R. D., Small D., Beyreuther K. and Masters C. L. (1992) The amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is a mediator of the effects of nerve growth factor on neurite outgrowth. *Neuron* **9**, 129-137.
- Misawa H., Ishii K. and Deguchi T. (1992) Gene expression of mouse choline acetyltransferase. Alternative splicing and identification of a highly active promoter region. *J Biol Chem* **267**, 20392-20399.
- Montoya S. E., Aston C. E., DeKosky S. T., Kamboh M. I., Lazo J. S. and Ferrell R. E. (1998) Bleomycin hydrolase is associated with risk of sporadic Alzheimer's disease. *Nat Genet* **18**, 211-212.

- Moya K. L., Benowitz L. I., Schneider G. E. and Allinquant B. (1994) The amyloid precursor protein is developmentally regulated and correlated with synaptogenesis. *Dev Biol* **161**, 597-603.
- Narindrasorasak S., Lowery D. E., Altman R. A., Gonzalez-DeWhitt P. A., Greenberg B. D. and Kisilevsky R. (1992) Characterization of high affinity binding between laminin and Alzheimer's disease amyloid precursor proteins. *Lab Invest* **67**, 643-652.
- Needham B. E., Wlodek M. E., Ciccotosto G. D., Fam B. C., Masters C. L., Proietto J., Andrikopoulos S. and Cappai R. (2008) Identification of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein (APP) and its homologue APLP2 as essential modulators of glucose and insulin homeostasis and growth. *J Pathol* **215**, 155-163.
- Nguyen M. L., Cox G. D. and Parsons S. M. (1998) Kinetic parameters for the vesicular acetylcholine transporter: two protons are exchanged for one acetylcholine. *Biochemistry* **37**, 13400-13410.
- Nitsch R. M., Slack B. E., Wurtman R. J. and Growdon J. H. (1992) Release of Alzheimer amyloid precursor derivatives stimulated by activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Science* **258**, 304-307.
- Oda Y. (1999) Choline acetyltransferase: the structure, distribution and pathologic changes in the central nervous system. *Pathol Int* **49**, 921-937.
- Oda Y., Muroishi Y. and Nakanishi I. (1996) Translation initiation sites and relative activity of large and small forms of human choline acetyltransferase. *Brain Res Mol Brain Res* **38**, 135-138.
- Okuzumi K., Onodera O., Namba Y., Ikeda K., Yamamoto T., Seki K., Ueki A., Nanko S., Tanaka H., Takahashi H., Oyanagi K., Mizusawa H., Kanazawa I. and Tsuji S. (1995) Genetic association of the very low density lipoprotein (VLDL) receptor gene with sporadic Alzheimer's disease. *Nat Genet* **11**, 207-209.
- Pahud G., Salem N., van de Goor J., Medilanski J., Pellegrinelli N. and Eder-Colli L. (1998) Study of subcellular localization of membrane-bound choline acetyltransferase in *Drosophila* central nervous system and its association with membranes. *Eur J Neurosci* **10**, 1644-1653.
- Papassotiropoulos A., Bagli M., Feder O., Jessen F., Maier W., Rao M. L., Ludwig M., Schwab S. G. and Heun R. (1999) Genetic polymorphism of cathepsin D is strongly associated with the risk for developing sporadic Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* **262**, 171-174.
- Perez R. G., Zheng H., Van der Ploeg L. H. and Koo E. H. (1997) The beta-amyloid precursor protein of Alzheimer's disease enhances neuron viability and modulates neuronal polarity. *J Neurosci* **17**, 9407-9414.
- Perry E. K., Gibson P. H., Blessed G., Perry R. H. and Tomlinson B. E. (1977) Neurotransmitter enzyme abnormalities in senile dementia. Choline acetyltransferase and glutamic acid decarboxylase activities in necropsy brain tissue. *J Neurol Sci* **34**, 247-265.

Reitstetter R., Lukas R. J. and Gruener R. (1999) Dependence of nicotinic acetylcholine receptor recovery from desensitization on the duration of agonist exposure. *J Pharmacol Exp Ther* **289**, 656-660.

Role L. W. and Berg D. K. (1996) Nicotinic receptors in the development and modulation of CNS synapses. *Neuron* **16**, 1077-1085.

Savonenko A., Xu G. M., Melnikova T., Morton J. L., Gonzales V., Wong M. P., Price D. L., Tang F., Markowska A. L. and Borchelt D. R. (2005) Episodic-like memory deficits in the APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer's disease: relationships to beta-amyloid deposition and neurotransmitter abnormalities. *Neurobiol Dis* **18**, 602-617.

Selden N. R., Gitelman D. R., Salamon-Murayama N., Parrish T. B. and Mesulam M. M. (1998) Trajectories of cholinergic pathways within the cerebral hemispheres of the human brain. *Brain* **121** (Pt 12), 2249-2257.

Selkoe D. J. (2001) Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* **81**, 741-766.

Selkoe D. J., Bell D. S., Podlisny M. B., Price D. L. and Cork L. C. (1987) Conservation of brain amyloid proteins in aged mammals and humans with Alzheimer's disease. *Science* **235**, 873-877.

Seubert P., Oltsdorf T., Lee M. G., Barbour R., Blomquist C., Davis D. L., Bryant K., Fritz L. C., Galasko D., Thal L. J. and et al. (1993) Secretion of beta-amyloid precursor protein cleaved at the amino terminus of the beta-amyloid peptide. *Nature* **361**, 260-263.

Sherrington R., Rogaev E. I., Liang Y., Rogaeva E. A., Levesque G., Ikeda M., Chi H., Lin C., Li G., Holman K. and et al. (1995) Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* **375**, 754-760.

Schellenberg G. D., Bird T. D., Wijsman E. M., Orr H. T., Anderson L., Nemens E., White J. A., Bonnycastle L., Weber J. L., Alonso M. E. and et al. (1992) Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Science* **258**, 668-671.

Schliebs R. and Arendt T. (2006) The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease. *J Neural Transm* **113**, 1625-1644.

Schutz B., Weihe E. and Eiden L. E. (2001) Independent patterns of transcription for the products of the rat cholinergic gene locus. *Neuroscience* **104**, 633-642.

Sisodia S. S., Koo E. H., Hoffman P. N., Perry G. and Price D. L. (1993) Identification and transport of full-length amyloid precursor proteins in rat peripheral nervous system. *J Neurosci* **13**, 3136-3142.

Smith R. P., Higuchi D. A. and Broze G. J., Jr. (1990) Platelet coagulation factor XIa-inhibitor, a form of Alzheimer amyloid precursor protein. *Science* **248**, 1126-1128.

Snyder S. W., Lador U. S., Wade W. S., Wang G. T., Barrett L. W., Matayoshi E. D., Huffaker H. J., Krafft G. A. and Holzman T. F. (1994) Amyloid-beta aggregation: selective

inhibition of aggregation in mixtures of amyloid with different chain lengths. *Biophys J* **67**, 1216-1228.

Soba P., Eggert S., Wagner K., Zentgraf H., Siehl K., Kreger S., Lower A., Langer A., Merdes G., Paro R., Masters C. L., Muller U., Kins S. and Beyreuther K. (2005) Homo- and heterodimerization of APP family members promotes intercellular adhesion. *Embo J* **24**, 3624-3634.

Strittmatter W. J., Saunders A. M., Schmechel D., Pericak-Vance M., Enghild J., Salvesen G. S. and Roses A. D. (1993) Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 1977-1981.

Teaktong T., Graham A. J., Court J. A., Perry R. H., Jaros E., Johnson M., Hall R. and Perry E. K. (2004) Nicotinic acetylcholine receptor immunohistochemistry in Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies: differential neuronal and astroglial pathology. *J Neurol Sci* **225**, 39-49.

Tekirian T. L., Cole G. M., Russell M. J., Yang F., Wekstein D. R., Patel E., Snowdon D. A., Markesbery W. R. and Geddes J. W. (1996) Carboxy terminal of beta-amyloid deposits in aged human, canine, and polar bear brains. *Neurobiol Aging* **17**, 249-257.

Usdin T. B., Eiden L. E., Bonner T. I. and Erickson J. D. (1995) Molecular biology of the vesicular ACh transporter. *Trends Neurosci* **18**, 218-224.

Vasilevko V. and Cribbs D. H. (2006) Novel approaches for immunotherapeutic intervention in Alzheimer's disease. *Neurochem Int* **49**, 113-126.

Vassar R., Bennett B. D., Babu-Khan S., Kahn S., Mendiaz E. A., Denis P., Teplow D. B., Ross S., Amarante P., Loeloff R., Luo Y., Fisher S., Fuller J., Edenson S., Lile J., Jarosinski M. A., Biere A. L., Curran E., Burgess T., Louis J. C., Collins F., Treanor J., Rogers G. and Citron M. (1999) Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* **286**, 735-741.

Wasco W., Bupp K., Magendantz M., Gusella J. F., Tanzi R. E. and Solomon F. (1992) Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer disease-associated amyloid beta protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 10758-10762.

Wasco W., Gurubhagavatula S., Paradis M. D., Romano D. M., Sisodia S. S., Hyman B. T., Neve R. L. and Tanzi R. E. (1993) Isolation and characterization of APLP2 encoding a homologue of the Alzheimer's associated amyloid beta protein precursor. *Nat Genet* **5**, 95-100.

Weihe E., Schafer M. K., Schutz B., Anlauf M., Depboylu C., Brett C., Chen L. and Eiden L. E. (1998) From the cholinergic gene locus to the cholinergic neuron. *J Physiol Paris* **92**, 385-388.

Wessler I., Kilbinger H., Bittinger F., Unger R. and Kirkpatrick C. J. (2003) The non-neuronal cholinergic system in humans: expression, function and pathophysiology. *Life Sci* **72**, 2055-2061.

- White H. K. and Levin E. D. (1999) Four-week nicotine skin patch treatment effects on cognitive performance in Alzheimer's disease. *Psychopharmacology (Berl)* **143**, 158-165.
- Whitehouse P. J., Price D. L., Struble R. G., Clark A. W., Coyle J. T. and Delon M. R. (1982) Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science* **215**, 1237-1239.
- Wong G. T., Manfra D., Poulet F. M., Zhang Q., Josien H., Bara T., Engstrom L., Pinzon-Ortiz M., Fine J. S., Lee H. J., Zhang L., Higgins G. A. and Parker E. M. (2004) Chronic treatment with the gamma-secretase inhibitor LY-411,575 inhibits beta-amyloid peptide production and alters lymphopoiesis and intestinal cell differentiation. *J Biol Chem* **279**, 12876-12882.
- Wong T. P., Debeir T., Duff K. and Cuello A. C. (1999) Reorganization of cholinergic terminals in the cerebral cortex and hippocampus in transgenic mice carrying mutated presenilin-1 and amyloid precursor protein transgenes. *J Neurosci* **19**, 2706-2716.
- Woo H. N., Park J. S., Gwon A. R., Arumugam T. V. and Jo D. G. (2009) Alzheimer's disease and Notch signaling. *Biochem Biophys Res Commun* **390**, 1093-1097.
- Yoshikai S., Sasaki H., Doh-ura K., Furuya H. and Sakaki Y. (1991) Genomic organization of the human-amyloid beta-protein precursor gene. *Gene* **102**, 291-292.
- Yu G., Chen F., Levesque G., Nishimura M., Zhang D. M., Levesque L., Rogaeva E., Xu D., Liang Y., Duthie M., St George-Hyslop P. H. and Fraser P. E. (1998) The presenilin 1 protein is a component of a high molecular weight intracellular complex that contains beta-catenin. *J Biol Chem* **273**, 16470-16475.
- Yu G., Nishimura M., Arawaka S., Levitan D., Zhang L., Tandon A., Song Y. Q., Rogaeva E., Chen F., Kawarai T., Supala A., Levesque L., Yu H., Yang D. S., Holmes E., Milman P., Liang Y., Zhang D. M., Xu D. H., Sato C., Rogaev E., Smith M., Janus C., Zhang Y., Aebbersold R., Farrer L. S., Sorbi S., Bruni A., Fraser P. and St George-Hyslop P. (2000) Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and betaAPP processing. *Nature* **407**, 48-54.
- Zheng H., Jiang M., Trumbauer M. E., Hopkins R., Sirinathsinghji D. J., Stevens K. A., Conner M. W., Slunt H. H., Sisodia S. S., Chen H. Y. and Van der Ploeg L. H. (1996) Mice deficient for the amyloid precursor protein gene. *Ann N Y Acad Sci* **777**, 421-426.

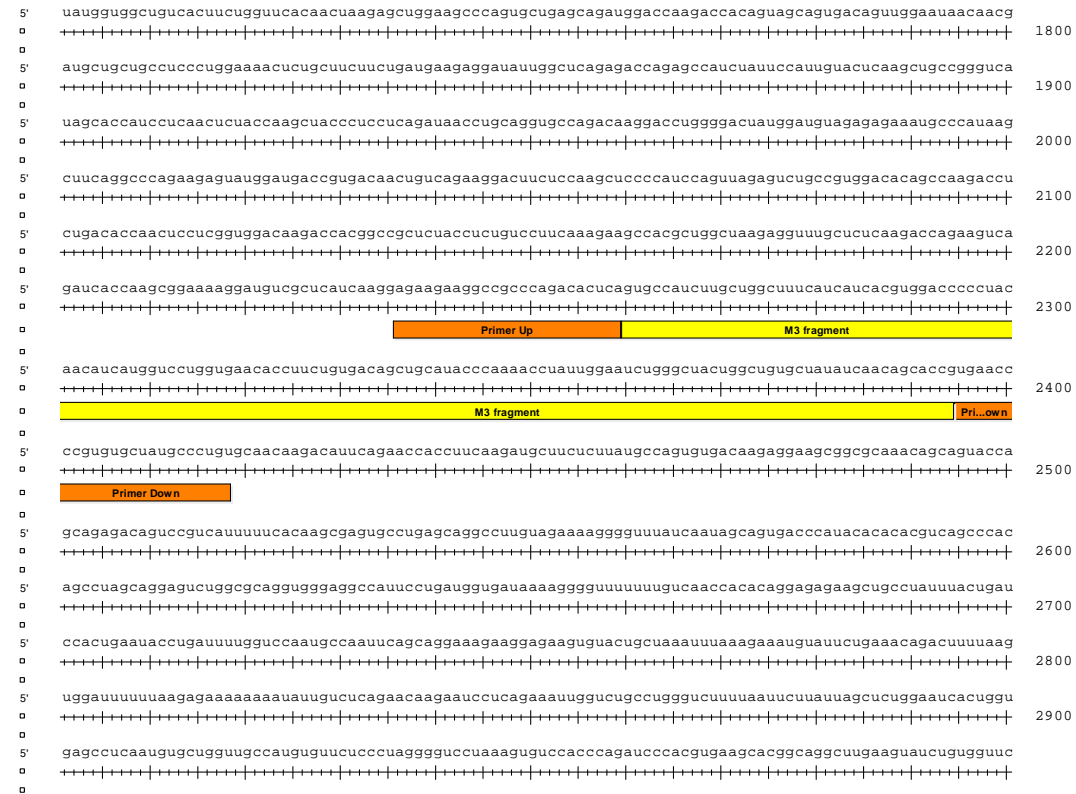
Přílohy

Sekvence mRNA sledovaných genů, vyznačení pozic použitých primerů a vyznačení kopírovaných fragmentů (genové sekvence úměrně zkráceny)

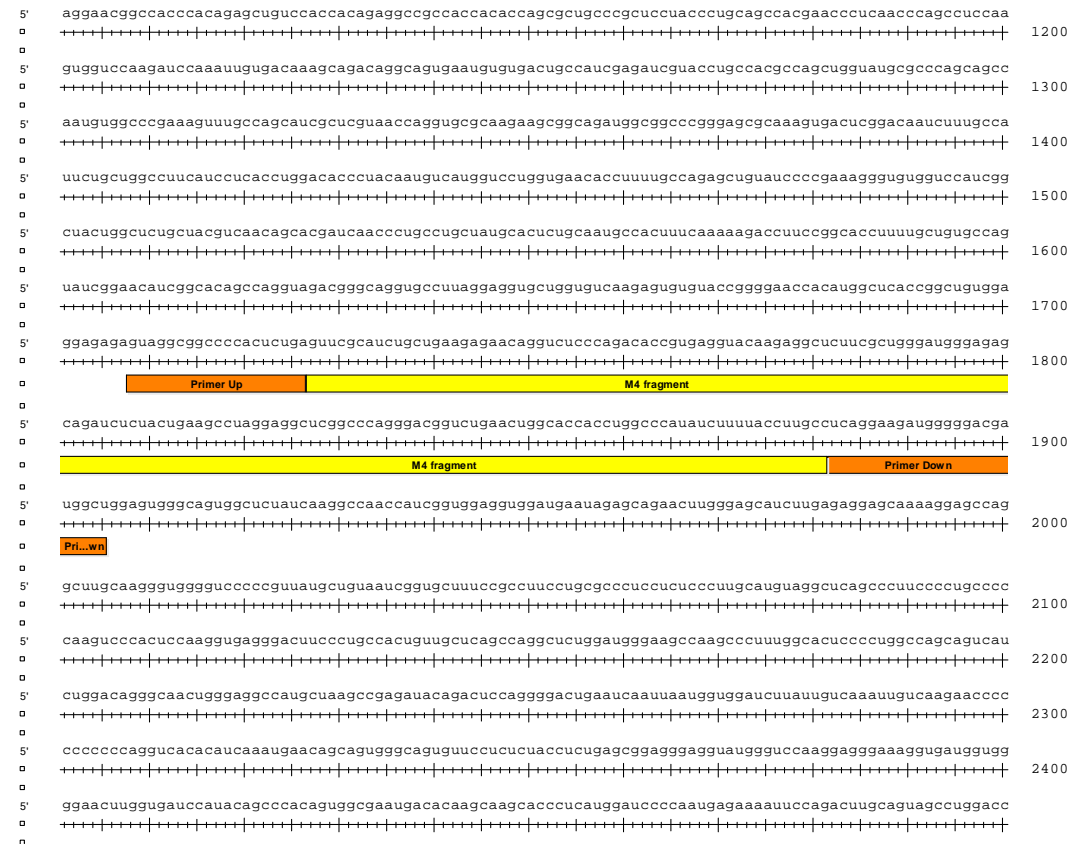
ChAT

```
5' ucggcagagaaacuucaagaauucgaaagaauucggauuucauuguuuaaaguuuugacaacuaugggaaaaacuuuuuaagaagcagaaaugcaguc 1600
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
0
0
5' cugauggcuucauccagguggccuccagcuggcuuacuacagggcuuuaccagaggcuggugcccaccuaugagagugcauccaucgcccguuccagga 1700
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
0
0
5' aggucggguggacaacaucaagauccggcacuccgaggcucuggcuuuugucagcaagcgaugacugaccacaaggcugccgugcggcuucgagaaacug 1800
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
0
0
5' cagcugcugcagagggccauccaggccaaacugaguacacagucauggccauaacggcgaugccauugacaaccacuuucggcacugagggagcugg 1900
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
0
0
5' cccgagaccugcuaaagagccaccugagauuucauggaugaaacauaccugaugagcaaccgguuuuuucucuccaccagccaggugcccacgaccau 2000
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
0
0
5' ggagauuuucugcuuuuuggccugguacccaaugguauaggagccguuuuaacccccagccugaggccauaccuucugcaucuccagcuuuuac 2100
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
0
0
5' ggcugcaaaagagaccucaucugggaguuuugcagaagcggugggagcgagccuugugacaugagagaccucuguaguucgaggcagccugcugaagca 2200
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
0
0
0
0
5' agccaccaacagcaaaaggaagagcuagaggcccaaccaagcgaacuuugacuacuccacuagccaauguccuacaggagucagcccuaucuaac 2300
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
0
0
0
0
5' ccugcuccauccccaccagcuuugcugcucccuauccuugggggucacauagaagcuggcauguuaagagagagagcccucuuuauuau 2400
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
0
0
0
0
5' cuaaguggccuguggccuuuacaacuggaaaugagaccagccuggcuuggaagcagccugggggucugggaguccucugaggcuuuuagaacuuu 2500
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
0
0
5' accuuucugcuuuuccagcaacaccagugggucacauugagcucugccaguggaagaaucgucacucaucaugcuaugggccaaaauaguc 2600
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
0
0
0
0
5' auaaaggcagaggcuagcuccuccacacacucaaugcacaagaagacagcccaagucauuuagaauacaguggcccauccaacaagacauuuuucc 2700
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
0
0
5' uuuaucuccauagcacagucuuuccuugaguucaguuuucucauccagcuauucagaaagaagaagaagaagaagaagaagaagaagaagaaga 2800
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
0
0
0
0
5' gaaaggaagg
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
0
0
```

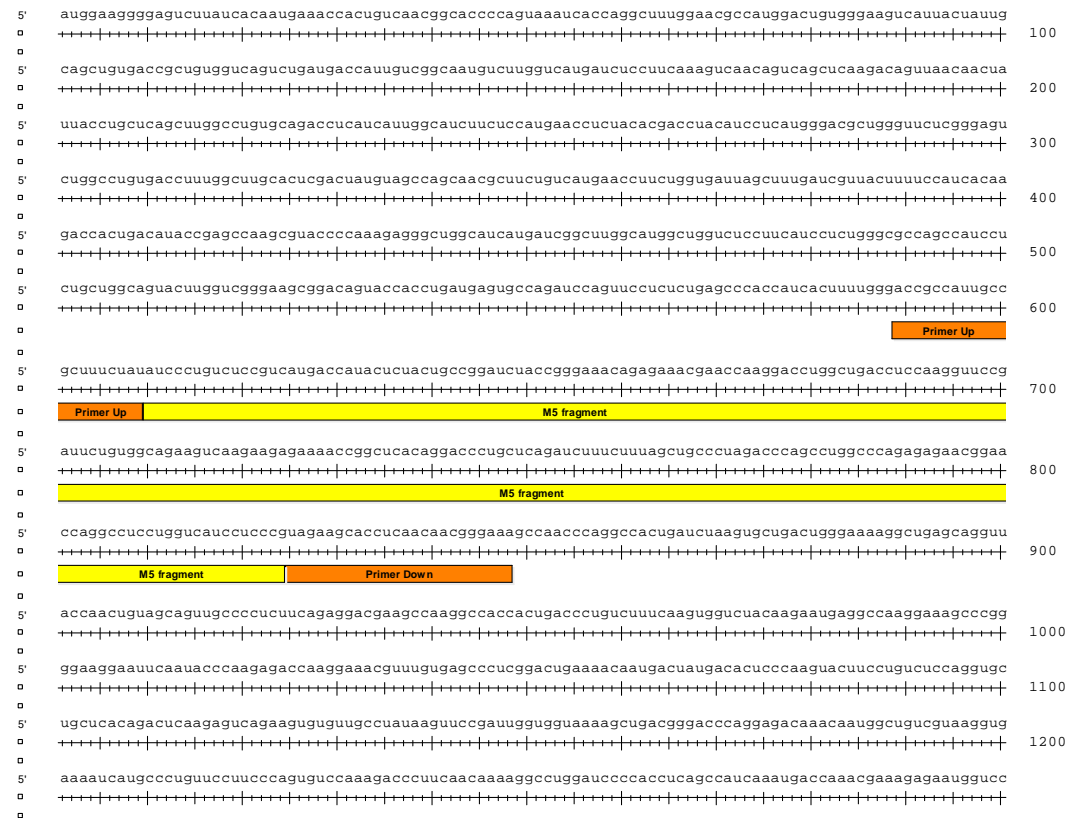

M3



M4



M5



GAPDH

