

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra Fyziologie živočichů

---

GENOVÁ EXPRESE VYSOKOAFINITNÍHO PŘENAŠEČE  
CHOLINU U MYŠÍHO MODELU ALZHEIMEROVY NEMOCI

GENE EXPRESSION OF HIGH AFFINITY CHOLINE  
TRANSPORTER IN MOUSE MODEL OF ALZHEIMER'S  
DISEASE

Diplomová práce  
studijního programu Klinická a toxikologická analýza



Praha 2010

Helena Kurfürst

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele MUDr. Vladimíra Doležala, DrSc. (grant GAAV IAA500110703), vedoucím Laboratoře neurochemie Fyziologického ústavu Akademie věd České republiky, a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity a pracoviště školitele.

V Praze dne 13. dubna 2010.

Úvodem své diplomové práce bych chtěla poděkovat všem, kteří mi vytvořili podmínky pro její vypracování, zejména MUDr. Vladimíru Doležalovi, DrSc. , Doc. RNDr. Stanislavu Vybíralovi, CSc. a RNDr. Vladimíru Rudajevovi, Ph.D. za jejich trpělivost a poskytnuté konzultace při sepisování. V neposlední řadě děkuji rodině za důvěru a podporu při studiu.

Helena Kurfürst

# Obsah

1.	Abstrakt, Klíčová slova, Předmětová hesla .....	6
2.	Seznam zkratk .....	8
3.	Literární úvod: .....	9
3.1.	Alzheimerova choroba.....	9
3.1.1.	Patogeneze .....	9
3.1.2.	Přístupy ke studiu – modelové organizmy .....	14
3.1.3.	Hypotézy o patogenetických mechanismech.....	18
3.1.4.	Terapeutické strategie a farmakologicky ovlivnitelné cíle pro léčbu AD ....	21
3.2.	Struktura a metabolismus cholinu .....	23
3.3.	Transport cholinu.....	26
3.3.1.	Nízkoafinitní transport cholinu.....	26
3.3.2.	Vysokoafinitní transport cholinu .....	27
3.4.	CHT1 .....	28
3.4.1.	Genomické uspořádání .....	28
3.4.2.	Struktura .....	29
3.4.3.	Předpokládaná funkce, regulační mechanismy a buněčná lokalizace .....	30
3.5.	CTL1.....	32
3.5.1.	Genomické uspořádání .....	32
3.5.2.	Struktura .....	34
3.5.3.	Předpokládaná funkce CTL1 .....	36
4.	Materiál a metody.....	39
4.1.	Použité chemikálie, kity a přístroje .....	39
4.2.	Izolace RNA .....	42
4.3.	Reverzní transkripce .....	42
4.4.	PCR.....	43
4.5.	Elektroforéza DNA v agarózovém gelu .....	43
4.6.	Izolace DNA z agarózového gelu.....	44
4.7.	Kvantitativní Real-Time PCR .....	45
4.8.	Příprava buněčných membrán pro imunodetekci proteinů.....	46
4.9.	SDS-Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu.....	46
4.10.	Western Blotting.....	47
4.11.	Imunodetekce.....	47
4.12.	Ověření imunodetekce proteinů.....	48
4.13.	Statistické vyhodnocení dat.....	50
5.	Cíle diplomové práce.....	51
6.	Výsledky.....	52
6.1.	Optimalizace real time PCR pro stanovení genové exprese.....	52
6.2.	Stanovení exprese mRNA pro CTL1 a CHT1 v mozkové kůře APPswe/PS1dE9 myši .....	56
6.3.	Stanovení exprese CTL1 a CHT1 proteinů v membránové frakci mozkové tkáni APPswe/PS1dE9 myši.....	59

7. Diskuze .....	62
8. Závěr .....	64
9. Literatura .....	65

# 1. Abstrakt, Klíčová slova, Předmětová hesla

## Abstrakt :

Cholin slouží ve všech savčích buňkách jako prekurzor pro syntézu hlavního membránového fosfolipidu fosfatidylcholinu a jako donor acetylových skupin. V cholinergních neuronech je navíc nezbytným prekurzorem neuromediátoru acetylcholinu. Schopnost buněk syntetizovat vlastní cholin nestačí pro jejich potřeby a tak musí být významná část cholinu vycytávána z extracelulárního prostředí. Omezení dostupnosti cholinu v mozku vede specificky k oslabování funkce cholinergních neuronů a obecně k poruchám obnovování membrán u všech buněk. Poruchy funkce cholinergní signalizace a související nervové činnosti jsou charakteristické pro Alzheimerovu nemoc.

Cílem této práce bylo zjistit zda u myšího modelu Alzheimerovy nemoci APP<sup>swc</sup>/PS1dE9 dochází ke změnám genové exprese vysokoafinitních cholinergních přenašečů. Byla stanovena exprese specifického cholinergního vysokoafinitního přenašeče cholinu CHT1, který dopravuje cholin pro syntézu acetylcholinu a předpokládaného vysokoafinitního přenašeče cholinu CTL1, který se vyskytuje obecně ve všech buňkách a souvisí s dodávkou cholinu pro syntézu fosfolipidů. V mozkové kůře 5-6 měsíců starých myší nebyly v expresi obou genů při srovnání s kontrolami ze stejného vrhu zjištěny žádné změny ani na úrovni mRNA (kvantitativní PCR) ani úrovni proteinu (Western blot spojený s detekcí protilátkami). Tyto výsledky ukazují, že pozorované snížení stimulovaného uvolňování acetylcholinu v tomto věku není způsobené sníženou expresí těchto cholinových transportérů.

## Klíčová slova :

Amyloid  $\beta$   
Alzheimerova choroba  
Cholin  
CTL1  
CHT1  
Neurovědy

**Abstract :**

Choline is being used in all mammalian cells as a precursor for synthesis of a major phospholipide phosphatidylcholine and as a donor of acetyl residues. Cholinergic neurons in addition require choline to synthesize neuromediator acetylcholine. The ability of cells to create choline via de novo synthesis is limited and therefore they need to transport choline from extracellular space. Limited availability of choline in brain leads specifically to diminished function of cholinergic neurons and in general to impaired reparation of biological membranes. Dysfunctions of cholinergic signaling in brain is characteristic for Alzheimer's disease.

Aim of this work was to investigate whether gene and protein expression of high-affinity cholinergic transporters is altered in 5-6 months old APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> mouse model of Alzheimer's disease. Expression of specific high-affinity cholinergic transporter CHT1 (responsible for transport of choline to be used for acetylcholine synthesis) and putative high-affinity choline transporter CTL1 (generally present in all cells and related to high affinity choline transport for phospholipide synthesis) in cerebral cortex was measured. Compared to non-transgenic littermates, no changes in the expression of both genes were detected at either mRNA (quantitative PCR) or protein (Western blot with antibody detection) levels. These findings indicate that the decrease in evoked acetylcholine release observed at this age is not due to reduced expression of these transporter proteins.

**Keywords :**

Amyloid  $\beta$   
Alzheimer's disease  
Choline  
CTL1  
CHT1  
Neuroscience

## 2. Seznam zkratek

A $\beta$  -  $\beta$ -amyloid

AD – Alzheimerova choroba

ADAM – proteinová rodina disintegrinů a metaloproteáz

APH-1 – podjednotka  $\gamma$ - sekretázového komplexu

APOE – apolipoprotein E

APP – prekurzorový protein amyloidu

BACE1 –  $\beta$  sekretáza štěpící APP

FTD – fronto-temporální demence

GAPDH – glyceraldehyd-3-fosfát-dehydrogenáza

GSK3 – kináza glykogensyntázy

OCT – transportér organických kationtů

PEN-2 – enhancer presenilinu 2

PKA – proteinkináza A

PKC – proteinkináza C

PPAR $\gamma$  – receptor pro peroxizomální proliferátor

PSEN1 – presenilin 1

PSEN2 – presenilin 2

MAPT - protein  $\tau$  asociovaný s mikrotubuly

NFT – neurofibrilární klubíčko

SAM – S-adenosylmethionin

$\tau$  protein – tau protein

TNF $\alpha$  – tumor nekrotizující faktor  $\alpha$

VACHT - vezikulární acetylcholinový přenašeč

v/v – objemové procento

w/v – hmotnostní procento



## 3. Literární úvod:

### 3.1. Alzheimerova choroba

#### 3.1.1. Patogeneze

Alzheimerova choroba (AD) představuje nejčastější příčinu senilní demence diagnostikovanou v současné populaci. Onemocnění způsobuje postupnou ztrátu kognitivních funkcí, a to specificky těch, které souvisí s pamětí. Pacienti trpí poruchami epizodické paměti, mají problém vzpomenout si na události běžného života. Nemoc postupně spěje až do finálního stádia, ve kterém jsou imobilní a inkontinentní, kompletně odkázaní na pomoc svého okolí. V současnosti je na světě diagnostikováno přes 12 000 000 lidí postižených AD. Průměrná doba dožití pacientů s diagnostikovanou AD je 9 let.

Poprvé byly dvě charakteristické patologické změny AD nalezeny Aloisem Alzheimerem v roce 1907 v mozku pacientky postižené senilní demencí [1]. Nález těchto dvou typů lezí v mozku pacientů při *post mortem* vyšetření představuje dodnes specifický průkaz onemocnění. Alzheimer objevil „zvláštní substanci“ v mezibuněčném prostoru, která se vyskytovala v určitých částech mozku, ta je nyní nazývána senilní plak. Dále Alzheimer popsal specifický typ intracelulárních lezí, nazývaných neurofibrilární klubíčka.

Až v osmdesátých letech minulého století byly zjištěny látky obsažené v těchto lezích. U senilních plaků je to především polypeptid  $\beta$ -amyloid ( $A\beta$ ) [2, 3]. U neurofibrilárních klubíček je to hyperfosforylovaný protein  $\tau$  [4, 5]. Přítomnost těchto dvou typů lezí není však jediným patologickým projevem v mozku pacientů. U pacientů se manifestují také funkční změny, jako je například oxidativní stres nebo zánětlivý proces [6, 7]. Následky těchto změn mají za následek na buněčné úrovni ztrátu synapsí a posléze odumírání neuronů. V době smrti může mozek pacienta s AD vážit až o jednu třetinu méně než mozek stejně starého zdravého jedince. Zkoumání příčin a hledání terapie pro AD má vysoký význam. Bylo předpovězeno, že posunutí nástupu AD o několik let by mělo velmi významný dopad na počet pacientů s těžkou AD v průběhu příštích padesáti let [8].

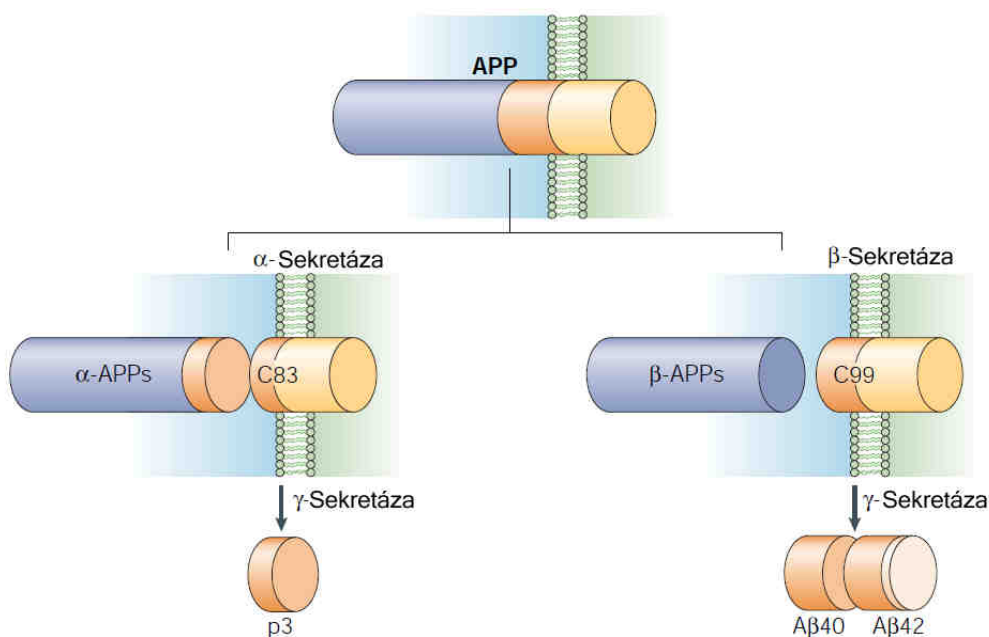
Z hlediska genetické podmíněnosti AD můžeme onemocnění rozdělit na dva typy. Jednak typ s časným nástupem onemocnění (před šedesátým rokem věku), který má známé

genetické pozadí a vyskytuje v rodinách pravidelně. Dále typ sporadický, u kterého je genetická komponenta také přítomná, není však zcela zřejmá.

U časně AD se jedná o autozomálně dominantní onemocnění způsobené mutací v jednom z tří genů: APP (protein prekurzor amyloidu) nebo podjednotek  $\gamma$ -sekretázy PSEN1 nebo PSEN2 (presenilin 1 a 2). Mutace nalezené u pacientů s časnou AD ovlivňují proteolytický sestřih APP a vedou ke zvýšení tvorby  $A\beta$  [9]. Zvláštním případem je Downův syndrom, který je podmíněn trisomií 21 chromosomu, na kterém se nachází gen pro APP. V tomto případě dochází díky přítomnosti třetí kopie normálního genu ke zvýšené tvorbě přirozeného APP, což má za následek zvýšení tvorby  $A\beta$  (gene dosage effect). U sporadické formy onemocnění byla popsána celá řada genů, souvisejících s rizikem vzniku AD. Bohužel u většiny z nich existují protichůdná pozorování a jejich přímý podíl na vzniku sporadické formy onemocnění nebyl zatím jednoznačně určen [10]. Při hledání genů zodpovědných za projevy sporadické formy onemocnění byly pomocí celogenomových asociačních studií nalezeny geny, jejichž funkce souvisí s metabolismem  $A\beta$ . Jedná se o proteázy, buněčné receptory, signalizační proteiny, komponenty buněčného cytoskeletu a vezikulárního transportu. V neposlední řadě sem patří jediné jasně charakterizované chromozomální místo se vztahem k sporadické formě onemocnění, kódující protein apolipoprotein E (APOE) [11]. Funkce tohoto transportního proteinu, který se vyskytuje ve variantách APOE2, APOE3 a APOE4, souvisí s regulací plazmatických hladin cholesterolu. Není zřejmě náhodou, že byl pozorován regulační vztah mezi senilními plaky,  $A\beta$  a cholesterolovým metabolismem [12, 13].

Molekulární mechanismy vzniku senilních plaků a neurofibrilárních klubíček byly již do značné míry prostudovány. Ne zcela jasný je však vztah mezi primární formou vnikajícího  $A\beta$  a defekty pozorovanými na buněčné úrovni. Proces vzniku  $A\beta$  z APP představuje sérii proteolytických štěpení pomocí tří membránových sekretáz –  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$ . Štěpení APP může probíhat dvěma cestami (Obr. 1). V prvním případě je APP štěpeno pomocí  $\alpha$  sekretázy. Toto štěpení vyvolává uvolnění fragmentu APPs- $\alpha$ , který je solubilní, a v membráně zůstává C-terminální úsek o délce 83 aminokyselin. Toto štěpení probíhá uvnitř oblasti  $A\beta$  a tudíž je tzv. neamyloidogenní. Enzym  $\alpha$  sekretáza patří do rodiny

ADAM proteinů (obsahuje disintegrin a další metaloproteázy) [14]. Po odštěpení solubilní části je membránový zbytek APP štěpen  $\gamma$  sekretázou, která z něj uvolňuje p3 fragment. Kromě této cesty, která je u zdravého jedince majoritní, může štěpení APP probíhat také tzv. amyloidogenní cestou. Při tomto způsobu štěpení je APP nejprve štěpen  $\beta$  sekretázou [15], která uvolňuje kratší solubilní část.  $\beta$  sekretáza (BACE1) byla identifikována jako transmembránový protein s aspartát – proteázovou aktivitou. Delší zbývající membránová část APP o délce 99 aminokyselin je dále štěpena  $\gamma$  sekretázou. Výsledkem tohoto štěpení jsou nejčastěji dva typy  $A\beta$  o délce 40 a 42 aminokyselin [16]. Delší amyloidové řetězce vykazují výrazně vyšší tendenci agregovat. Enzym  $\gamma$  sekretáza je neobvyklá membránová proteáza, skládající se nejméně ze čtyř podjednotek – PSEN1/2, nicastrin, APH1 (anterior pharynx-defective 1) a PEN2 (presenilin enhancer 2) [17].



Obr. 1. Štěpení APP prekurzoru  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$  proteázami. Modře označný solubilní fragment, žlutě intracelulární část a červeně  $A\beta$ . Převzato z [18].

Amyloidogenní cesta je u zdravého jedince minoritní a množství produkovaného  $A\beta_{42}$  je velmi nízké. V případě zvýšené produkce dochází k postupné agregaci  $A\beta$  nejprve

do oligomerů a následně do protofibril a fibril. Vyšší organizační struktury A $\beta$  jsou nerozpustné a vykazují výrazný patogenní účinek na neurony. V poslední době se ale čím dál tím více ukazuje, že již samotné monomerní a oligomerní formy vyvolávají buněčné pochody, podílející se na patogenezi AD. Jedná se jednak o ovlivnění synaptické plasticity [19], aktivity nikotinových receptorů [20], dále také ovlivnění mitochondriálního metabolismu [21], indukci apoptózy (v důsledku změn v regulaci buněčného cyklu, produkce kyslíkových radikálů a modulace apoptogenních faktorů) a vápníkové homeostázy. Avšak není zatím vůbec jasné, jestli pochody související s buněčnou smrtí jsou primárním důvodem vzniku kognitivního deficitu u pacientů s AD [22].

Řada studií se domnívá, že vznik senilních plaků a neurofibrilárních klubíček představuje až pozdní fázi AD. V iniciační fázi charakterizované vznikem rozpustných agregátů (oligomerů) A $\beta$ , dochází, jak bylo výše zmíněno, k ovlivnění celé řady intracelulárních dějů souvisejících s produkcí kyslíkových radikálů. Zejména se jedná o poruchy funkce mitochondrií a dále změny v metabolismu iontů kovů [23]. Bylo ukázáno, že existuje vztah mezi zvýšeným oxidativním stresem a indukcí agregace A $\beta$  [24]. Studie popisující oxidační zátěž u myších modelů AD operují *de facto* s autozomálně dominantní formou choroby a extrapolace na stav u sporadické formy AD je třeba provádět s nejvyšší opatrností. U myších modelů byly nalezeny lipoperoxidační produkty (výsledky ataků kyslíkových radikálů na membránové lipidy), karbonylace na proteinech a kompenzační změny v množství antioxidantních enzymů jako je glutathionperoxidáza a superoxiddismutáza [25, 26]. Pomocí křížení myší s nadměrnou expresí mutovaného APP vykazujících příznaky AD s myši s deficitem transportního proteinu pro  $\alpha$  – tokoferol byla ukázána závislost mezi oxidačním stresem a vznikem senilních plaků. Zvýšený oxidační stres u těchto zvířat vyvolával rychlejší vznik A $\beta$  depozit [27]. Naopak u transgenních myší s mutantní formou proteinu  $\tau$ , kterým byl  $\alpha$  – tokoferol podáván, se projevil menší patologický efekt zároveň s nižším oxidativním poškozením mozku [28].

Druhým histologicky patrným znakem mozkové tkáně pacientů s AD jsou neurofibrilární klubíčka. Neurofibrilární klubíčka jsou z převážné části tvořena hyperfosforylovaným proteinem  $\tau$  (kódovaný genem MAPT - microtubule-associated

protein  $\tau$ ). Za fyziologických podmínek je protein  $\tau$  asociován s mikrotubuly a je lokalizován v axonech neuronů, kde se podílí na jejich výstavbě, stabilizaci a retrográdním transportu [29, 30]. Protein  $\tau$  patří mezi často fosforylované proteiny a to na mnoha serinových a threoninových zbytcích. Fosforylace inhibuje jeho vazbu na mikrotubuly [31]. V patologických situacích je hyperfosforylován a to jak na běžných tak na běžně nefosforylovaných epitopech [32]. Mikrotubuly bez proteinu  $\tau$  depolymerují [33] a hyperfosforylovaný protein  $\tau$  agreguje a je v buňkách ukládán ve formě neurofibrilárních klubíček.

Protein  $\tau$  se kromě AD účastní řady dalších patologických stavů jako je Pickova choroba, dementia pugilistica a kortikobazální degenerace [34, 35]. Patologické stavy vycházející z poruch funkce proteinu  $\tau$  nemají zcela jednoznačný molekulární mechanismus. Jako pravděpodobné mechanismy se berou v úvahu změny fosforylace, interakce s tubulinem a agregace do filament [36]. Neurodegenerativní změny související s proteinem  $\tau$  nejsou vázány pouze na jeho nefunkčnost – myši s knockoutovaným proteinem  $\tau$  vykazují slabou svalovou poruchu, avšak nejsou postiženy neurodegenerativními změnami [37].

Myší kmeny s modifikovaným proteinem  $\tau$  jsou využívány jako modely neurodegenerativních onemocnění souvisejících s mutacemi v proteinu  $\tau$  [38]. Kříženci těchto kmenů a kmenů nesoucích APP mutovanou alelu byli s úspěchem využiti jako modelové organizmy pro studium AD [39].

AD tedy spíše představuje komplexní syndrom, než jednoduché onemocnění. Vzhledem k problematické dostupnosti lidského biotického materiálu se pro výzkum dopadů AD na mozkovou tkáň s úspěchem využívá zvířecích modelů.

### 3.1.2. Přístupy ke studiu – modelové organizmy

Objevení lidských dědičných forem AD a fronto-temporální demence (FTD) souvisejících s mutacemi v genech PSEN1 a 2, APP a MAPT umožnilo vytvoření transgenních zvířecích modelů pro studium těchto neurodegenerativních poruch [40].

Pro studium AD jsou využíváni jednak obratlovci, kteří lépe reprezentují stav lidského mozku, a jednak bezobratlí (*Drosophilla melanogaster* – ovocná muška, *Caenorhabditis elegans* – hlíst). Výraznou výhodou využití bezobratlých je jednodušší genetická manipulace a rychlá generační doba spojená s nízkými náklady na chov. Tyto vlastnosti dohromady umožňují provádění experimentů ve větším měřítku – například testování farmak a podobně [41].

U ovocných mušek byl exprimován jednak normální a jednak mutovaný lidský protein  $\tau$ . Expres obou forem vyvolávala progresivní neurodegeneraci a předčasnou smrt [42]. Neurodegenerativní změny v transgenních muškách probíhaly bez přítomnosti neurofibrilárních klubíček, což odpovídá výsledkům na myším modelu, kde byl ukázán vliv solubilních forem agregátů  $\tau$  na patologické změny v neuronech [43]. Při koexpresi proteinu  $\tau$  a protein kinázy GSK3 došlo ke vzniku vláken proteinu  $\tau$ , což potvrzuje roli fosforylace při vzniku neurofibrilárních klubíček [44]. Na modelu ovocných mušek byl dále studován vliv a mechanismus působení oxidativního stresu na AD a FTD. Genetické vyřazení antioxidantních mechanismů způsobilo zvýšenou toxicitu exprimovaného proteinu  $\tau$  a odumírání neuronů. Naopak podávání  $\alpha$ -tokoferolu potlačilo toxicitu proteinu  $\tau$  [45]. Jedním z patologických znaků popsaných u AD je také zvýšený oxidační stres, a tudíž mají tyto nálezy přímý dopad i na výzkum AD. Bylo zjištěno, že existuje potenciační vztah mezi působením proteinu  $\tau$  a  $A\beta$  a že je fosforylace proteinu  $\tau$  pro tento mechanismus nezbytná [46].

Studium působení APP na vývoj AD u ovocných mušek bylo prováděno pomocí exprese lidských mutovaných variant APP [47]. U těchto organizmů je zachována přítomnost  $\gamma$  sekretázového komplexu [48], avšak  $\beta$  sekretázová aktivita je velmi nízká nebo žádná [47]. Toxicita lidského APP závisí na  $A\beta$  i C – terminálním fragmentu. Aktivita exprimovaných lidských mutantních presenilinů souvisela u mušek s věkem nástupu AD

fenotypu, což potvrzuje hypotézu, že závažnost hereditárních onemocnění u lidí souvisí s mutací v presenilinu a ne s genetickými a epigenetickými modifikátory [49]. Pomocí tohoto modelu byla dále prokázána vazba mezi proteázovou aktivitou a působením A $\beta$ , koexprese mutantního presenilinu s ubiquitinem vedla k odstranění degenerace očí – fenotypu, který se ukazuje u mušek s expresí mutovaného presenilinu. Koexprese mutovaného APP spolu s ubiquilinem snižovala množství APP [50].

Výhodou použití *Caenorhabditis elegans* je ještě snazší genetická modifikace než u *Drosophila melanogaster* a proto jsou využíváni k farmaceutickému a genetickému vyhledávání. Na tomto modelu byly také charakterizovány dvě komponenty  $\gamma$  sekretázového komplexu (APH-1, PEN-2) [51]. Kladení vajíček je u háďátek caenorhabditů používáno jako jeden z testů motorických schopností, u mutací homologu PSEN proteinu *sel-12* bylo ukázáno porušení schopnosti klást vajíčka [52]. Z toho lze usuzovat na ovlivnění motorických funkcí mozku hlísta.

Pro využití detailnějších behaviorálních studií a také pro bližší podobnost s člověkem jsou využívány myší transgenní kmeny. Byly připraveny tři skupiny myších kmenů nesoucích lidské proteiny APP, PSEN1 a protein  $\tau$ .

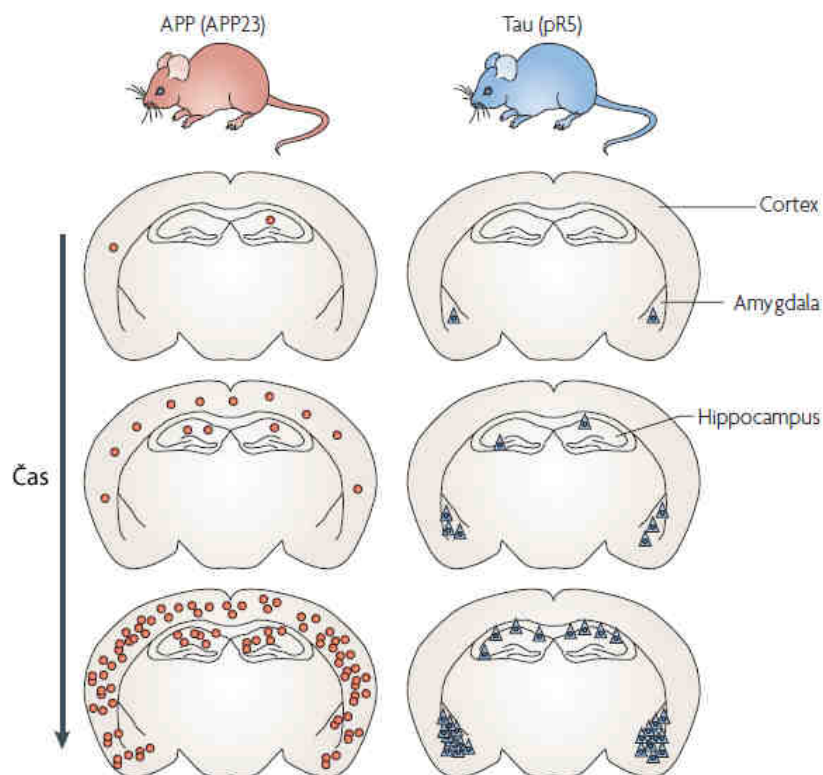
První připravený kmen exprimující lidský protein  $\tau$  exprimoval v neuronech pouze nemutovanou variantu. U tohoto modelu byly pozorovány solubilní agregáty proteinu  $\tau$  a hyperfosforylace, ne však NFT [53]. Po pěti letech byl připraven myší model nesoucí mutantní lidský protein  $\tau$  (P301L), který reprodukoval v myši přítomnost NFT [54]. Myši exprimující tuto mutaci pod různými promotory se staly často používaným modelem pro studium patogenních mechanismů souvisejících s neurodegenerací. Bylo dále ukázáno že vznik NFT není jediným a hlavním patogenetickým mechanismem proteinu  $\tau$ . I jeho solubilní agregáty jsou neurotoxické a naopak ukládání NFT nemusí být spojeno s behaviorálními defekty [43]. Obecně fenotyp ztráty synapsí a zánětu lze využít pro studium odpovídacích fenoménů u AD.

Dalšími myšími kmeny, které byly připraveny, jsou kmeny, v nichž byla ovlivněna aktivita  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$  sekretáz, pomocí exprese mutované formy PSEN1 ( $\gamma$  sekretázová podjednotka) a knockoutu BACE1 ( $\beta$  sekretáza). U mutací presenilinu bylo ukázáno

na genetickém pozadí APP transgenní myši, že probíhá kompetice mezi mutovanou a normální formou, která způsobuje omezení fenotypu u transgenní myši, která má stále původní myši PSEN1 [55]. Behaviorální postižení bylo u myši patrné už před objevením depozit A $\beta$ , což ukazuje na roli solubilní formy v degenerativním procesu [56]. Přenos knockoutu  $\beta$  sekretázy na pozadí APP transgenní myši způsobil snížení depozice A $\beta$  [57] a naopak její zvýšená produkce způsobila zrychlení ukládání A $\beta$  [58]. Zvýšená exprese  $\alpha$  sekretázy (ADAM10) v APP transgenní myši také omezila vznik A $\beta$  depozit a zlepšila behaviorální profil myši [59].

Velmi často používaným modelem jsou také myši nesoucí APP v některé z jeho lidských mutací. U těchto myši se vyskytují senilní plaky i defekty v paměťových schopnostech. Tento druh transgenních myši je nejčastějším modelem pro studium patogeneze AD. Jak již bylo výše zmíněno, existuje zřejmě vztah mezi funkcí APP a proteinu  $\tau$ . Křížením kmene s mutovaným proteinem  $\tau$  a kmene s transgenním APP bylo ukázáno že dochází k potenciaci fosforylace proteinu  $\tau$  a zvýšení vzniku NFT [60]. Tento jev by mohl být způsoben enzymem GSK3 $\beta$  kinázou (kináza glykogen syntázy) [61]. O GSK3 kináze je známo, že reguluje také maturaci APP [62]. Kombinací transgenních kmenů nesoucích mutace a knockouty APP<sup>swe</sup>,  $\tau$  P301L a PSEN1 M146V/- byl připraven myší kmen, který nejlépe napodobuje lidskou AD [63]. Obecně bylo zjištěno, že kombinatoriální modely několika knockoutů/transgenů nejlépe modelují patologii lidské AD, i když u lidí nebyly při AD mutace proteinu  $\tau$  popsány. Tyto kmeny mohou vznikat jednak křížením jednoduchých kmenů a jednak dvojitou transgenézí. Byla provedena analýza lokalizace oblastí mozku postižených lezemi u transgenních myši exprimujících mutovaný APP i protein  $\tau$  a bylo ukázáno, že APP transgenní myši hromadí leze nejprve v kůře a následně v hippocampu, zatímco  $\tau$  transgenní myši hromadí leze v amygdale a poté v hippocampu (Obr 2).





Obr. 2. Přítomnost lezí v rozvoji AD u transgenních myších modelů. Modře označený  $\tau$  transgenní kmen, červeně APP. Převzato z [64].

U těchto myších kmenů byly provedeny behaviorální studie a bylo potvrzeno, že jejich chování odpovídá částečně psychologickému profilu AD u člověka (deprese, iritabilita, poruchy paměti, schopnost plánovat postupy krok za krokem) [65].

Kromě těchto modelů byly dále zkoumány transgenní myši s knockouty a mutacemi rizikového genu AD APOE, při čemž pokles exprese APOE vyvolal pokles koncentrace a ukládání  $A\beta$  [66].

Dále byl pomocí transgenních myší zkoumán vliv axonálního transportu na progresi AD a vznik senilních plaků. Bylo zjištěno, že zkrřížení myšího kmene se sníženým množstvím lehkého řetězce kinesinu ( $K1c^{+/-}$ ) s APP transgenním kmenem vedlo ke zvýšení axonálního defektu a amyloidogenního štěpení APP [67].

V této práci byl využíván specifický transgenní model nesoucí konstrukt vytvořený z lidského genu nesoucího švédskou mutaci APP (K594M a N595L) a lidského presenilinu 1 s delecí exonu 9 [68]. Oba transgeny jsou integrovány v genomu za sebou a díky tomu se chovají jako jeden mendelovský lokus. Linie byla připravena na směsném C3HeJ×C57BL6/J pozadí myších kmenů. Pro další využití byl transgenní lokus pomocí zpětného křížení přenesen na čistý C57BL6/J kmen. Tyto myši vykazují přítomnost A $\beta$  depozit již v šestém měsíci věku a představují komerčně dostupný model AD. U těchto myší dochází díky mutované formě presenilinu k výraznému snížení poměru mezi A $\beta$ <sub>40</sub> a A $\beta$ <sub>42</sub> (zvýšení tvorby A $\beta$ <sub>42</sub>; liší se tendencí agregovat – viz výše) [69]. Podobný fenotyp byl pozorován u pacientů s mutací v PSEN1 [70].

Obecně vzato transgenní modely umožňují studium patogenních mechanismů AD, avšak všechny vycházejí z mutací způsobujících velmi vzácnou dědičnou formu onemocnění. Na modely, které by byly schopny rekapitulovat nástup a progresi sporadické formy (bez jasné genetické příčiny, majoritní v populaci), zatím ještě stále čekáme [71].

### **3.1.3. Hypotézy o patogenetických mechanismech**

Primární příčinný vztah mezi produkcí A $\beta$  z APP, změnou poměru produkce A $\beta$ <sub>40</sub> a A $\beta$ <sub>42</sub> a patogenezí AD lze považovat za prokázaný. Otázkou však zůstává, jakým způsobem dochází k progresi onemocnění a co vede k neuronálním a behaviorálním defektům, které u pacientů s AD pozorujeme. Z publikovaných dat bylo postulováno několik hypotéz o možném mechanismu patogeneze.

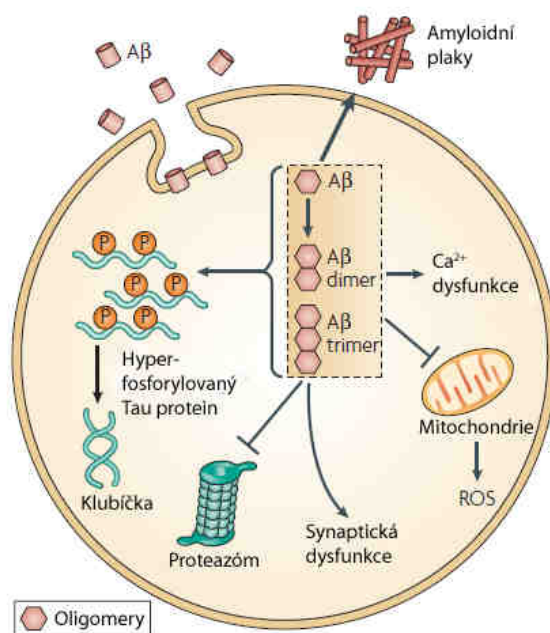
Klasickou hypotézou je A $\beta$  kaskádová hypotéza, která popisuje progresi onemocnění následovně. Zvýšení produkce A $\beta$  vyvolává jeho agregaci až do formy, která je nesolubilní a ukládá se v extracelulárních lezích. Tyto tzv. senilní plaky mají negativní dopad na funkci a životaschopnost neuronů a vyvolávají zároveň zánětlivé procesy v mozku pacientů. Zapojení proteinu  $\tau$  se předpokládá tak, že zvýšená koncentrace A $\beta$  stimuluje fosforylaci proteinu  $\tau$  nepřímo v důsledku porušené iontové homeostázy a tím vyvolává vznik druhého typu intracelulárních lezí – neurofibrilárních klubíček [72, 73].

Celá řada publikací však ukazuje na fakt, že defekty neurotransmise se minimálně na biochemické úrovni ukazují již v časných fázích onemocnění, u nichž ještě

extracelulární leze nejsou přítomny. Následující „alternativní“ hypotézy souvisejí s intracelulárním působením A $\beta$  solubilních forem na buněčnou fyziologii. Bylo ukázáno, že intracelulární A $\beta$  je lokalizován v pozdním endosomu a ovlivňuje vápníkovou homeostázu [74], funkci proteasomu a vesikulární transport [75], stavbu a funkci cytoskeletu [76] a funkci mitochondrií [77] (Obr 3).

Vzhledem k vlivu A $\beta$  na funkci mitochondriálního respiračního řetězce, metabolismus iontů kovů a aktivaci zánětlivých procesů, byla postulována tzv. radikálová hypotéza, která předpokládá, že neurodegenerativní proces přítomný u pacientů s AD je vyvolán zvýšeným oxidativním stresem způsobeným právě těmito ději. To vede k poškození neuronů a jejich odumírání apoptotickými a nekrotickými procesy [73].

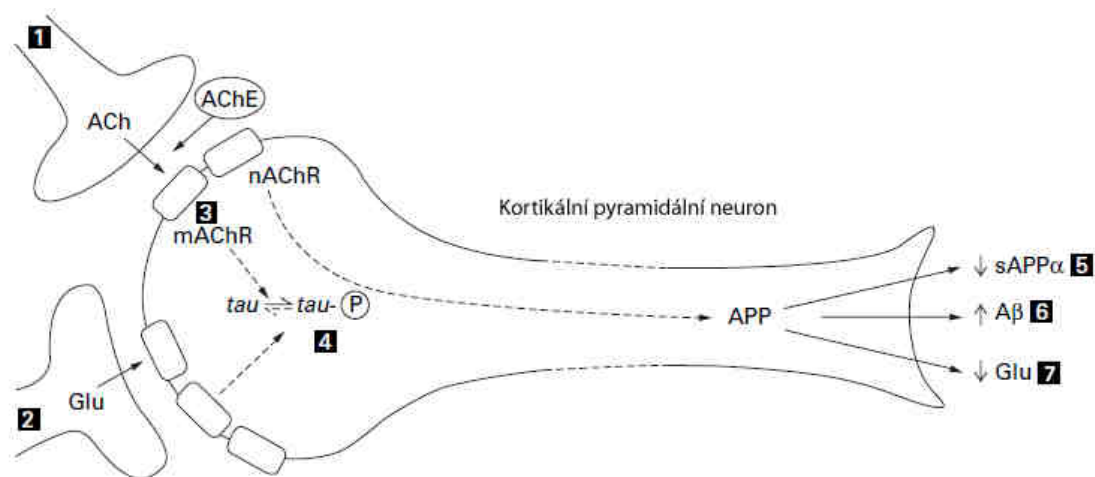
S funkcí mitochondriálního respiračního řetězce souvisí také hypotéza, která neuronální deficity připisuje postižení axonálního transportu. Bylo ukázáno, že mitochondrie obsahují komponenty  $\gamma$  sekretázového komplexu a byla ukázána přítomnost APP ve vnější i vnitřní membráně mitochondrií. Zároveň bylo zjištěno, že přítomnost A $\beta$  v mitochondriích vyvolává pokles spotřeby kyslíku, tj. inhibici respiračního řetězce, a akceleruje mitochondriální produkci kyslíkových radikálů. Výsledkem tohoto děje je oxidativní stres a energetická deprivace (nedostatek ATP). V souvislosti s ovlivněním funkce proteinu  $\tau$  (indukce hyperfosforylace v důsledku přítomnosti A $\beta$  – předpokládaná role GSK3 kinázy) a mikrotubulů následně dochází k špatnému transportu mitochondrií mezi tělem neuronu a axonem. Tento jev vede k degeneraci axonu a působí tedy přímo synaptické poruchy [21].



Obr. 3. Intracelulární patologické působení A $\beta$ . Upraveno z [78].

Kromě těchto hypotéz byla na základě přítomných kognitivních poruch a *in situ* pozorovaného poklesu cholinergních markerů formulována tzv. cholinergní hypotéza. Tato hypotéza předpokládá, že existuje přímý účinek solubilního A $\beta$  na cholinergní neurotransmisi. Místem, které spojuje defekty na biochemické a kognitivní úrovni by měly dle této hypotézy být pyramidální neurony kůry. V rané fázi onemocnění dochází ke ztrátě cholinergní inervace korových oblastí a snížení produkce glutamátu [79] v důsledku cytotoxicity A $\beta$ . To způsobuje pokles aktivace dendritických zakončení pyramidálních neuronů. Působení A $\beta$  také porušuje spřažení mezi aktivací muskarinových receptorů a uvolňováním druhých posílů. Tento jev iniciuje fosforylaci proteinu  $\tau$  a vede druhotně ke vzniku neurofibrilárních klubíček. Souvisí patrně se sníženou aktivitou proteinkinázy C, v jejímž důsledku je aktivována GSK3 [80]. Důsledkem toho je také snížená aktivita  $\alpha$  sekretázy a zvýšení produkce A $\beta$  v těchto neuronech [81, 82]. Dále dochází k poklesu produkce glutamátu na neuritech těchto neuronů (schematický popis Obr. 4). Toto významné naruší neurotransmitterových systémů v korových neuronech následně

způsobuje kognitivní poruchy u pacientů. Pro tuto hypotézu mluví i několik publikací, ve kterých byl prokázán pozitivní vliv inhibitorů acetylcholinesterázy na kognitivní deficit u AD [83].



Obr. 4. **Cholinergní hypotéza AD.** Upraveno z [83]. (1) redukováná korová cholinergní inervace; (2) pokles aktivity glutamátové neurotransmise způsobený synaptickými poruchami nebo ztrátou neuronů; (3) snížené spřažení muskarinových M1 receptorů s druhými posly; (4) iniciace hyperfosforylace  $\tau \rightarrow$  vznik NFT; (5) pokles aktivity  $\alpha$  sekretázy, (6) zvýšená produkce  $A\beta$ ; (7) snížená produkce glutamátu.

### 3.1.4. Terapeutické strategie a farmakologicky ovlivnitelné cíle pro léčbu AD

Jak již bylo výše řečeno, pro terapii AD neexistuje zatím ani kauzální ani příliš úspěšná symptomatická léčba. Snahy o kauzální léčbu - většinou ve stádiu preklinických zkoušek, se zaměřují na ovlivnění agregace  $A\beta$ . A to jednak ovlivněním funkce sekretáz a jednak změnami vlastní agregace peptidů. Bylo například zjištěno, že je  $A\beta$  pyroglutamizován a bylo ukázáno, že tato sekundární modifikace vede ke zvýšené agregaci  $A\beta$  peptidů. Byl testován inhibitor enzymu glutaminylycyklázy, jehož inhibice vedla ke snížení množství senilních plaků, zlepšení paměti a snížení zánětlivých procesů v mozku

myší [84]. Bylo testováno také agens ovlivňující agregaci A $\beta$ , avšak v klinických zkouškách bylo zjištěno, že působí zánětlivé reakce [85, 86]. S jistou mírou úspěšnosti se také setkává pasivní imunoterapie AD (pomocí protilátek proti A $\beta$ ), která snižuje množství senilních plaků. Byly prováděny též experimenty s aktivní imunizací, ty však měly za následek nebezpečné zánětlivé reakce v organismu [87].

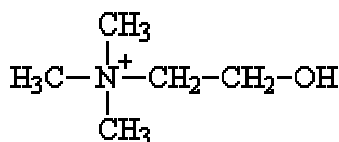
Vzhledem k přítomnosti kognitivního deficitu u pacientů a pozorovaným poruchám cholinergní neurotransmise se jako vhodné cíle jeví acetylcholinesteráza, jejíž inhibitory již jsou v praxi při léčbě kognitivního deficitu u pacientů s AD využívány, a receptory pro acetylcholin. Ve fázi klinických a preklinických testů jsou látky ovlivňující nikotinový acetylcholinový receptor  $\alpha 7$  a M1 muskarinový acetylcholinový receptor.

Přítomnost zánětlivých procesů v mozku pacientů s AD nabízí jako další farmaceuticky ovlivnitelné cíle modulátory zánětlivého procesu. Využívají se jednak látky ovlivňující signalizaci prostřednictvím TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor; jedna z nejsilnějších prozánětlivých drah) a jednak látky ovlivňující následné signální dráhy využívající transkripční faktor NF $\kappa$ B [88]. Jako další úspěšný cíl se ukazují také látky typu Rosiglitazon (modulátor PPAR $\gamma$ ), které také modulují zánětlivé procesy [89]. Kromě přímého ovlivnění zánětlivého procesu existují snahy o ovlivnění metabolismu neuronů postižených AD. Bylo totiž ukázáno, že se v těchto buňkách aktivuje DNA-polymeráza  $\beta$ , která nemá kontrolní aktivitu a může působit mutace v DNA [90]. Ty mohou být důvodem aktivace p53 proteinu a indukce apoptózy v nich [91].

Jako perspektivní postup se také jeví ovlivňování funkce genů, jejichž polymorfismy souvisejí se zvýšeným rizikem vzniku onemocnění, jako je apolipoprotein E, cystatin 3 a protein  $\tau$ . Veškeré zmíněné terapeutické přístupy jsou však zatím jen ve stádiu klinických a preklinických zkoušek a jejich skutečnou účinnost potvrdí až nasazení v populaci AD pacientů.

### 3.2. *Struktura a metabolismus cholinu*

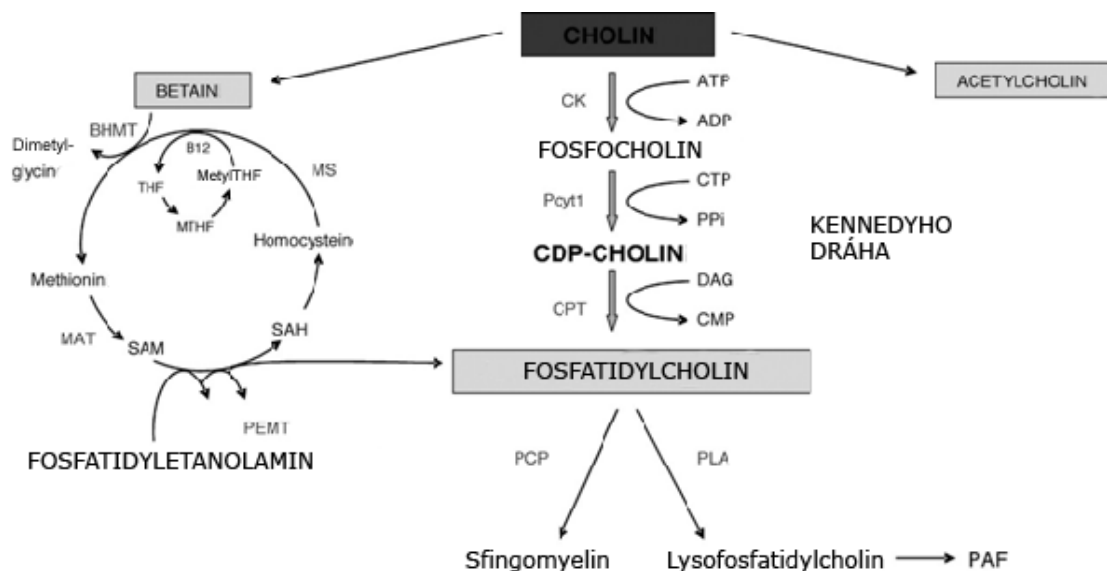
Cholin představuje základní živinu pro všechny živočichy. Byl objeven již v roce 1862 dr. Streckerem [92]. Jeho nedostatek v potravě stejně jako poruchy cholinového metabolismu mají významné negativní dopady na fungování organismu. Nedostatečný příjem cholinu působí negativně na funkci jater (vede ke vzniku tzv. nealkoholických ztučnělých jater) a ovlivňuje též kancerogenní procesy. Působení cholinu na regulaci buněčné proliferace a přežívání souvisí s úlohou cholinu v regulaci genové exprese apoptotických genů a genů regulujících průchod buněčným cyklem [93, 94]. Snížený příjem cholinu také ovlivňuje fosfolipidový metabolismus [95]. V těhotenství může nedostatek cholinu způsobovat jednak defekty při tvorbě neurální trubice a v pozdějším gestačním období negativně ovlivňovat vývoj mozku a jeho funkcí [96]. Na modelu laboratorních potkanů bylo pozorováno, že nasazení diety bohaté na cholin má pozitivní efekt na behaviorální schopnosti narozených potomků a že tento pozitivní efekt přetrvává až do dospělosti [97-99]. Z hlediska chemické struktury představuje cholin kvarterní amin – (2-hydroxyetyl) trimetylamoniumhydroxid (Obr. 5).



Obr. 5. Chemická struktura kationtu cholinu

Metabolismus cholinu probíhá třemi hlavními drahami (Obr. 6). Většina cholinu v buňkách je vázána ve formě fosfatidylcholinu (PC), který tvoří hlavní strukturní fosfolipid buněčných membrán. Kromě strukturní funkce se cholin podílí na metabolismu methioninu, kde slouží jako donor metylové skupiny. Dále může být také oxidován v mitochondriální matrix na betain, projde jednouhlíkovým cyklem a dává vznik S-adenosylmethioninu (SAM), který působí jako významné metylační činidlo v biologických dějích. Kromě úlohy v metabolických dějích je cholin prekurzorem neurotransmiteru

acetylcholinu, který zabezpečuje přenos signálu mezi neurony a neurony a efektorovými buňkami (např. nervosvalová plotýnka).

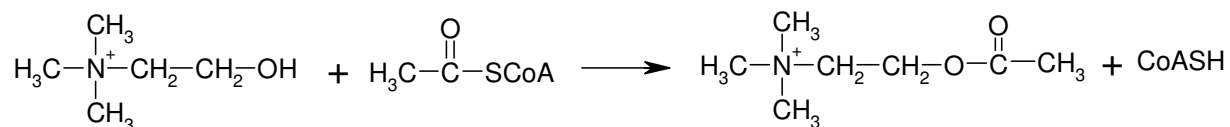


Obr. 6. **Metabolismus cholinu:** vlevo – jednouhlíkatý cyklus a metylace; uprostřed – syntéza fosfolipidů; vpravo syntéza acetylcholinu.

ADP, adenosindifosfát; ATP, adenosin trifosfát; BHMT, betain:homocystein metyltransferáza; B12, vitamin B12; CDP, cytidindifosfát; CK, cholinkináza; CPT, CDP-cholin:DAG cholinfosfotransferáza; CMP, cytidinmonofosfát; CTP, cytidin trifosfát; DAG, diacylglycerol; MAT, methioninadenosyltransferáza; methylTHF, 5-metyl-tetrahydrofolát; MS, methioninsyntáza; MTHF, 5,10-metylen-tetrahydrofolát; PAF, destičky aktivující faktor; PCP, fosfatidylcholin:ceramidcholin fosfotransferáza; Pcyt1, CTP:fosfocholinocytidyltransferáza; PEMT, fosfatidyletanolamin *N*-metyltransferáza; PLA, fosfolipáza A2; PPI, pyrofosfát; SAH, *S*-adenosylhomocystein; SAM, *S*-adenosylmethionin; THF, tetrahydrofolát. Převzato z Michel et al. 2006 [100]

V cholinergních nervových zakončeních je cholin využíván pro tvorbu neuromediátoru acetylcholinu. Acetylcholin vzniká acetylací cholinu pomocí Acetyl-CoA cholinacetyltransferázy.





Obr. 7. **Syntéza acetylcholinu**

Zdrojem acetylkoenzymu A pro tuto reakci je Krebsův cyklus. Acetylkoenzym A syntetizovaný v mitochondriích je transportován do cytoplazmy, kde dochází k vlastní acetylaci cholinu. Zdrojem cholinu pro tuto reakci je extracelulární tekutina a do cytoplazmy musí být cholin aktivně transportován pomocí proteinových přenašečů. Pouze jeho malá část pochází z degradace fosfolipidů nervového zakončení. Cholin v extracelulární tekutině kolem nervového zakončení *de facto* cykluje, jelikož jeho důležitým zdrojem je štěpení uvolňovaného acetylcholinu acetylcholinesterázou nebo butyrylcholinesterázou na volný cholin.

Kromě metabolických a signalizačních funkcí má cholin v živočišných buňkách také funkci strukturní. Produkt fosfatidylace cholinu – fosfatidylcholin, je důležitým fosfolipidem buněčných membrán a slouží také jako prekurzor pro syntézu dalších fosfolipidů a lipidových metabolitů (sfingomyelin, destičky aktivující faktor). S fosfolipidy souvisí i jediná dráha *de novo* syntézy cholinu z fosfatidyletanolaminu, pomocí reakce s SAM katalyzované fosfatidyletanolamin-N-metyltransferázou.

### **3.3. Transport cholinu**

Přenos molekul přes buněčné membrány může být charakterizován: přenosem molekuly z jedné strany membrány na druhou, specifitou přenašeče pro danou látku, izomerickou specifitou, kompetičním chováním mezi strukturně podobnými látkami a vysytitelností dle kinetiky Michaelise-Mentenové.

Systémy pro transport cholinu přes buněčnou membránu se dělí podle míry afinity k cholinu a závislosti děje na potenciálu sodných iontů [101]. Jedná se o nízkoafinitní a vysokoafinitní systémy. Oba tyto systémy se vyskytují v organismu, avšak na různých místech a s různými parametry. Nízkoafinitní transportní systém je přítomný v organismu ve většině buněk a má  $K_m$  pro cholin  $> 30 \mu\text{M}$ . Představuje primární zdroj intracelulárního cholinu pro syntézu fosfolipidů [102] a je nezávislý na potenciálu sodných iontů. Naopak vysokoafinitní systém má  $K_m < 10 \mu\text{M}$  a je lokalizován převážně do cholinergních nervových zakončení, kde transportuje cholin pro syntézu acetylcholinu [100]. Tento systém je závislý na potenciálu sodných iontů [101]. Cholin je do jisté míry také schopen pasivní difúze přes biomembrány, tento jev je však za fyziologického pH blokován [102, 103].

#### **3.3.1. Nízkoafinitní transport cholinu**

Nízkoafinitní transport cholinu je přítomen ve všech tkáních v organismu (hepatocyty, enterocyty, placenta, atd.). Původní pozorování a teorie předpokládaly pouhou pasivní difúzi [104]. Pozdější experimenty však ukázaly, že i tento transport probíhá pomocí aktivních proteinových přenašečů (stereospecifita transportu a kinetické parametry odpovídají aktivnímu jevu). Tento transport je nezávislý na gradientu sodných iontů a lze jej inhibovat analogy cholinu. Některé tkáně vykazují inhibici transportu hemicholiniem-3, látkou která je v nízkých koncentracích specifickým inhibitorem vysokoafinitního cholinového transportu [105]. Byla také změřena závislost tohoto jevu na teplotě, což spoluukazuje mechanismus, který je závislý na proteinu [106]. Pozdější experimenty ukázaly úlohu přenašečů organických kationtů rodiny 22 (OCT – organic cation

transporter). Tyto proteiny se podílejí na transportu různých organických kationtů, léčiv i exogenních toxinů [107].

### **3.3.2. Vysokoafinitní transport cholinu**

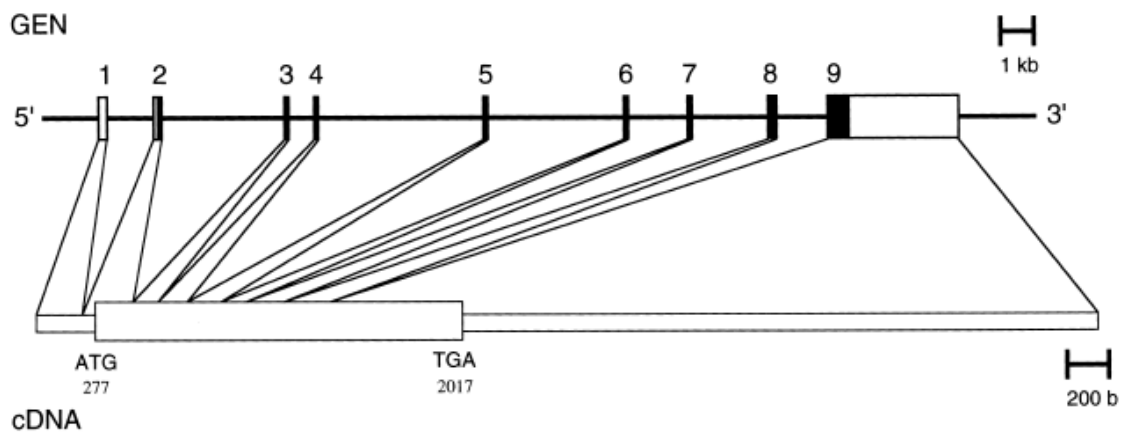
Vysokoafinitní transportní systém cholinu byl nejprve farmakologicky charakterizován v nervových zakončeních mozku [108-110]. Vyskytuje se především na presynaptických cholinergních zakončeních, kde je jeho hlavní funkcí dodávat cholin pro syntézu acetylcholinu. Tento transport je realizován proteinovým přenašečem, jehož aktivita závisí na přítomnosti potenciálu sodných a chloridových iontů [111]. Tento transport je specificky inhibován hemicholiniem-3. Inhibice probíhá tak, že se hemicholinium naváže s vysokou afinitou na přenašeč, avšak není transportováno. Těto vlastnosti hemicholinia-3 lze s úspěchem využít pro autoradiografické znázornění lokalizace míst vysokoafinitního transportu [108, 112]. Značení mozku <sup>3</sup>H-hemicholiniem ukázalo vysokou koncentraci vysokoafinitních míst v nucleus interpeduncularis, bazálních gangliích (nucleus caudatus a putamen), jádrech bazálního mozku a tuberculum olfactorium. Tato distribuce odpovídá mozkovým oblastem bohatým na cholinergní zakončení [113, 114] a v průběhu ontogenetického vývoje se zachovává [115].

Regulace vysokoafinitního transportu cholinu v nervových zakončeních je pravděpodobně nejvýznamnějším limitujícím krokem při syntéze acetylcholinu, jelikož nervové buňky savců nejsou schopné syntetizovat dostatečné množství cholinu a závisí tak na extracelulárních zdrojích [116-118]. Cholin tedy v cholinergních zakončeních cykluje mezi acetylovanou a deacetylovanou formou. Intracelulární cholin je v cytoplazmě cholinacetyltransferázou acetylován a pomocí vezikulárního acetylcholinového přenašeče (VACht) jsou vzniklým acetylcholinem naplněny malé membránové vezikly (synaptické váčky). Při depolarizaci cholinergního zakončení dochází k regulované exocytose synaptických váček a uvolnění acetylcholinu do synaptické štěrbině. Ihned po uvolnění dochází k jeho štěpení esterázami a uvolněný cholin je resorbován zpět do neuronu [119].

### 3.4. CHT1

#### 3.4.1. Genomické uspořádání

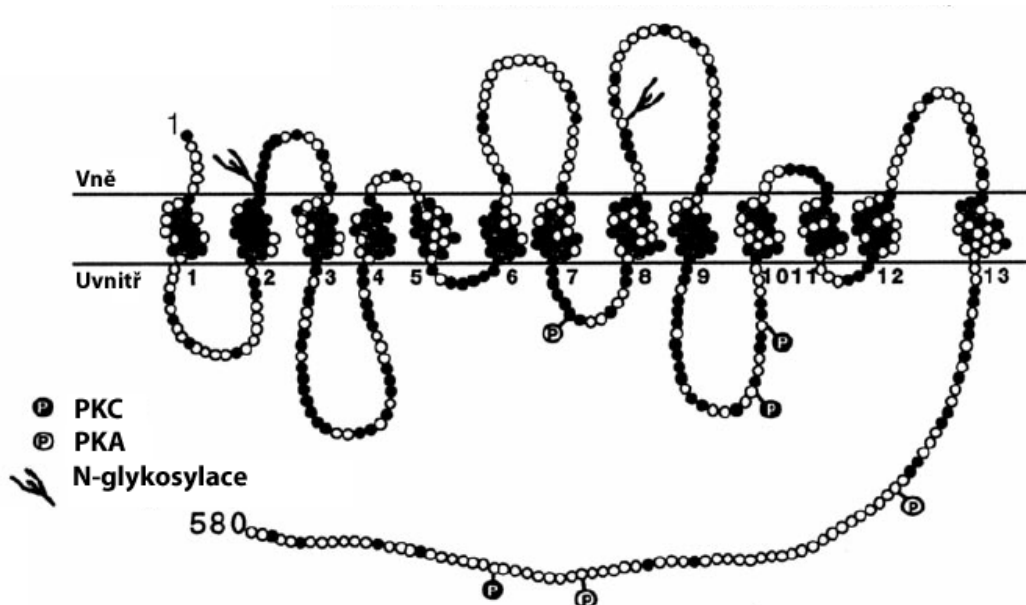
Savčí gen kódující cholinový transportér CHT1 je tvořen 25 kb úsekem, obsahuje devět exonů, z nichž devátý obsahující 3' netranslatovanou oblast a dlouhý terminační kodón (obsahuje více než dvě třetiny sekvence mRNA; Obr. 8) [120]. V lidském CHT1 genu byly nalezeny dva jednobodové polymorfismy, z nichž jeden asociuje s variabilitou rychlosti srdečního tepu související s cholinergní aktivitou [121]. Gen vykazuje tkáňově specifickou expresi - především v neuronech, exprimuje se ale také v některých neneuronálních buňkách (kožní epitel [122], endotel a hladké svalové buňky arteriálních stěn [123]). Transkribovaná primární RNA nevykazuje alternativní sestřih. Pomocí *in situ* hybridizace a northern blotů bylo ukázáno, že exprese CHT1 v cholinergních neuronech koreluje s přítomností dalších cholinergních markerů jako je ChAT a VAcHT [124-126]. mRNA produkovaná z genu CHT1 má velmi dlouhou 3' netranslatovanou oblast, posttranskripční regulační mechanismy však dosud nebyly popsány.



Obr. 8 **Lidský gen pro CHT1.**Upraveno z [120]. 1-9 exony, černě označená kódující oblast.

### 3.4.2. Struktura

Protein vznikající translací CHT1 mRNA představuje 580 aminokyselin dlouhý transmembránový protein, v němž bylo predikováno 13 transmembránových úseků. N konec proteinu je vystaven do extracelulárního prostoru, zatímco dlouhý volný C konec proteinu je lokalizován uvnitř buňky (Obr. 9.). Toto uspořádání, alespoň pokud se týká extracelulární lokalizace N konce proteinu, bylo potvrzeno pomocí epitopového značení živých buňk [127]. Analýza primární sekvence proteinu CHT1 odhalila přítomnost fosforylačních míst pro proteinkinázy A (PKA) a C (PKC). Význam těchto fosforylačních míst byl experimentálně potvrzen a bylo ukázáno, že změna aktivity proteinkináz a fosfatáz ovlivňuje aktivitu CHT1 [128-130]. Dále bylo ukázáno, že se CHT1 vyskytuje v buňkách jako fosfoprotein a že aktivátory PKC a inhibitory proteinfosfatázy 1 a 2A mohou snižovat transportní aktivitu a přítomnost proteinu na buněčném povrchu [131]. Bylo také ukázáno, že inhibice fosfatázy kalcineurinu vede ke snížení exprese CHT1 v plasmatické membráně a snížení transportní aktivity.



Obr. 9. Sekundární struktura CHT1 proteinu .Upraveno z [102]. 1-13 transmembránové úseky, P fosforylační místa pro proteinkinázy.

V primární aminokyselinové struktuře proteinu byla predikována glykosylační místa a experimentální výsledky skutečně potvrzují, že je protein glykosylován [132]. Bylo také experimentálně ukázáno pomocí pokusů s povrchovou biotinylací proteinu, že CHT1 na buněčném povrchu vytváří na SDS elektroforéze jediný pruh [127], zatímco na elektroforéze z buněčného lyzátu několik [126, 133]. Můžeme se tedy domnívat, že se specifický glykosylační „vzor“ uplatňuje při jeho lokalizaci v buňce. Je známým faktem, že právě glykosylace proteinů v Golgiho aparátu představuje významný regulační systém subcelulární lokalizace proteinů, experimentální ověření a popis přesného mechanismu u CHT1 však zatím chybí.

### **3.4.3. Předpokládaná funkce, regulační mechanismy a buněčná lokalizace**

CHT1 je hlavním přenašečem cholinu v cholinergních nervových zakončeních. V době jeho objevení se předpokládalo, že je stejně jako ostatní přenašeče přítomen hlavně v plazmatické membráně [134], kde se podílí na recyklaci cholinu ze synaptické štěrby do neuronu. Pomocí lokalizačních studií a buněčné frakcionace však bylo ukázáno, že je v buňce až 90% CHT1 proteinu přítomno v synaptických váčcích [132, 133, 135]. Byla postulována hypotéza, která tvrdí, že existuje přímá souvislost mezi aktivitou cholinergních neuronů a vezikulárním transportem CHT1 do plazmatické membrány. Ten následně vede ke zvýšené transportní aktivitě cholinu směrem ze synaptické štěrby, což umožňuje zároveň zvýšit rychlost uvolňování acetylcholinu při depolarizaci nervového zakončení. Kromě regulované (indukované) formy transportu CHT1 je přítomna také konstitutivní forma exocytózy, která se uplatňuje v udržování bazálního množství CHT1 nutného na povrchu buněk pro transport cholinu v klidovém stavu [127].

Stahování CHT1 proteinu z cytoplazmatické membrány probíhá pomocí clatrinových váčků. Byly publikovány práce, které ukazují, že také endocytóza CHT1 může představovat regulační krok při modulaci transportu cholinu [127, 135]. CHT1 obsahuje na C konci proteinu klasický dileucinový motiv, který je zodpovědný za vazbu clatrinu a adaptorových proteinů na membránové proteiny internalizované clatrinovými váčky [127]. Přítomnost tohoto motivu zaručuje krátkou dobu pobytu CHT1 proteinu

na cytoplazmatické membráně. Proto je zřejmě důležitá konstantní úroveň exocytózy CHT1, aby byla zajištěna základní míra transportu cholinu do neuronu.

Je také možné, že depolarizace neuronální membrány snižuje rychlost endocytózy (obecně) a tudíž zůstává na buněčném povrchu větší množství CHT1 pro transport cholinu. Tento názor vychází z experimentů porovnávajících množství CHT1 a VAcHT na plazmatické membráně, které ukázaly, že se zvyšuje množství CHT1 nikoli však VAcHT ve frakci cytoplazmatické membrány [132]. Funkce CHT1 přítomného v intracelulárních veziklích může být zásobní, ale může také, jako u některých jiných neurotransmiterových přenašečů, představovat další neznámou úlohu CHT1 v intracelulárním transportu cholinu. Bylo například ukázáno, že VAcHT může do synaptických váčků transportovat také cholin. CHT1 by zde mohl hrát opačnou úlohu a zabraňovat uvolňování tohoto cholinu do synaptické štěrbině při depolarizaci [136].

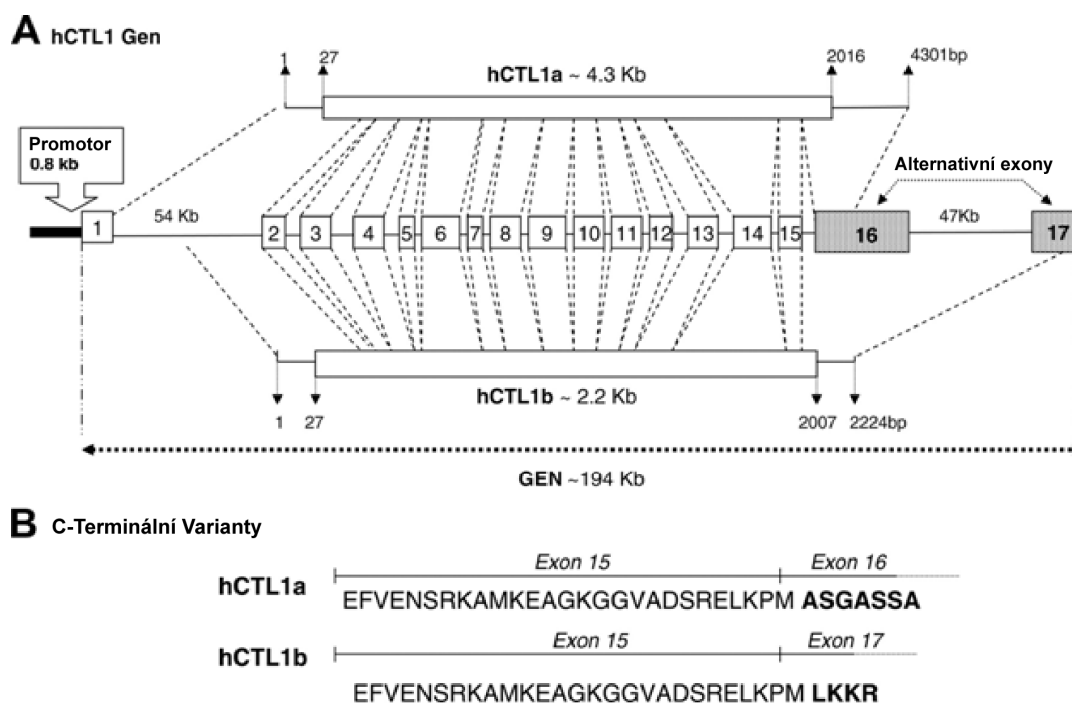
Množství „rezervního“ cholinového přenašeče v buňkách je zřejmě vysoce nadbytečné, což je pozorovatelné na modelu genového knockoutu CHT1 u myší. Homozygotní jedinci umírají do jedné hodiny po narození, zatímco u heterozygotů zůstává měřitelná transportní aktivita cholinergních neuronů na úrovni kontrol [117]. Relokace CHT1 mezi intracelulární zásobou a plazmatickou membránou pravděpodobně představuje také jeden z mechanismů synaptické plasticity, jak bylo ukázáno na experimentech s dlouhodobou stimulací pozornosti u krys (cholinergní zatížení) [137].

Vzhledem k tomu, že byl opakovaně ukázán cholinergní deficit u pacientů s AD a suplementační terapie cholinem nebyla příliš úspěšná, lze uvažovat o vlivu transportu cholinu v neuronech na patogenezi kognitivní deficeince AD a právě změny regulace a množství CHT1 jsou perspektivním objektem výzkumu.

## 3.5. CTL1

### 3.5.1. Genomické uspořádání

Gen pro CTL1 (Choline Transporter Like protein 1, cholinovému transportéru podobný protein 1) byl poprvé klonován jako supresor kvasinkového mutanta s deficientním transportem cholinu z cDNA knihovny paúhoře elektrického [138, 139]. Další savčí homology, kromě lidského, byly klonovány na základě sekvenční homologie [139]. Lidský CTL1 byl nalezen nezávisle na ostatních obratlovčích proteinech CTL1. Bylo totiž zjištěno, že protilátka rozpoznávající antigen dendritických buněk CDw92 rozpoznává CTL1 a následně byla potvrzena i sekvenční homologie konzervovaných úseků proteinu [140].



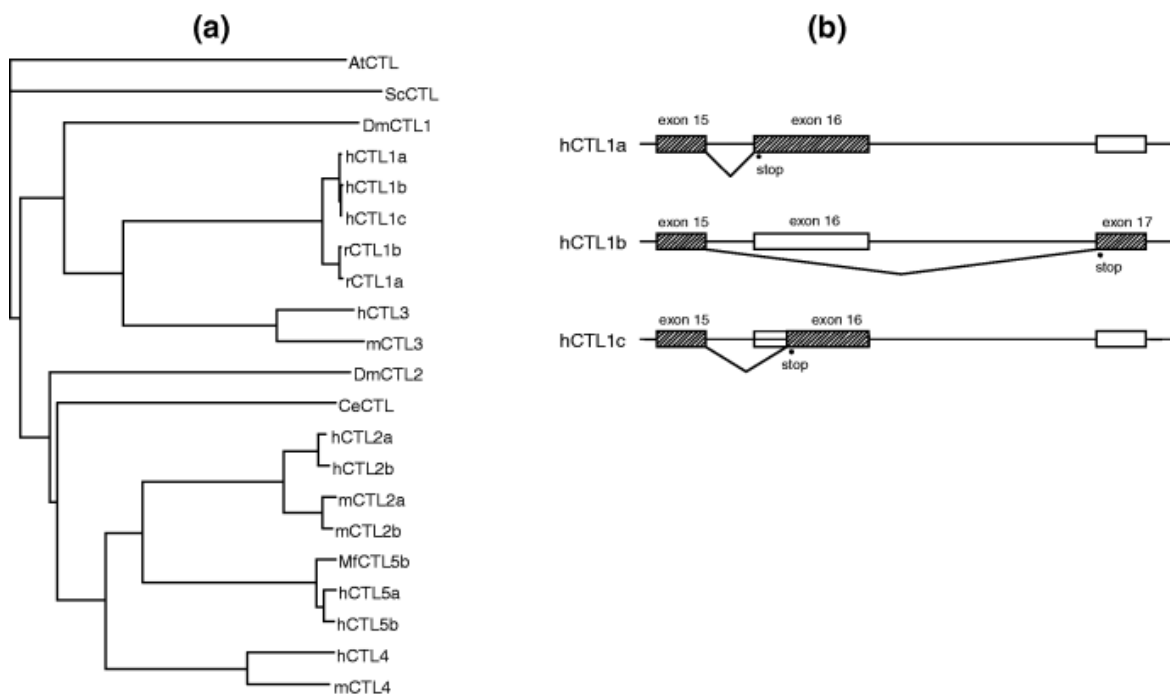
Obr. 10 **Genomová struktura lidského genu CTL1**. A - exon intronová struktura genu a alternativní sestřih hCTL1a a hCTL1b. B - výsledek alternativního sestřihu – odlišná proteinová C terminální sekvence. Převzato z Michel et al. 2006 [100]



Gen pro CTL1 patří mezi velké geny. Pokrývá 194 kilobází na chromozómu 9 – chromozomální oblast 9q31.2. Gen je složen z 17 exonů a 16 intronů. U dvou posledních exonů byl pozorován alternativní sestřih. Exony CTL1 mají velikost v rozmezí od 75 bp (exon 1) až po 2221 bp (exon 17). Intronické úseky vykazují také velkou délkovou variabilitu od 919 bp (intron 10) až po nejdelší 54 kb (intron 1). První a poslední intron jsou nejdelšími součástmi genu, tvoří více než polovinu jeho délky [141] (Obr. 10).

Promotorová oblast CTL1 genu obsahuje transkripční elementy typické pro tzv. „housekeeping geny“, jejichž exprese je nezbytná pro bazální metabolické funkce buněk. Promotor neobsahuje TATA box (obvyklá součást genu, která tvoří jádro promotoru), místo něj obsahuje úsek bohatý na guanosin, který může jeho funkci zastupovat. Tento úsek se nachází v promotorové oblasti i u jiných „housekeeping genů“. Kromě této oblasti obsahuje promotor CTL1 také vazebná místa pro transkripční faktory Sp1 a GATA1/2, které také patří mezi transkripční faktory iniciující expresi tohoto typu genů [141].

Při studiu genové exprese genu CTL1 byly nalezeny významné tkáňově specifické rozdíly v množství mRNA, a to i mezi různými druhy obratlovců. U myši byla exprese CTL1 mRNA měřena téměř ve všech tkáních, zatímco u krysa byla exprese specifická pro mozek, prodlouženou míchu a tkáň tračníku. Jak bylo již výše zmíněno, vykazuje mRNA pro CTL1 protein alternativní sestřih, což vede ke vzniku dvou proteinových izoform CTL1a a CTL1b. Tyto isoformy mají velmi odlišnou tkáňovou expresi. Odlišnost těchto forem vychází z použití odlišných posledních exonů, což na proteinové úrovni vede k změně C terminální sekvence proteinu [141]. U lidského CTL1 genu bylo popsáno ještě třetí sestřihové místo uvnitř exonu 16, které vede ke vzniku třetí isoformy CTL1c [140]. Obr. 11 ukazuje fylogenetickou analýzu homologů CTL1 genu a alternativní sestřih lidského CTL1.

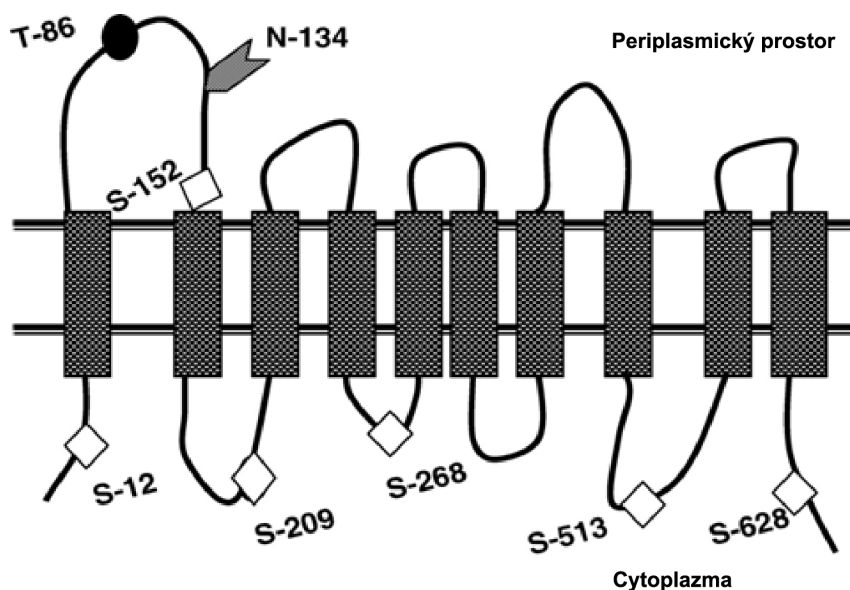


Obr. 11. **Fylogenetická analýza a genomické uspořádání genů CTL.** A – fylogenetický strom homologů CTL. B – Alternativní sestřih lidského CTL1. Převzato z Traiffort et al. 2005 [142].

Kromě genu pro CTL1 patří do této rodiny také geny pro CTL2-5. U genů CTL2 a CTL5 byl také pozorován alternativní sestřih a mají také podobnou délku intronů. Od CTL1 se však odlišují tím, že u nich k alternativnímu sestřihu dochází na N konci proteinu. U proteinů CTL3 a CTL4 nebyl zaznamenán alternativní sestřih vůbec [142].

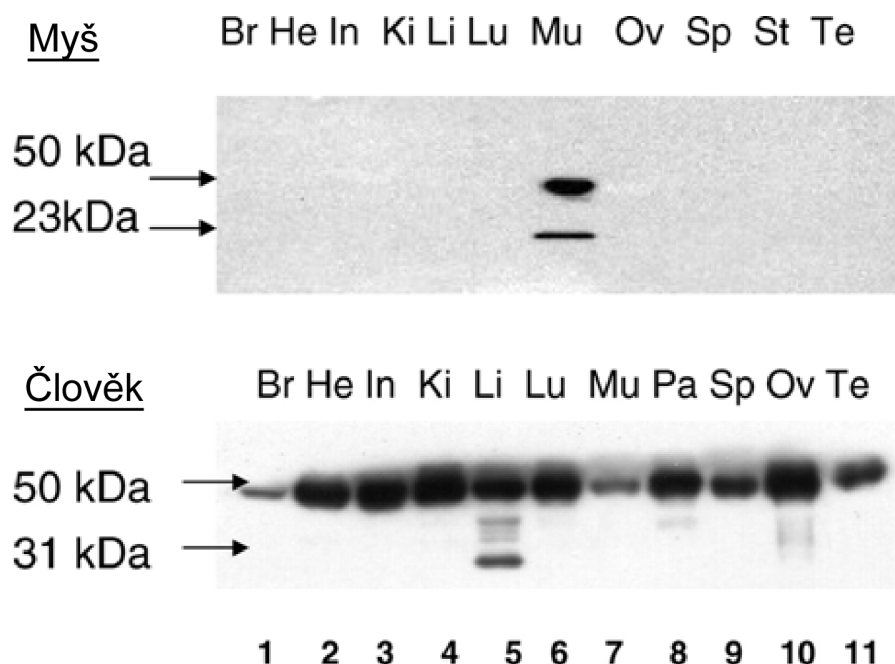
### 3.5.2. Struktura

CTL1 protein patří mezi transmembránové proteiny s 10 konzervovanými transmembránovými úseky s intracelulární lokalizací N a C konce proteinu (Obr. 12). V proteinu je přítomný také na cystein bohatý úsek a jedna evolučně konzervovaná doména - tzv. kadmium resistantní transporterová doména. Tato doména pokrývá transmembránové úseky 3 – 5.



Obr. 12 **Struktura CTL1.** CTL1 obsahuje 10 TMD s velkou variabilní smyčkou mezi TMD1 a TMD2, která obsahuje možné glykosylační místo (N-134). Cytoplazmatické smyčky obsahují celou řadu fosforylačních míst pro PKC. Převzato z Michel et al. 2006 [100].

Isoformy CTL1a a CTL1b proteinu vznikající výše popsaným alternativním sestřihem se liší C terminálním peptidem. U CTL1a je to A<sup>651</sup>SGASSA<sup>657</sup> a u CTL1b L<sup>651</sup>KKR<sup>654</sup>. Motiv KKXX, přítomný u CTL1b isoformy, představuje známou signální sekvenci, která vede k směřování daného proteinu do endoplazmatického retikula [141, 142]. U CTL1a nebyla popsána žádná lokalizační funkce C terminální sekvence. Podle elektroforetických analýz byl CTL1 protein nalezen ve formě dvou peptidických řetězců o délkách 23 a 50 kDa u myši 31 a 50 kDa u člověka. Expresce proteinu byla u myši zjištěna pouze v kosterním svalu, zatímco u člověka byla větší forma proteinu nalezena ve všech studovaných tkáních. Malá forma byla detekována pouze v játrech (Obr. 13).



Obr. 13 **Expresa CTL1 proteinu detekovaného protilátkou na western blotu.** Nahoře panel myších tkání, dole panel lidských vzorků. Šipkami naznačeny formy proteinu a molekulové hmotnosti. Br – mozek, He – srdce, In – tenké střevo, Ki – ledviny, Li – játra, Lu – plíce, Mu – kosterní sval, Ov – vaječník, Pa – pankreas, St – žaludek, Sp – slezina, Te – varle. Upraveno z Michel et al. 2006 [100].

Expresa ostatních členů CTL rodiny na proteinové úrovni nebyla podrobena důkladnějšímu zkoumání. Byla pozorována slabá exprese CTL2 proteinu v jazyce, kosterním svalu, ledvinách, srdci a plicích. U ostatních členů CTL rodiny byla exprese na hranici detekčního limitu použitých metod [142].

### 3.5.3. Předpokládaná funkce CTL1

CTL1 gen byl klonován jako specifický vysokoafinitní přenašeč cholinu a to zhruba ve stejné době jako CHT1 (viz výše) [120, 139]. Při stanovení  $K_m$  vykazoval hodnoty odpovídající vysoké afinitě k cholinu a blokovatelnost hemicholiniem-3. Od CHT1 se však liší nezávislostí na gradientu sodných iontů a tudíž lze předpokládat, že transport

realizovaný CTL1 není sodíkovým symportem jako u CHT1. Také tkáňová distribuce CTL1 neodpovídá rozložení cholinergních zakončení. Byly vysloveny pochybnosti o funkci CTL1 jakožto cholinového přenašeče, vzhledem k tomu, že nebyl schopen komplementovat kvasinky s deficientní de novo syntézou a transportem cholinu [138, 139]. Na druhou stranu bylo ukázáno, že exogenní zvýšení exprese CTL1 v COS-7 buňkách 2,5x zvyšuje transport cholinu [143]. Dále bylo také zjištěno, že CTL1 protein je hlavním cholinovým přenašečem u prekurzorové linie makrofágů (THP-1). Je zajímavé, že význam CTL1 pro diferencované makrofágy je významně nižší, jelikož po diferenciaci této buněčné linie se jeho aktivita významně snižuje. Tento pokles je v přímé korelaci se sníženou přítomností CTL1 proteinu na cytoplazmatické membráně diferencovaných makrofágů [144]. Specifita CTL1 proteinu pro cholin byla ověřena na těchto makrofágových liniích pomocí specifických inhibitorů a bylo dále ukázáno, že na transportní aktivitu nemají vliv inhibitory OCT přenašečů.

Bylo také zjištěno, že inhibitor EGFR-TK (receptor pro epidermální růstový faktor s tyrosin kinázovou aktivitou) gefitinib, podávaný pacientům s rakovinou plic, působí také jako inhibitor CTL1 [145]. Otázkou zůstává, zda se jedná o „vedlejší účinek“ tedy přímé působení gefitinibu na CTL1, nebo zda existuje regulační vztah mezi touto protein-kinázou a aktivitou CTL1 proteinu. Specifická fosforylační místa nebyla zatím u CTL1 podrobně studována.

Při studiu celé řady buněčných linií byla nalezena exprese CTL1 a bylo ukázáno, že je ovlivněna inhibicí proteinkinázy C pomocí staurosporinu. Kromě těchto experimentů bylo také ukázáno, že leukemický inhibiční faktor potencuje expresi CTL1 mRNA, což podporuje hypotézu o regulaci exprese CTL1 pomocí proteinkinázy C [146].

Expresa CTL1 proteinu ve svalové tkáni byla studována ve spojitosti se změnou jeho množství u pacientů s muskulárními dystrofiemi. Promotor CTL1 genu obsahuje mimo jiné také vazebné místo pro transkripční faktor MyoD, který moduluje myogenezi a reguluje funkci a růst svalů [147]. Expresa CTL1 nalezená ve svalu však může také souviset s přítomností makrofágů v poškozeném svalu, což souvisí s regenerativními schopnostmi svalové tkáně. Tento poznatek poukazuje na možnou úlohu CTL1

při svalových onemocněních a také nabízí CTL1 jako možný farmakologický cíl. Kromě svalových onemocnění by mohla funkce CTL1 souviset také s karcinogenezí adenokarcinomů plic. Bylo ukázáno, že transport cholinu je specificky regulován PI3 kináza/AKT/mTOR dráhou a snížení dostupnosti cholinu se jeví jako jeden z možných terapeutických přístupů pro léčbu těchto plicních karcinomů [148].

CTL1 protein se ukazuje jako multifunkční protein s úlohou nejen v transportu cholinu, ale také v imunomodulačních dějích. I když jeho přímý vliv na transport cholinu v neuronech nebyl zatím zcela objasněn, minimálně jeho úloha při regulaci zánětlivého procesu by mohla být velmi důležitá při působení na patogenezi AD, pro jejíž rozvoj jsou zánětlivé procesy charakteristické.

## 4. Materiál a metody

### 4.1. Použité chemikálie, kity a přístroje

Trizol isolation reagent	Invitrogen (USA)
propan-2-ol	Fluka (USA)
Chloroform	Lachner (CR)
Etanol	Lachner (CR)
Diethylpyrokarbonát (DEPC)	Sigma (USA)
Tripure isolation reagent	Roche (USA)
RNAWiz RNA isolation reagent	Ambion (USA)
HighPURE RNA Tissue Kit	Roche (USA)
MMLV reverse transcriptase kit	Promega (USA)
OligodT primer	Sigma (USA)
dNTP mix	TopBio (CR)
PCR HotStarTaq DNA Polymerase	QIAGEN (USA)
tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris)	Serva (SRN)
Ethidium Bromid	TopBio (CR)
Kyselina boritá	Sigma (USA)
etylendiaminotetraoctová kyselina (EDTA)	Sigma (USA)
chlorid sodný	Sigma (USA)
chlorid hořečnatý	Sigma (USA)
hydroxid sodný	Sigma (USA)
uhličitan sodný	Sigma (USA)
pentahydrát síranu měďnatého	Sigma (USA)
tartarát sodný	Sigma (USA)
Marker molekulových hmotností PCR-100 low	Sigma (USA)
Agaróza	TopBio (CR)
QIAquick Gel Extraction kit	QIAGEN (USA)
QuantiTect SYBR Green PCR Kit	QIAGEN( USA)

dithiotreitol	Sigma (USA)
dodecylsulfát sodný (SDS)	Sigma (USA)
akrylamid-bisakrylamid (směs)	Sigma (USA)
persulfát amonný	Sigma (USA)
tetraetylmetylendiamin (TEMED)	Sigma (USA)
glycin	Sigma (USA)
glycerol	Sigma (USA)
bromfenolová modř	Sigma (USA)
standard molekulových hmotností – proteinů	Bio-Rad (USA)
metanol	Lachema (ČR)
RNA later	Ambion (USA)
tween 20	Sigma (USA)
sušené mléko odtučněné	Milla (ČR)
azid sodný	Sigma (USA)
ECL Super Signal West Femto	Pierce (USA)
primární CHT1 protilátky	ABCAM (USA)
primární CTL1 protilátky	Dr. S. O`Regan (Francie)
sekundární králičí protilátky	Pierce (USA)
Přístroje:	
DNA Engine Tetrade	MJ Research (USA)
Elektroforetická aparatura	OmniBio (CR)
Elektroforetický zdroj – PowerPac 3000	BioRad (USA)
NanoDrop UV Spektrofotometr	NanoDrop Technologies (USA)
Dokumentační systém - BioDocAnalyze	Biometra (USA)
Centrifuga Sigma 3k18	Sigma (SRN)
LightCycler	Roche (USA)
Ultraturrax T25	IKA ( SRN)
Destičkový spektrometr Victor	Perkin Elmer (USA)



Mini-protean 3

Optima X –ray film procesor

UV transiluminátor

homogenizér MPW-309

Bio-Rad (USA)

Fomei (SR)

Vilber Lourmat

(Francie)

Universal laboratory aid

(Polsko)

## **4.2. Izolace RNA**

Kousky parietální mozkové kůry z kontrolních a transgenních myší vážící 5-15 mg byly přidány do 1 ml činidla Tripure a homogenizovány sklo-teflonovým homogenizátorem. Následně byl roztok inkubován 5 minut při pokojové teplotě. Poté bylo přidáno 0,2 ml chloroformu a vzorek byl důkladně promíchán vortexováním (15 vteřin). Následovala dvouminutová inkubace při pokojové teplotě a centrifugace 15 min 12 000 g při 4 °C. Po této fázové separaci byla odebrána vrchní vodná fáze obsahující RNA. K této fázi bylo přidáno 0,5 ml propan-2-olu a vzorek byl inkubován 10 minut při pokojové teplotě. Následovala centrifugace 10 min 12 000 g při 4 °C. Propan-2-ol byl odstraněn a peleta byla promyta 1 ml 75% etanolu. Po promytí byl vzorek opět centrifugován 5 min 7500 g při 4 °C. Etanol byl slit a zbytek odpařen sušením při pokojové teplotě (10 – 40 minut). Peleta byla rozpuštěna v DEPC opracované redestilované vodě. Koncentrace izolované RNA byla stanovena na kapilárním spektrofotometru Nanodrop 1000 (Nanodrop Technologies, USA).

## **4.3. Reverzní transkripce**

Pro přepis izolované RNA do cDNA byla provedena reverzní transkripce pomocí virové reverzní transkriptázy M-MLV. Pro iniciaci reakce byl použit oligo dT primer. Výsledkem této reakce je soubor cDNA komplementárních k polyadenylovaným buněčným mRNA. Reakce byla provedena následujícím způsobem: k 1 µg RNA byly přidány 2 µl (1 µg) oligo dT primeru a přidána DEPC destilovaná voda do celkového objemu 15,7 µl. Směs byla inkubována 5 minut při 70°C. Dále bylo do směsi přidáno při 4°C 1,25 µl dNTP mixu (10 mM), 5 µl 5x koncentrovaného reakčního pufru a 1 µl M-MLV enzymu (200 jednotek). Poté byla směs inkubována 60 minut při 42°C a 10 minut při 72°C. Všechny inkubace byly prováděny v PCR stripech v termocykleru (Tetrad DNA Engine, MJ Research, USA). Připravené cDNA byly skladovány při -20°C.

#### 4.4. PCR

PCR – polymerázová řetězová reakce, je metoda, při které se pomocí termostabilní DNA polymerázy (Taq) provádí exponenciální amplifikace úseku DNA, který leží mezi dvěma primery navrženými na cílovou DNA. Primery jsou navrženy tak, aby jejich teplota tání byla co nejbližší a aby obsahovaly co nejméně repetitivních sekvencí.

Pro amplifikaci byla použita HotStarTaq DNA polymeráza (QIAGEN). Amplifikace probíhá v tříkrokových cyklech. Začíná počáteční denaturací při 95°C, kdy se oddělují dvouvláknové DNA molekuly od sebe a aktivuje se PCR polymeráza. Následuje vlastní amplifikační cyklus zahájený opět krátkou denaturací, následovanou snížením teploty na 58°C. Při této teplotě nasedají primery na cDNA. Poté je teplota zvýšena na 72°C a zahajuje se polymerace. Tento cyklus byl 30x opakován pro CTL1 a GAPDH a 45x opakován pro CHT1. Na konci bylo ještě ponecháno 10 minut při 72°C pro doplnění nedosyntetizovaných řetězců. Složení reakční směsi bylo : 5 µl 10x koncentrovaného PCR pufru (QIAGEN, USA), 2 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub> (QIAGEN,USA), 1 µl 10 mM dNTP (Sigma, USA), 0,25 µl 5 U/µl HotStarTaq polymerázy (QIAGEN, USA), 0,125 µl 100 µM primerů, 39 µl destilované vody a 2,5 µl směsi z reverzní transkripce.

Název primeru	Sekvence	Délka produktu (bp)
CTL1-F	GAATGCATACACAGCCACAG	
CTL1-R	GTTGAGCAGGATAATCCCAG	187
CHT1-F	ACTGGCTAATGCACTGGACACC	
CHT1-R	AGCGCACCTTGAAAAATGAGTAA	176
GAPDH-F	GAACATCATCCCTGCATCC	
GAPDH-R	GCTTCACCACCTTCTTGATG	179

**Tab. 1.** Tabulka použitých primerů pro amplifikaci cílových genů

#### 4.5. Elektroforéza DNA v agarózovém gelu

DNA byla separována v agarózovém gelu připraveném z TBE (0,089 M Tris, 0,089 M H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0,002 M EDTA, pH=8,3) pufru a 1,5% agarózy. Nejprve byla agaróza o požadovaném množství navážena a přidána do 100 ml TBE pufru a rozvařena v mikrovlnné troubě. Po mírném ochlazení byl roztok agarózy nalit do předem připravené

elektroforetické aparatury a ponechán při laboratorní teplotě do úplného ztuhnutí. Ztuhlý agarózový gel byl umístěn do elektroforetické vany a přelit TBE pufrem.

Do jamek v gelu byly nanесeny vzorky DNA smíchané s vzorkovým pufrem (LB – TopBio, ČR), který usnadňuje nanášení vzorků do jamiček a zároveň obsahuje dva elektromobilní barevné indikátory, pomocí kterých můžeme sledovat pohyb čela a separaci v průběhu elektroforézy. Na gel bylo aplikováno napětí 100 V a elektroforéza probíhala přibližně 90 minut. Do jedné z jamiček byl místo vzorku nanесen standard molekulových hmotností DNA (PCR 100 bp low ladder, Sigma, USA).

Po dokončení elektroforézy byl gel barven 20 minut vodným roztokem ethidium bromidu o koncentraci 20 µg/ml. Po obarvení byl gel pozorován na UV transiluminátoru (Vilber Lourmat, Francie) a zdokumentován digitální kamerou na přístroji BioDocAnalyze (Biometra, USA).

#### **4.6. Izolace DNA z agarózového gelu**

Pro izolaci DNA z gelu byl použit QIAquick Gel Extraction kit. Po elektroforéze a dokumentaci byl požadovaný DNA fragment identifikován podle molekulové hmotnosti, gel s fragmentem vyříznut skalpelem, zvážen a umístěn do mikrozkušavky. K vyříznuté části gelu bylo přidáno 3x množství extrakčního (QG) pufru (100 mg gelu + 300 µl pufru) a zkušavka inkubována 10 min při 50 °C (v průběhu inkubace byla zkušavka opakovaně promíchávána na vortexu). Po rozpuštění byl přidán stejný objem propan-2-olu (100 mg gelu + 100 µl pufru) a vzorek byl zamíchán. Vzniklý roztok byl přepipetován do kolonky dodané s kitem a centrifugován 1 min při 17900 g (centrifugace slouží k protlačení roztoku silikagelovou membránou v kolonce). DNA z gelu se navázala na kolonku a prošlý roztok byl odstraněn. Kolonka byla stejným způsobem promyta 0,75 ml promývacího (PE) pufru. Po odstranění prošlého promývacího pufru byla kolonka ještě jednou „nasucho“ centrifugována pro odstranění zbylého promývacího pufru. Kolonka byla přemístěna do eluční nádobky a navázaná DNA byla eluována 30 µl elučního pufru (10 mM Tris, pH 8,5) – minutová inkubace v kolonce následovaná centrifugací 1 min při 17900 g. Koncentrace izolované DNA byla stanovena na kapilárním spektrofotometru Nanodrop 1000 (Nanodrop Technologies, USA).

#### **4.7. Kvantitativní Real-Time PCR**

Pro stanovení genové exprese (hladin mRNA) cílových genů byla použita metoda kvantitativní real-time PCR s fluorescenční detekcí pomocí nespecifického barviva SYBRGreen. Reakce byly prováděny v tenkostěnných skleněných kapilárách v přístroji LightCycler (Roche, USA). Pro přípravu reakční směsi byl použit QuantiTect SYBR Green PCR Kit (QIAGEN, USA) pro dvoukrokovou real-time PCR. Do reakčního objemu 10  $\mu$ l bylo smícháno 5  $\mu$ l QuantiTect SYBR Green PCR master mixu (PCR polymeráza, SYBRGreen, pufr,  $MgCl_2$ ), 3,5  $\mu$ l DEPC  $H_2O$ , 0,5  $\mu$ l primerů R a F (10  $\mu$ M roztok obou primerů) a 0,5  $\mu$ l templátové cDNA. Reakce byla provedena v následujícím programu: iničiální denaturace 95°C 15 minut, následné cyklování 50x – 94 °C 15 sec, 56 °C 20 sec, 72 °C 30 sec. Fluorescence je měřena vždy v amplifikačním kroku (72 °C). Po kvantifikaci byla provedena analýza tání – ohřev na denaturační teplotu, následovalo rychlé ochlazení na 65°C po dobu 15 vteřin a postupný ohřev zpět na 95 °C rychlostí 0,1 °C za vteřinu s kontinuálním odečítáním fluorescence.

Kvantifikace množství mRNA byla provedena metodou odečtu maxima druhé derivace fluorescenčního signálu. Pro kvantifikaci byl použit externí standard v podobě ředící řady připraveného izolovaného PCR produktu (6-8 bodů, 10 násobné ředění). Do grafu byla vynesena závislost odečteného cyklu PCR, kdy fluorescence překročila stanovenou mez pozadí proti relativní koncentraci standardu. Z vytvořené kalibrační závislosti byla odečtena relativní koncentrace měřených vzorků.

Specifita PCR byla kontrolována na výnosu druhé derivace intenzity fluorescence proti teplotě v průběhu analýzy tání. Čistý PCR produkt dává jeden vrchol o teplotě tání kolem 83-84°C.

#### **4.8. Příprava buněčných membrán pro imunodetekci proteinů**

Frakce buněčných membrán byla připravena z 5-10% homogenátu (w/v) z mozkové kůry kontrolních a transgenních myší. Jako homogenizační roztok byl použit následující roztok: 20 mM Tris, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 0,15 M NaCl pH 7,5. Do roztoku byl přidán koktejl inhibitorů proteáz (Sigma, USA). Celá procedura byla prováděna na ledu. Vzorky tkání byly homogenizovány ve skleněném homogenizéru (MPW-309, Polsko; 10 úderů pístu, rychlost otáčení nastavena na 7). Zbytky nerozbité tkáně a buněčná jádra byly odstraněny centrifugací v předem vychlazené centrifuze (4 °C, 1000 g, 5 minut). Supernatant byl znovu centrifugován (4 °C, 30 000 g, 30 min). Vzniklý pelet byl resuspendován ve stejném objemu homogenizačního roztoku a znovu centrifugován za stejných podmínek. Supernatant byl odstraněn a pelety (hrubá membránová frakce) uloženy v -20°C. V alikvotu připravených membrán bylo stanoveno množství proteinu Lowryho metodou s modifikací dle Petersona. Vzorky proteinu byly rozpuštěny v roztoku obsahujícím 0,1 M NaOH, 1,25% SDS, 1,25% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,0125% CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O a 0,0225% tartarát sodný. K roztoku byla přidána jedna čtvrtina objemu Folinova činidla a výsledná absorbance při 690 nm byla stanovena v destičkovém spektrometru Victor (Perkin Elmer, USA). Kalibrační přímka byla připravena ředěním standardu lidského albuminu.

#### **4.9. SDS-Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu**

SDS elektroforéza byla provedena v polyakrylamidovém gelu, v diskontinuálním systému (4% nanášecí gel, 10% separační gel) dle Laemmli [149]. Mezi elektroforetická skla zasazená do aparatury byl nejprve nanesen 10% polyakrylamidový gel obsahující 10% směs akrylamid-bisakrylamid, 0,1% SDS, 0,05% APS, 0,375 M Tris a 0,04% TEMED. Gel byl po nalití převrstven 300 µl butanolu. Po ztuhnutí gelu byl butanol odstraněn proplachem redestilovanou vodou. Dále byl nad separační gel přidán nanášecí gel obsahující 4% směs akrylamid-bisakrylamid, 0,1% SDS, 0,1% APS, 0,125 M Tris a 0,08% TEMED a zasunuty hřebínky pro vznik vzorkových jamek. Po ztuhnutí nanášecího gelu

a odstranění hřebínků byly jamky naplněny elektroforetickým pufrem . Pufre obsahoval 250 mM Tris, 0,5 M glycin, 1% SDS.

Vzorky pro SDS elektroforézu byly připraveny smícháním vzorkového pufre (260 mM Tris (pH 6,8), 8% SDS, 40% Glycerol, 8% DTT, 0,1 mg/ml bromfenolová modř) se vzorkem a inkubovány 5 min při 95°C. Po krátkém stočení na stolní mikrocentrifuze byly vzorky nanášeny v požadovaném množství (35 µg proteinu/jamka). Kromě vzorků byl do jedné z jamek nanesen standard molekulových hmotností (Bio-Rad,USA). Na gel bylo aplikováno napětí 200 V po dobu přibližně 50 min.

#### **4.10. Western Blotting**

Blotovací aparatura (Bio-Rad, USA) byla saturována blotovacím pufrem (25 mM Tris, 200 mM Glycin, 20% Methanol v/v) po dobu 20 min. Dále byly připraveny 4 filtrační papíry a inkubovány v témže pufre 20 min. Na blotovací aparaturu byly položeny dva filtrační papíry (Pierce, USA) preinkubované v blotovacím pufre, separační gel z SDS elektroforézy, nitrocelulósová membrána (Pierce, USA) a druhé dva filtrační papíry. Pro správné přeblovování byly následně odstraněny všechny vzduchové bubliny. Aparatura byla složena a umístěna do elektroforetické vany, přelita blotovacím pufrem a bylo aplikováno stálé napětí 25 V přes noc (18 – 19 hod). Po ukončení blotování byla aparatura rozebrána. Membrána byla opláchnuta v destilované vodě a zablokována v blokovacím pufre (4,5% sušené odtučněné mléko, 150 mM NaCl, 10 mM Tris, 0,1% Tween 20) po dobu 45 min za stálého míchání.

#### **4.11. Imunodetekce**

Nejprve byl připraven roztok protilátky v ředícím pufre (1% sušené odtučněné mléko, 150 mM NaCl, 10 mM Tris, 0,1% Tween 20) o doporučené koncentraci pro danou protilátku. Zablokováná nitrocelulósová membrána byla umístěna do plastového pytlíku, pokryta roztokem protilátky a pytlík zataven. Membrána byla s primární protilátkou inkubována za stálého míchání po dobu dvou hodin při teplotě místnosti. Po inkubaci byl roztok protilátky odstraněn. Membrána opláchnuta destilovanou vodou a promyta promývacím pufrem (150 mM NaCl, 10 mM Tris, 0,3% Tween 20) 3 x 10 min. Následně

byl připraven roztok sekundární protilátky (rabbit antigoat antibody HRP labeled, Pierce, USA) v ředícím pufru o koncentraci 0,08 µg/ml. Membrána byla se sekundární protilátkou inkubována při teplotě místnosti po dobu 1 hod v plastové nádobě za stálého míchání. Po dokončení inkubace byla sekundární protilátka odstraněna. Membrána byla opláchnuta v destilované vodě a promyta promývacím puftrem (viz. výše) 3 x 10 min. Poté byla membrána znovu opláchnuta destilovanou vodou. Inkubovaná membrána byla potřena substrátem pro peroxidázový konjugát (ECL Super Signal West Femto, Pierce, USA) a inkubována 1 min. Přebytek substrátu byl odstraněn filtračním papírem a membrána exponována na RTG film ve tmě. RTG film byl vyvolán pomocí vyvolávačky (Optima X – ray film procesor, Fomei, Slovenská republika).

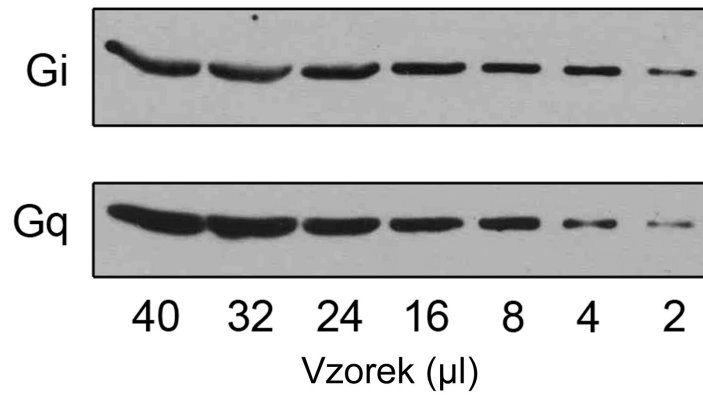
#### **4.12. Ověření imunodetekce proteinů**

Ověření SDS elektroforézy, blotování a imunodetekce bylo provedeno rutinním způsobem pro G $\alpha$ i a G $\alpha$ q podjednotky trimerického G-proteinu [150] u vzorků membrán připravených z mozkové kůry kontrolní myši. Po separaci a přenesení proteinů na nitrocelulózu membránu (viz Metody 4.11.) byla provedena inkubace s králičími polyklonálními protilátkami proti G $\alpha$ i a G $\alpha$ q podjednotkám trimetrického G-proteinu o koncentraci 40 ng/ml (Santa Cruz Biotechnology inc, USA). Po inkubaci se sekundární protilátkou a expozici na RTG film, byly vyvolané snímky naskenovány do počítače a intenzita signálu vyhodnocena pomocí softwaru AIDA 3.21 (Raytest, Germany). Výsledek expozice na RTG film viz Obr. 14 A.

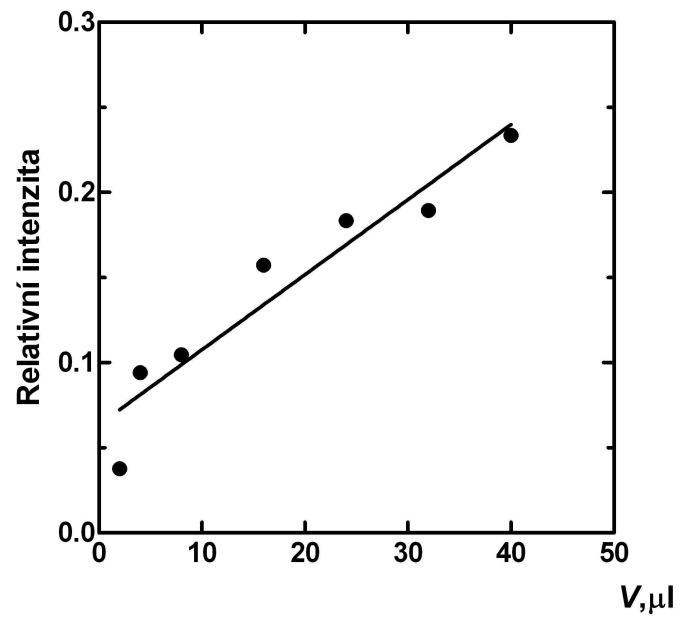
Získané hodnoty signálu pro jednotlivé proužky představující proteiny o molekulové hmotnosti 40 kDa (odpovídá literárním údajům), byly relativizovány na celkovou sumu signálu daného proteinu na jedné membráně. Tento krok umožňuje snazší srovnávání výsledků nezávislých elektroforéz. Odečtené hodnoty signálu byly vyneseny do grafu. Tyto grafy na Obr. 14 B představují závislost stanovené intenzity signálu na množství naneseného celkového proteinu. Z grafů je patrné, že tato kvantifikační metoda vykazuje pro  $\alpha$  podjednotky Gi a Gq G-proteinů lineární závislost signálu na množství naneseného celkového proteinu nejméně v rozmezí 5-100 µg.

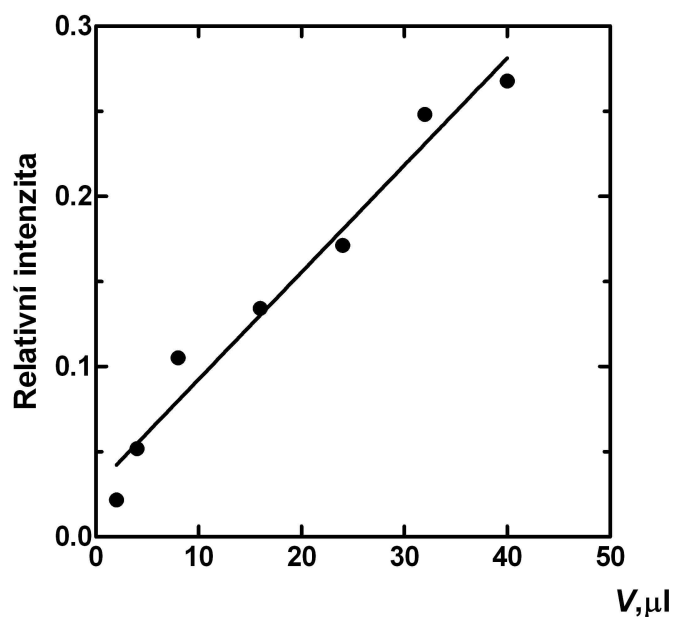


A



B





Obr. 14 **Závislost intenzity signálu na množství naneseného celkového proteinu.** A – imunodetekce Gi alfa podjednotky (nahore) Gq alfa podjednotky (dole) trimetrického G-proteinu. Na gel bylo naneseno stoupající množství vzorku od 2 do 40  $\mu\text{l}$  (koncentrace proteinu 2,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). B - závislosti odečtené intenzity signálu (osa y, v arbitrárních jednotkách – A.U.) na množství naneseného vzorku (osa x,  $\mu\text{l}$ ) pro Gi (str. 49 dole) a Gq (str. 50 nahore) alfa podjednotku heterotrimerických G-proteinů.

#### **4.13. Statistické vyhodnocení dat**

Pro statistické zpracování získaných dat byl použit nepárový t-test s oboustranným rozdělením. Normální rozdělení použitých souborů hodnot bylo ověřeno pomocí Kolmogoroff-Smirnoffova testu. Analýza byla provedena v programu GraphPad Prism 5.0 (GraphPad, USA).

## 5. Cíle diplomové práce

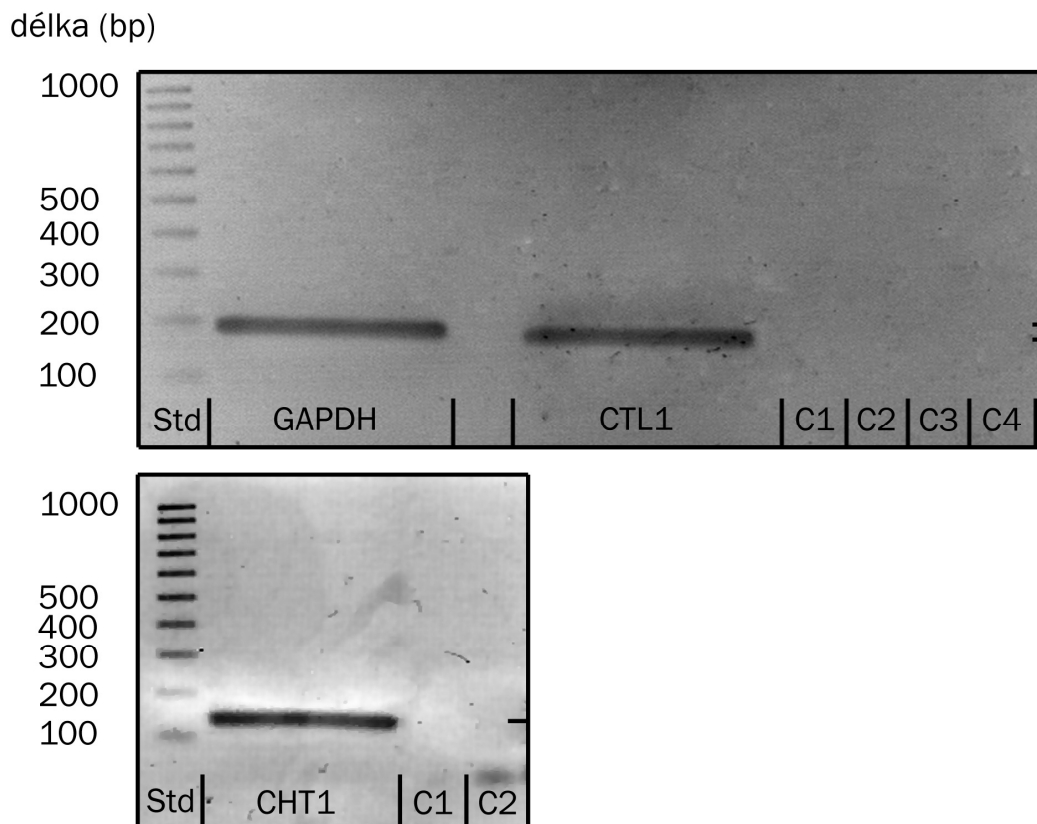
1. Stanovit v mozkové kůře množství mRNA pro geny kódující cholinové přenašeče CHT1 a CTL1 a zjistit zda *in vivo* zvýšená koncentrace A $\beta$  má vliv na expresi těchto genů na transkripční úrovni.
2. Stanovit v mozkové kůře množství cholinových přenašečů CHT1 a CTL1 na úrovni proteinu a zjistit, zda zvýšená koncentrace A $\beta$  má vliv na obsah těchto proteinů v buněčných membránách.

## 6. Výsledky

### 6.1. *Optimalizace real time PCR pro stanovení genové exprese*

Pro správné stanovení genové exprese pomocí real time PCR je nezbytné připravit optimální podmínky pro PCR reakci. Byl zvolen a ověřen PCR protokol pro amplifikaci cílových genů tak, aby nasedací teplota odpovídala odhadnuté teplotě tání primerů (55 °C – volí se o 5°C nad teplotou tání) a fáze prodlužování (30 sec) délce produktu (200 bp). Pomocí programu PrimerSelect (DNASar) byly navrženy páry primerů pro amplifikaci CHT1, CTL1 a GAPDH (glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza) cDNA. Primery byly navrženy tak, aby obsahovaly přibližně 50% GC párů, málo interních smyček, párujících oblastí a repetitivních úseků. Lokalizace primerů na sekvenci byla určena tak, aby místa nasedání primerů v rámci jednoho páru byla umístěna na rozdílných exonech genu a minimalizovalo se tak riziko amplifikace genomové DNA, která může být někdy přítomna jako kontaminace izolované celkové RNA. To zajišťuje, že produkt amplifikace genomové DNA má natolik odlišnou (větší) délku, že nemůže být s očekávaným produktem zaměněn a účinnost jeho případné amplifikace je velmi nízká.

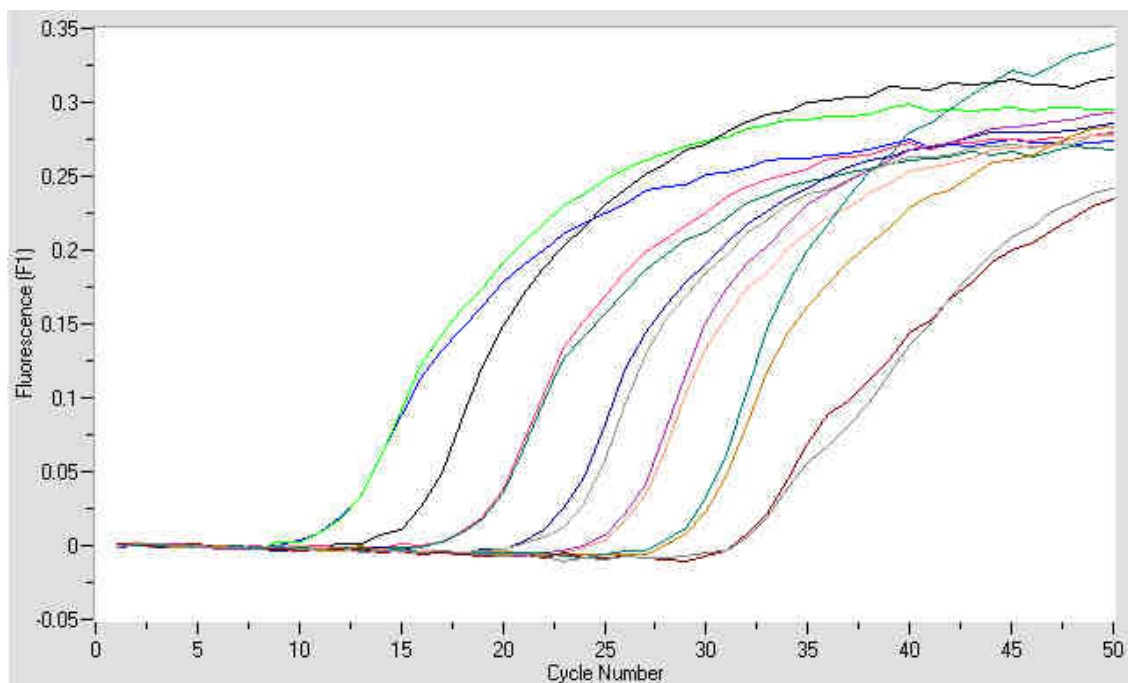
PCR byla nejprve provedena pomocí běžné PCR polymerázy a termocykleru. Výsledné produkty byly separovány v agarózovém gelu. Po otestování specifity produktů reakce (jediný proužek s odpovídající molekulovou hmotností – Obr. 15) byly produkty amplifikovány ve velkém reakčním objemu (100 µl) a produkty PCR vyříznuty z gelu a extrahovány do 10 mM Tris pufru (viz Metody 4.6.). Pro přibližný odhad výtěžku izolace PCR produktu z gelu bylo v roztoku eluovaného PCR produktu stanoveno množství DNA a jeho čistota pomocí měření absorbance v UV oblasti při 260 a 280 nm (poměr absorbancí ukazuje na míru kontaminace vzorku nukleových kyselin proteiny, v ideálním případě je kolem 2,0).



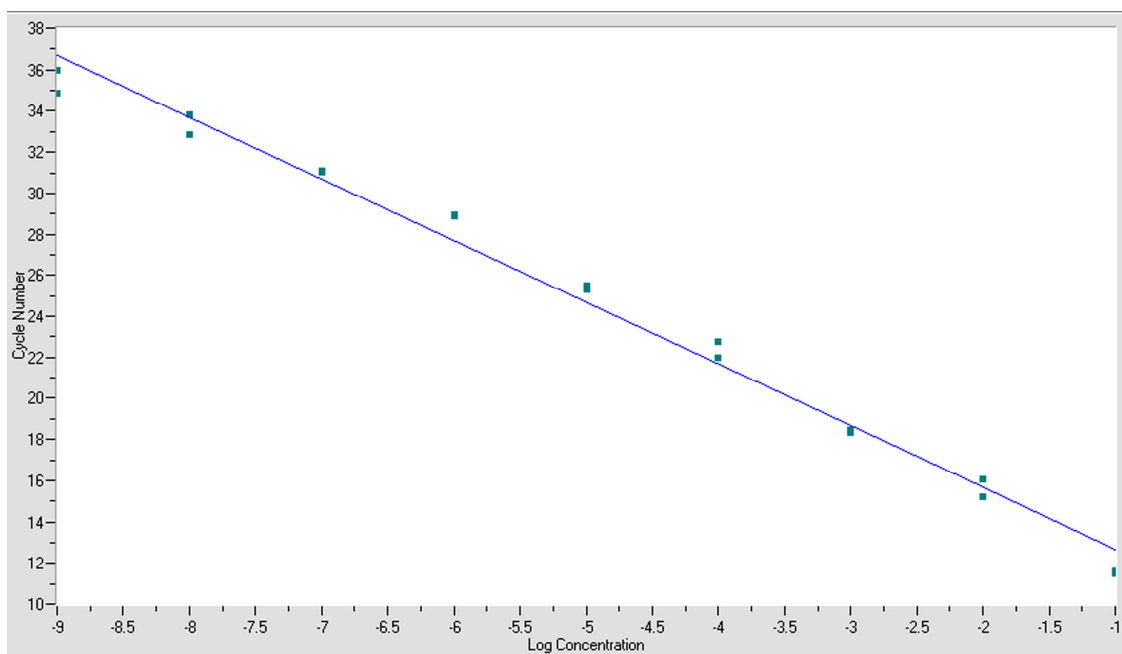
**Obr. 15 Agarózová elektroforéza PCR produktů pro GAPDH, CTL1 a CHT1.** Std – Standard molekulových hmotností. Na gelu je vidět jediný specifický produkt jehož molekulová hmotnost odpovídá délce produktu (Tab. 1.). C1 a C3 - blank bez RNA, C2 a C4 – blank bez cDNA. Proužek s nízkou molekulovou hmotností v C2 u CHT1 jsou pouze dimery primerů.

Izolovaný PCR produkt (viz Metody 4.6.) byl použit jako templát pro real time PCR reakci v přístroji LightCycler (Roche, USA) s použitím fluorescenčního barviva SYBRGreen. Byla připravena desetinásobná ředící řada od  $10^{-1}$  do  $10^{-9}$  a provedena PCR. Pomocí metody maxima druhé derivace průběhu fluorescence vzorku byly odečteny „crossing points“ (body, ve kterých křivka fluorescence vzroste významně nad úroveň pozadí – vypočtené jako její inflexní body) (Obr. 16 A.)

A



B



Obr. 16 Kalibrační křivka pro PCR produkt CTL1. A – křivky vzestupu fluorescence v průběhu amplifikace PCR produktu (osa x, číslo cyklu amplifikace; osa y, intenzita

fluorescence). B – lineární regrese závislosti vynesení crossing point (osa y, číslo cyklu) proti logaritmu „relativní koncentrace“ (osa x, ředění izolovaného PCR produktu  $10^{-n}$ )

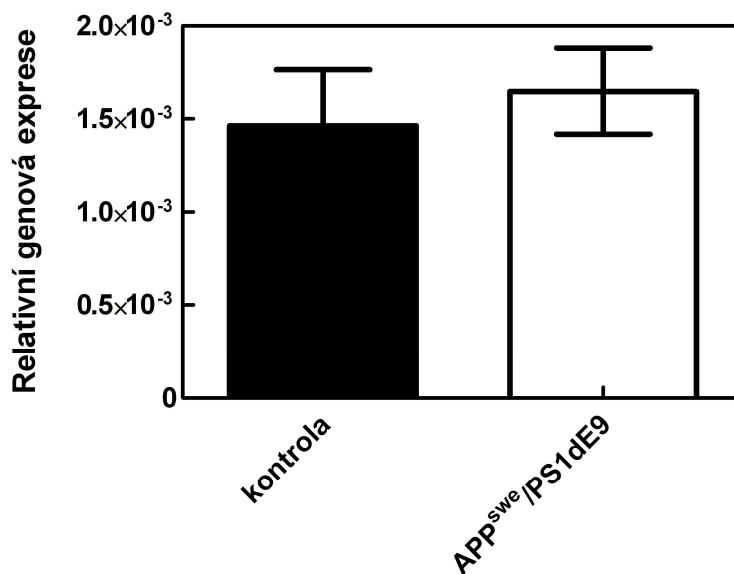
Poté byl pomocí softwaru přístroje LightCycler proveden výnos do grafu crossing point proti relativní koncentraci. Body byla proložena přímkou lineární regrese a odečteny její parametry. Sklon přímky udává účinnost PCR, která by se měla blížit v ideálním případě 2 (zdvojnásobení množství DNA v každém cyklu PCR) (Obr. 16 B).

## **6.2. Stanovení exprese mRNA pro CTL1 a CHT1 v mozkové kůře APP<sup>swe</sup>/PS1dE9 myši**

Při studiu mechanismu působení zvýšené hladiny A $\beta$  v organismu u AD na cholinergní transmissi, byla nejprve provedena analýza exprese cholinových přenašečů na úrovni mRNA. Bylo usmrceno 5 kontrolních a 5 transgenních myši APP<sup>swe</sup>/PS1dE9 samičího pohlaví, ve věku 5-6 měsíců a odebrány vzorky mozkové kůry a zamrazeny v tekutém dusíku, aby byla zastavena degradace RNA vysoce aktivními RNázami. Odebrané vzorky byly skladovány při -70°C v RNA lateru až do doby zpracování. Ze vzorků byla pomocí výše zmíněného izolačního protokolu extrahována totální RNA, byla stanovena její kvalita a koncentrace pomocí měření absorbance v UV oblasti při 260 a 280 nm (dále zpracovávané vzorky měly poměr absorbancí nad 1,6). Izolovaná RNA byla přepsána do cDNA pomocí reverzní transkriptázy a oligo dT primeru. Tímto krokem byla získána komplementární DNA (cDNA), ke všem buněčným polyadenylovaným mRNA. Takto připravená cDNA byla použita jako templát pro realtime PCR, se standardem z výše zmíněných izolovaných PCR produktů. Pomocí kalibrační přímky byla odečtena relativní genová exprese cílových genů CTL1 a CHT1. Dále byla stanovena také genová exprese referenčního genu GAPDH, který se používá jako interní standard realtime PCR reakce a u něhož nepředpokládáme ovlivnění jeho exprese v našem modelovém systému. Hladina exprese referenčního genu byla využita pro normalizaci drobných odchylek v přesnosti pipetování, účinnosti PCR a reverzní transkripce. Hodnoty genové exprese CHT1 a CTL1, odečtené z kalibračních přímek, pro jednotlivé vzorky byly vyděleny expresí GAPDH a tyto normalizované hodnoty porovnávány mezi skupinou kontrolních a transgenních zvířat.

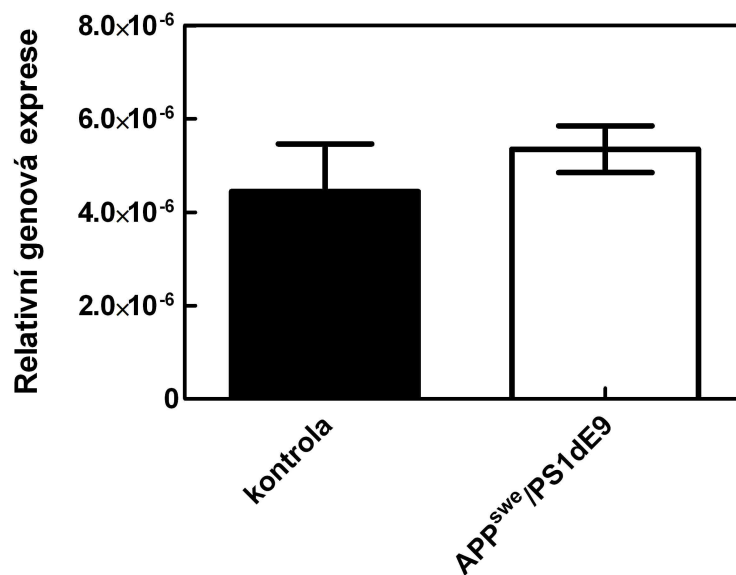
Obr. 17 ukazuje výsledky měření genové exprese mRNA pro CTL1. Sloupce grafu představují průměr  $\pm$  střední chybu průměru z 5 zvířat kontrolních i transgenních. Výsledné hodnoty byly podrobeny statistické analýze a nepárový t-test na 5% hladině pravděpodobnosti nepotvrdil signifikantní změnu exprese CTL1 mRNA mezi kontrolními a transgenními zvířaty ( $p=0,3125$ ).





Obr. 17 **Expresa CTL1 mRNA v mozkové kůře kontrolních a transgenních myší.** Sloupečky znázorňují expresi CTL1 mRNA v celkové RNA izolované z mozkové kůry kontrolních (černý sloupeček) a transgenních APP<sup>Swe</sup>/PS1dE9 (bílý sloupeček) myší. Množství CTL1 mRNA je vztaženo k referenčnímu genu (GAPDH) a je vyjádřeno v relativních jednotkách (osa y). Sloupečky ukazují průměr +/- střední chybu průměru z pěti vzorků v každé skupině.

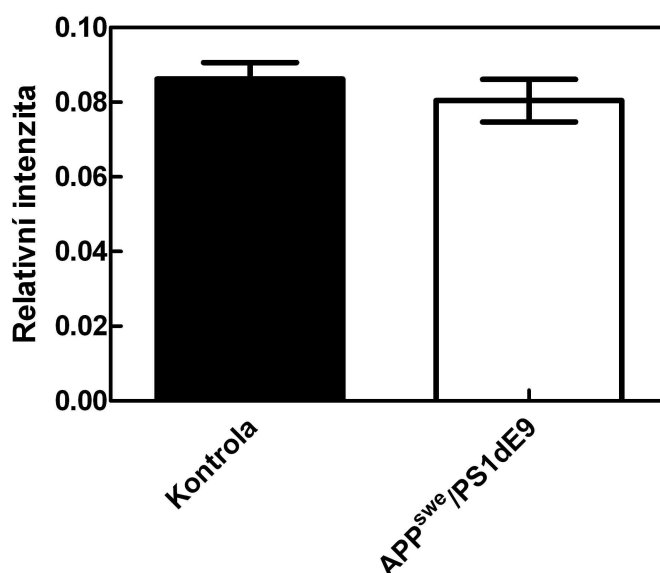
Dále byla stanovena genová exprese mRNA pro CHT1 cholinový přenašeč na stejných vzorcích izolované RNA z kontrolních a transgenních myší. Obr. 18 ukazuje výsledky analýzy tohoto měření. Sloupce opět představují průměry stanovení z 5 kontrolních a 5 transgenních zvířat. Ani u cholinového přenašeče CHT1 nebyla pomocí statistické analýzy (nepárový t-test) zjištěna změna mezi kontrolními a transgenními zvířaty ( $p=0.3125$ ).



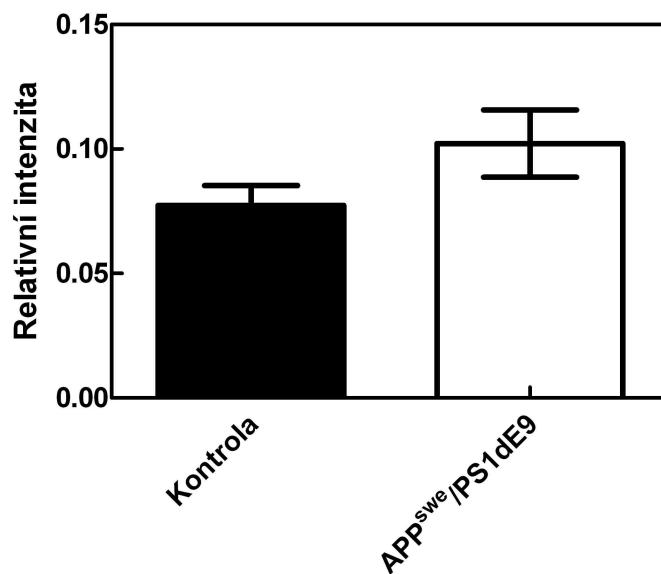
Obr. 18 **Expresa CHT1 mRNA v mozkové kůře kontrolních a transgenních myší.** Sloupečky znázorňují expresi CHT1 mRNA v celkové RNA izolované z mozkové kůry kontrolních (černý sloupeček) a transgenních APP<sup>swc</sup>/PS1dE9 (bílý sloupeček) myší. Množství CHT1 mRNA je vztaženo k referenčnímu genu (GAPDH) a je vyjádřeno v relativních jednotkách (osa y). Sloupečky ukazují průměr +/- střední chybu průměru z pěti vzorků v každé skupině.

### 6.3. Stanovení exprese CTL1 a CHT1 proteinů v membránové frakci mozkové tkáni APP<sup>swe</sup>/PS1dE9 myši

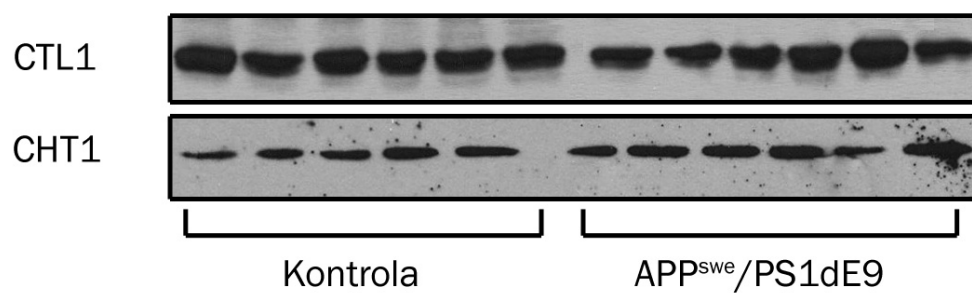
Expres CTL1 a CHT1 proteinů byla stanovena ve vzorcích plasmatických membrán, připravených z 6 kontrolních a 6 transgenních APP<sup>swe</sup>/PS1dE9 myši (Obr. 20-22). Připravené nitrocelulosové membrány s přenesenými rozdělenými proteiny byly inkubovány s polyklonální králičí protilátkou proti CTL1 proteinu (zásobní roztok ředěn 1:8000). Tato protilátka byla laskavě poskytnuta laboratoří dr. O`Regan kde byla připravena [151]. Poté byla na stejných vzorcích provedena nová SDS elektroforéza, blotování a imunodetekce pomocí polyklonální králičí protilátky proti proteinu CHT1 (ABCAM, USA; dodávaná ve formě ascitové tekutiny, ředěna v doporučeném poměru 1/500). Vzhledem k nedostatku materiálu bylo použito pouze 5 vzorků z kontrolních a 6 z transgenních zvířat. Kvantifikace výsledků imunodetekce CTL1 a CHT1 (Obr. 21) jsou shrnuty v Obr. 19 a 20. Byla provedena statistická analýza a pomocí nepárového t-testu bylo zjištěno, že není statisticky signifikantní rozdíl mezi kontrolními a transgenními zvířaty ani v množství exprimovaného CTL1 (Obr. 19,  $p=0,4410$ ) ani CHT1 (Obr.20,  $p=0,1686$ ). Obrázek 21 ukazuje výsledek imunodetekce na western blotu použité pro kvantifikaci v předešlých grafech.



Obr. 19 **Expres proteinu CTL1 u kontrolních a transgenních APP<sup>swe</sup>/PS1dE9 myši.** Množství proteinu CTL1 (osa y, relativní intenzita v arbitrárních jednotkách) v membránách z mozkové kůry kontrolních a transgenních APP<sup>swe</sup>/PS1dE9 myši je vyjádřeno jako poměr intenzity signálu jednotlivých vzorků vztažené k sumě signálů na dané elektroforéze. Sloupce označené Kontrola (černé) a APP<sup>swe</sup>/PS1dE9 (bílé) představují průměr +/- střední chyba průměru vzorků ze 6 zvířat v obou skupinách.



Obr. 20 **Expres proteinu CHT1 u kontrolních a transgenních APP<sup>swe</sup>/PS1dE9 myši.** Množství proteinu CHT1 (osa y, relativní intenzita v arbitrárních jednotkách) v membránách z mozkové kůry kontrolních a transgenních APP<sup>swe</sup>/PS1dE9 myši je vyjádřeno jako poměr intenzity signálu jednotlivých vzorků vztažené k sumě signálů na dané elektroforéze. Sloupce označené Kontrola (černé) a APP<sup>swe</sup>/PS1dE9 (bílé) představují průměr +/- střední chyba průměru vzorků z 5 zvířat u kontrol a z 6 zvířat u transgenní skupiny.



Obr. 21 **Imunodetekce proteinů CHT1 a CTL1** v membránách z mozkové kůry kontrolních (vlevo) a transgenních APP<sup>sw</sup>/PS1dE9 (vpravo) myší.

## 7. Diskuze

Jak již bylo zmíněno v úvodu, úbytek cholinergních markerů je pravidelně nacházen v mozkové tkáni získané *post mortem* u pacientů s patologickým nálezem ověřenou AD. Rovněž bylo popsáno snížení uvolňování ACh *in vitro* v lidské mozkové tkáni, získané při operačním odstraňování korových nádorů. Tyto nálezy vedly k navržení cholinergní hypotézy geriatrických poruch paměti (přehled [152]). Snížení cholinergních markerů a uvolňování ACh se rovněž potvrdilo v mozkové kůře a hipokampu u mladých dospělých (5-7 měsíců) samic transgenních myší kmene APP<sup>swc</sup>/PS1dE9[153, 154], které od narození tvoří zvýšené množství fragmentů A $\beta$ <sub>1-40</sub> a A $\beta$ <sub>1-42</sub>. Kolem 5. měsíce věku začínají vytvářet amyloidové plaky v kůře a hipokampu a po 12. měsíci věku vykazují behaviorální poškození. V souladu s cholinergní hypotézou se tedy snížení uvolňování ACh projevuje v počátcích nastupující amyloidózy a podstatně dříve než behaviorální poruchy. V této práci byla zkoumána možnost, zda je snížení stimulovaného uvolňování ACh způsobené nedostatkem cholinu pro jeho syntézu. Cholin využívaný pro syntézu ACh pochází převážně z extracelulární tekutiny a do místa syntézy, cytoplasmu cholinergních zakončení, je dopravován prostřednictvím vysokoafinitního transportního systému (původní název sodium-dependent high affinity choline uptake systém[108, 155]; CHT1 [120]). Dodávka cholinu pro syntézu ACh představuje regulační (rate-limiting) krok při syntéze ACh. Snížení exprese na úrovni genu či proteinu by tedy mohlo vysvětlit snížení stimulovaného uvolňování ACh. Získané výsledky však ukazují, že u tohoto myšího modelu AD nedochází ani ke snížení genové exprese (Obr 17) ani ke snížení obsahu proteinu, který je zabudovaný v membránách (Obr 21). Zvýšená koncentrace A $\beta$  tedy neovlivňuje expresi genu pro CHT1. Možností zůstává, že i při neporušené expresi imunoreaktivního proteinu dochází k jeho chybnému zabudování do membrán nebo poruchám jeho funkce v důsledku jiných vlivů, jako je například porucha iontových gradientů, které transport cholinu pohánějí.

Dalším příznačným nálezem v pokročilém stadiu AD je atrofie a odumírání různých, zejména nervových, buněk v centrálním nervovém systému. Cholin slouží ve všech somatických buňkách jako substrát pro syntézu hlavního membránového fosfolipidu fosfatidylcholinu. Část cholinu pro syntézu fosfatidylcholinu se tvoří *de novo* v buňce

a část musí být získána z extracelulární tekutiny [96]. Zásadní důležitost získávání cholinu z exogenních zdrojů (potravy) byla prokázána v pokusech na krysách, kde prenatalní a perinatální podávání cholinu vedlo ke zvýšení odolnosti proti toxickému působení různých látek a zlepšení mentální výkonnosti. Tyto příznivé účinky přetrvávaly do dospělosti [96, 99, 156]. Koncentrace cholinu v extracelulární tekutině mozku (přibližně 1-5  $\mu\text{M}$ ) je však výrazně nižší, než je koncentrace cholinu v krevní plazmě (přibližně 10-20  $\mu\text{M}$ ). To ukazuje na důležitou úlohu vysokoafinitního transportéru cholinu pro syntézu fosfolipidů v centrálním nervovém systému. Takovým transportérem by mohl být CTL1 [139]. Vyskytuje se prakticky ve všech tkáních a typech buněk. Jeho úloha při obnovování neuronů po poranění [157] byla navržena na základě zvýšené exprese jeho mRNA u pokusů, kde byl chirurgicky přerušen lícní nerv (buněčná těla cholinergních neuronů motorických vláken tohoto nervu jsou uložena v mozku). Podobně jako u CHT1, provedené pokusy nezjistily u 5-6 měsíců starých samic myši kmene APP<sup>swe</sup>/PS1dE9 žádné změny v expresi mRNA pro CTL1 (Obr 17) ani v množství membránového proteinu CTL1 (Obr 19). Tato pozorování však nevylučují možnost poruch funkce exprimovaného proteinu.

Výsledky provedených pokusů ukazují, že u mladých dospělých samic transgenního myšího modelu AD nedochází ke změně exprese genů pro vysokoafinitní cholinové transportéry a pomocí imunodetekce stanovených zralých proteinů zabudovaných do membrány. Je však dobře mít na paměti, že provedené stanovení proteinů vypovídá o jejich koncentraci a umístění v membráně. Nevypovídá však nic o jejich funkci, která může být narušena i z jiných důvodů, než je jejich nepřítomnost. Popsané snížení stimulovaného uvolňování Ach [154] je pravděpodobněji způsobené snížením koncentrace váčkového přenašeče pro Ach [153], jehož funkce představuje jiný regulační krok v metabolismu ACh. Závěrem lze shrnout, že progresivní zvyšování koncentrací fragmentů  $\text{A}\beta_{1-40}$  a  $\text{A}\beta_{1-42}$  v průběhu stárnutí samic myši kmene APP<sup>swe</sup>/PS1dE9 nevyvolává ve věku 5-6 měsíců v mozkové kůře změny v expresi genů pro vysokoafinitní cholinové transportéry CHT1 a CTL1 ani na úrovni mRNA ani na úrovni proteinu. Případné odmítnutí úlohy těchto transportéru v rozvoji AD u tohoto myšího modelu však bude vyžadovat další pokusy, které se budou týkat správnosti funkce těchto proteinů a jejich exprese v pokročilejším stadiu rozvoje patologických změn.

## 8. Závěr

1. Byla stanovena intenzita genové exprese mRNA pro cholinové přenašeče CTL1 a CHT1 v mozkové kůře samic transgenních APP<sup>swc</sup>/PS1dE9 myší. Srovnáním se vzorky z kontrolních myší bylo zjištěno, že zvýšené hladina A $\beta$  nemá u 5-6 měsíčních transgenních myší vliv na expresi těchto genů,
2. Bylo stanoveno celkové množství proteinů CTL1 a CHT1 v mozkové kůře samic transgenních APP<sup>swc</sup>/PS1dE9 myší. Ani u hladin těchto proteinů nebyly nalezeny statisticky signifikantní rozdíly mezi 5-6 měsíci starými kontrolními a transgenními myšmi.
3. Snížení uvolňování acetylcholinu a oslabení muskarinové transmise popsané u 5-6 měsíčních transgenních APP<sup>swc</sup>/PS1dE9 myší není způsobeno snížením pro cholinergní neurony specifického vysokoafinního cholinového přenašeče CHT1. Poruchy metabolismu acetylcholinu a cholinergní neurotransmise, pozorované v rané fázi rozvoje patologie u tohoto transgenního modelu Alzheimerovy nemoci, nejsou doprovázeny snížením genové exprese či množství proteinů vysokoafinních cholinových transportních systémů v mozkové kůře. Tyto výsledky naznačují, že poruchy transportu cholinu se u Alzheimerovy nemoci objevují až pokročilém či terminálním stadiu onemocnění jako důsledek dediferenciace a odumírání neuronů.



## 9. Literatura

1. Alzheimer, A., *Ueber eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde*. Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und psychisch-gerichtliche Medizin, 1907(64): p. 146-148.
2. Masters, C.L., et al., *Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(12): p. 4245-9.
3. Glenner, G.G. and C.W. Wong, *Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein*. Biochem Biophys Res Commun, 1984. **120**(3): p. 885-90.
4. Kosik, K.S., C.L. Joachim, and D.J. Selkoe, *Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(11): p. 4044-8.
5. Grundke-Iqbal, I., et al., *Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(13): p. 4913-7.
6. Rozemuller, J.M., P. Eikelenboom, and F.C. Stam, *Role of microglia in plaque formation in senile dementia of the Alzheimer type. An immunohistochemical study*. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol, 1986. **51**(3): p. 247-54.
7. Markesbery, W.R., *Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease*. Free Radic Biol Med, 1997. **23**(1): p. 134-47.
8. Sloane, P.D., et al., *The public health impact of Alzheimer's disease, 2000-2050: potential implication of treatment advances*. Annu Rev Public Health, 2002. **23**: p. 213-31.
9. Tanzi, R.E. and L. Bertram, *Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective*. Cell, 2005. **120**(4): p. 545-55.
10. Bergem, A.L., K. Engedal, and E. Kringlen, *The role of heredity in late-onset Alzheimer disease and vascular dementia. A twin study*. Arch Gen Psychiatry, 1997. **54**(3): p. 264-70.
11. Corder, E.H., et al., *Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families*. Science, 1993. **261**(5123): p. 921-3.
12. Gyure, K.A., et al., *Intraneuronal abeta-amyloid precedes development of amyloid plaques in Down syndrome*. Arch Pathol Lab Med, 2001. **125**(4): p. 489-92.
13. Wolozin, B., *Cholesterol and the biology of Alzheimer's disease*. Neuron, 2004. **41**(1): p. 7-10.
14. Allinson, T.M., et al., *ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases*. J Neurosci Res, 2003. **74**(3): p. 342-52.
15. Vassar, R., et al., *Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE*. Science, 1999. **286**(5440): p. 735-41.
16. Nunan, J. and D.H. Small, *Regulation of APP cleavage by alpha-, beta- and gamma-secretases*. FEBS Lett, 2000. **483**(1): p. 6-10.
17. Edbauer, D., et al., *Reconstitution of gamma-secretase activity*. Nat Cell Biol, 2003. **5**(5): p. 486-8.

18. Citron, M., *Strategies for disease modification in Alzheimer's disease*. Nat Rev Neurosci, 2004. **5**(9): p. 677-85.
19. Walsh, D.M., et al., *Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo*. Nature, 2002. **416**(6880): p. 535-9.
20. Xu, H., et al., *Estrogen reduces neuronal generation of Alzheimer beta-amyloid peptides*. Nat Med, 1998. **4**(4): p. 447-51.
21. Hansson Petersen, C.A., et al., *The amyloid beta-peptide is imported into mitochondria via the TOM import machinery and localized to mitochondrial cristae*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(35): p. 13145-50.
22. Terry, R.D., *Cell death or synaptic loss in Alzheimer disease*. J Neuropathol Exp Neurol, 2000. **59**(12): p. 1118-9.
23. Selkoe, D.J., *Alzheimer disease: mechanistic understanding predicts novel therapies*. Ann Intern Med, 2004. **140**(8): p. 627-38.
24. Woltjer, R.L., et al., *Effects of chemical chaperones on oxidative stress and detergent-insoluble species formation following conditional expression of amyloid precursor protein carboxy-terminal fragment*. Neurobiol Dis, 2007. **25**(2): p. 427-37.
25. Apelt, J., et al., *Aging-related increase in oxidative stress correlates with developmental pattern of beta-secretase activity and beta-amyloid plaque formation in transgenic Tg2576 mice with Alzheimer-like pathology*. Int J Dev Neurosci, 2004. **22**(7): p. 475-84.
26. Stackman, R.W., et al., *Prevention of age-related spatial memory deficits in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease by chronic Ginkgo biloba treatment*. Exp Neurol, 2003. **184**(1): p. 510-20.
27. Nishida, Y., et al., *Deletion of vitamin E enhances phenotype of Alzheimer disease model mouse*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **350**(3): p. 530-6.
28. Nakashima, H., et al., *Effects of alpha-tocopherol on an animal model of tauopathies*. Free Radic Biol Med, 2004. **37**(2): p. 176-86.
29. Goedert, M., et al., *Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(11): p. 4051-5.
30. Weingarten, M.D., et al., *A protein factor essential for microtubule assembly*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(5): p. 1858-62.
31. Johnson, G.V. and W.H. Stoothoff, *Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 24): p. 5721-9.
32. Gotz, J., *Tau and transgenic animal models*. Brain Res Brain Res Rev, 2001. **35**(3): p. 266-86.
33. Sang, H., et al., *Phosphorylation of tau by glycogen synthase kinase 3beta in intact mammalian cells influences the stability of microtubules*. Neurosci Lett, 2001. **312**(3): p. 141-4.
34. Goedert, M. and M.G. Spillantini, *A century of Alzheimer's disease*. Science, 2006. **314**(5800): p. 777-81.
35. Lee, V.M., M. Goedert, and J.Q. Trojanowski, *Neurodegenerative tauopathies*. Annu Rev Neurosci, 2001. **24**: p. 1121-59.

36. Wolfe, M.S., *Tau mutations in neurodegenerative diseases*. J Biol Chem, 2009. **284**(10): p. 6021-5.
37. Ikegami, S., A. Harada, and N. Hirokawa, *Muscle weakness, hyperactivity, and impairment in fear conditioning in tau-deficient mice*. Neurosci Lett, 2000. **279**(3): p. 129-32.
38. Ballatore, C., V.M. Lee, and J.Q. Trojanowski, *Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders*. Nat Rev Neurosci, 2007. **8**(9): p. 663-72.
39. Oddo, S., et al., *Abeta immunotherapy leads to clearance of early, but not late, hyperphosphorylated tau aggregates via the proteasome*. Neuron, 2004. **43**(3): p. 321-32.
40. Gotz, J., et al., *A decade of tau transgenic animal models and beyond*. Brain Pathol, 2007. **17**(1): p. 91-103.
41. Muqit, M.M. and M.B. Feany, *Modelling neurodegenerative diseases in Drosophila: a fruitful approach?* Nat Rev Neurosci, 2002. **3**(3): p. 237-43.
42. Wittmann, C.W., et al., *Tauopathy in Drosophila: neurodegeneration without neurofibrillary tangles*. Science, 2001. **293**(5530): p. 711-4.
43. Santacruz, K., et al., *Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function*. Science, 2005. **309**(5733): p. 476-81.
44. Jackson, G.R., et al., *Human wild-type tau interacts with wingless pathway components and produces neurofibrillary pathology in Drosophila*. Neuron, 2002. **34**(4): p. 509-19.
45. Dias-Santagata, D., et al., *Oxidative stress mediates tau-induced neurodegeneration in Drosophila*. J Clin Invest, 2007. **117**(1): p. 236-45.
46. Fulga, T.A., et al., *Abnormal bundling and accumulation of F-actin mediates tau-induced neuronal degeneration in vivo*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(2): p. 139-48.
47. Fossgreen, A., et al., *Transgenic Drosophila expressing human amyloid precursor protein show gamma-secretase activity and a blistered-wing phenotype*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(23): p. 13703-8.
48. Takasugi, N., et al., *The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex*. Nature, 2003. **422**(6930): p. 438-41.
49. Seidner, G.A., et al., *Modeling clinically heterogeneous presenilin mutations with transgenic Drosophila*. Curr Biol, 2006. **16**(10): p. 1026-33.
50. Li, A., et al., *Isolation and characterization of the Drosophila ubiquilin ortholog dUbqln: in vivo interaction with early-onset Alzheimer disease genes*. Hum Mol Genet, 2007. **16**(21): p. 2626-39.
51. Francis, R., et al., *aph-1 and pen-2 are required for Notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of betaAPP, and presenilin protein accumulation*. Dev Cell, 2002. **3**(1): p. 85-97.
52. Schafer, W.F., *Genetics of egg-laying in worms*. Annu Rev Genet, 2006. **40**: p. 487-509.
53. Gotz, J., et al., *Somatodendritic localization and hyperphosphorylation of tau protein in transgenic mice expressing the longest human brain tau isoform*. EMBO J, 1995. **14**(7): p. 1304-13.

54. Lewis, J., et al., *Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein*. Nat Genet, 2000. **25**(4): p. 402-5.
55. Wang, R., et al., *Wild-type presenilin 1 protects against Alzheimer disease mutation-induced amyloid pathology*. J Biol Chem, 2006. **281**(22): p. 15330-6.
56. Holcomb, L., et al., *Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes*. Nat Med, 1998. **4**(1): p. 97-100.
57. McConlogue, L., et al., *Partial reduction of BACE1 has dramatic effects on Alzheimer plaque and synaptic pathology in APP Transgenic Mice*. J Biol Chem, 2007. **282**(36): p. 26326-34.
58. Willem, M., et al., *beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 increases amyloid deposition in brain parenchyma but reduces cerebrovascular amyloid angiopathy in aging BACE x APP[V717I] double-transgenic mice*. Am J Pathol, 2004. **165**(5): p. 1621-31.
59. Postina, R., et al., *A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model*. J Clin Invest, 2004. **113**(10): p. 1456-64.
60. Gotz, J., et al., *Formation of neurofibrillary tangles in P301L tau transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils*. Science, 2001. **293**(5534): p. 1491-5.
61. Terwel, D., et al., *Amyloid activates GSK-3beta to aggravate neuronal tauopathy in bigenic mice*. Am J Pathol, 2008. **172**(3): p. 786-98.
62. Phiel, C.J., et al., *GSK-3alpha regulates production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides*. Nature, 2003. **423**(6938): p. 435-9.
63. Oddo, S., et al., *Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction*. Neuron, 2003. **39**(3): p. 409-21.
64. Gotz, J. and L.M. Ittner, *Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia*. Nat Rev Neurosci, 2008. **9**(7): p. 532-44.
65. Filali, M., R. Lalonde, and S. Rivest, *Cognitive and non-cognitive behaviors in an APPswe/PS1 bigenic model of Alzheimer's disease*. Genes Brain Behav, 2009. **8**(2): p. 143-8.
66. Bales, K.R., et al., *Lack of apolipoprotein E dramatically reduces amyloid beta-peptide deposition*. Nat Genet, 1997. **17**(3): p. 263-4.
67. Stokin, G.B., et al., *Axonopathy and transport deficits early in the pathogenesis of Alzheimer's disease*. Science, 2005. **307**(5713): p. 1282-8.
68. Jankowsky, J.L., et al., *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, 2004. **13**(2): p. 159-70.
69. Garcia-Alloza, M., et al., *Characterization of amyloid deposition in the APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer disease*. Neurobiol Dis, 2006. **24**(3): p. 516-24.
70. Scheuner, D., et al., *Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease*. Nat Med, 1996. **2**(8): p. 864-70.

71. Morrisette, D.A., et al., *Relevance of transgenic mouse models to human Alzheimer disease*. J Biol Chem, 2009. **284**(10): p. 6033-7.
72. Hardy, J. and D. Allsop, *Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease*. Trends Pharmacol Sci, 1991. **12**(10): p. 383-8.
73. Hardy, J. and D.J. Selkoe, *The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics*. Science, 2002. **297**(5580): p. 353-6.
74. Moussa, C.E., et al., *Transgenic expression of beta-APP in fast-twitch skeletal muscle leads to calcium dyshomeostasis and IBM-like pathology*. FASEB J, 2006. **20**(12): p. 2165-7.
75. Almeida, C.G., R.H. Takahashi, and G.K. Gouras, *Beta-amyloid accumulation impairs multivesicular body sorting by inhibiting the ubiquitin-proteasome system*. J Neurosci, 2006. **26**(16): p. 4277-88.
76. Billings, L.M., et al., *Intraneuronal Abeta causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice*. Neuron, 2005. **45**(5): p. 675-88.
77. Caspersen, C., et al., *Mitochondrial Abeta: a potential focal point for neuronal metabolic dysfunction in Alzheimer's disease*. FASEB J, 2005. **19**(14): p. 2040-1.
78. LaFerla, F.M., K.N. Green, and S. Oddo, *Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease*. Nat Rev Neurosci, 2007. **8**(7): p. 499-509.
79. Bowen, D.M., et al., *Choline acetyltransferase activity and histopathology of frontal neocortex from biopsies of demented patients*. J Neurol Sci, 1982. **57**(2-3): p. 191-202.
80. Sadot, E., et al., *Activation of m1 muscarinic acetylcholine receptor regulates tau phosphorylation in transfected PC12 cells*. J Neurochem, 1996. **66**(2): p. 877-80.
81. Nitsch, R.M., et al., *Release of Alzheimer amyloid precursor derivatives stimulated by activation of muscarinic acetylcholine receptors*. Science, 1992. **258**(5080): p. 304-7.
82. Buxbaum, J.D., et al., *Cholinergic agonists and interleukin 1 regulate processing and secretion of the Alzheimer beta/A4 amyloid protein precursor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(21): p. 10075-8.
83. Francis, P.T., et al., *The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1999. **66**(2): p. 137-47.
84. Schilling, S., et al., *Glutamyl cyclase inhibition attenuates pyroglutamate Abeta and Alzheimer's disease-like pathology*. Nat Med, 2008. **14**(10): p. 1106-11.
85. Lukiw, W.J., *Emerging amyloid beta (Ab) peptide modulators for the treatment of Alzheimer's disease (AD)*. Expert Opin Emerg Drugs, 2008. **13**(2): p. 255-71.
86. Selkoe, D.J. and D. Schenk, *Alzheimer's disease: molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2003. **43**: p. 545-84.
87. Wisniewski, T. and U. Konietzko, *Amyloid-beta immunisation for Alzheimer's disease*. Lancet Neurol, 2008. **7**(9): p. 805-11.
88. Paris, D., et al., *Inhibition of Abeta production by NF-kappaB inhibitors*. Neurosci Lett, 2007. **415**(1): p. 11-6.
89. Landreth, G., et al., *PPARgamma agonists as therapeutics for the treatment of Alzheimer's disease*. Neurotherapeutics, 2008. **5**(3): p. 481-9.

90. Copani, A., et al., *The nature of the cell cycle in neurons: focus on a "non-canonical" pathway of DNA replication causally related to death*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1772**(4): p. 409-12.
91. Jin, K., et al., *Enhanced neurogenesis in Alzheimer's disease transgenic (PDGF-APP<sup>Sw,Ind</sup>) mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(36): p. 13363-7.
92. Strecker, A., *Über einige neue Bestandtheile der Schweingalle*. *Ann. Chem. Pharmacie*, 1862. **183**: p. 964-965.
93. Albright, C.D., et al., *Choline deficiency induces apoptosis in SV40-immortalized CWSV-1 rat hepatocytes in culture*. *FASEB J*, 1996. **10**(4): p. 510-6.
94. Zeisel, S.H., *Choline: essential for brain development and function*. *Adv Pediatr*, 1997. **44**: p. 263-95.
95. Ghoshal, A.K., *New insight into the biochemical pathology of liver in choline deficiency*. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 1995. **30**(4): p. 263-73.
96. Blusztajn, J.K., *Choline, a vital amine*. *Science*, 1998. **281**(5378): p. 794-5.
97. Meck, W.H., R.A. Smith, and C.L. Williams, *Organizational changes in cholinergic activity and enhanced visuospatial memory as a function of choline administered prenatally or postnatally or both*. *Behav Neurosci*, 1989. **103**(6): p. 1234-41.
98. Meck, W.H. and C.L. Williams, *Simultaneous temporal processing is sensitive to prenatal choline availability in mature and aged rats*. *Neuroreport*, 1997. **8**(14): p. 3045-51.
99. Meck, W.H. and C.L. Williams, *Characterization of the facilitative effects of perinatal choline supplementation on timing and temporal memory*. *Neuroreport*, 1997. **8**(13): p. 2831-5.
100. Michel, V., et al., *Choline transport for phospholipid synthesis*. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2006. **231**(5): p. 490-504.
101. Lockman, P.R. and D.D. Allen, *The transport of choline*. *Drug Dev Ind Pharm*, 2002. **28**(7): p. 749-71.
102. Apparsundaram, S., et al., *Molecular cloning of a human, hemicholinium-3-sensitive choline transporter*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. **276**(3): p. 862-7.
103. Apparsundaram, S., S.M. Ferguson, and R.D. Blakely, *Molecular cloning and characterization of a murine hemicholinium-3-sensitive choline transporter*. *Biochem Soc Trans*, 2001. **29**(Pt 6): p. 711-6.
104. Cooper, J.R., F.E. Bloom, and R.H. Roth, *The Biochemical Basis of Neuropharmacology*. 1996, New York: Oxford University Press.
105. Hemsworth, B.A. and H.B. Bosmann, *The incorporation of triethylcholine into isolated guinea pig cerebral cortex synaptosoma and synaptic vesicle fractions*. *Eur J Pharmacol*, 1971. **16**(2): p. 164-70.
106. Hegazy, E. and M. Schwenk, *Choline uptake by isolated enterocytes of guinea pig*. *J Nutr*, 1984. **114**(12): p. 2217-20.
107. Jonker, J.W., et al., *Reduced hepatic uptake and intestinal excretion of organic cations in mice with a targeted disruption of the organic cation transporter 1 (Oct1 [Slc22a1]) gene*. *Mol Cell Biol*, 2001. **21**(16): p. 5471-7.
108. Haga, T. and H. Noda, *Choline uptake systems of rat brain synaptosomes*. *Biochim Biophys Acta*, 1973. **291**(2): p. 564-75.

109. Li, Z., L.B. Agellon, and D.E. Vance, *Phosphatidylcholine homeostasis and liver failure*. J Biol Chem, 2005. **280**(45): p. 37798-802.
110. Yamamura, H.I. and S.H. Snyder, *Choline: high-affinity uptake by rat brain synaptosomes*. Science, 1972. **178**(61): p. 626-8.
111. Nakata, K., T. Okuda, and H. Misawa, *Ultrastructural localization of high-affinity choline transporter in the rat neuromuscular junction: enrichment on synaptic vesicles*. Synapse, 2004. **53**(1): p. 53-6.
112. Happe, H.K. and L.C. Murrin, *High-affinity choline transport sites: use of [<sup>3</sup>H]hemicholinium-3 as a quantitative marker*. J Neurochem, 1993. **60**(4): p. 1191-201.
113. Manaker, S., C.M. Wieczorek, and T.C. Rainbow, *Identification of sodium-dependent, high-affinity choline uptake sites in rat brain with [<sup>3</sup>H]hemicholinium-3*. J Neurochem, 1986. **46**(2): p. 483-8.
114. Shimon, M., et al., *Vascular cholinesterases and choline uptake in isolated rat forebrain microvessels: a possible link*. J Neurochem, 1989. **53**(2): p. 561-5.
115. Happe, H.K. and L.C. Murrin, *Development of high-affinity choline transport sites in rat forebrain: a quantitative autoradiography study with [<sup>3</sup>H]hemicholinium-3*. J Comp Neurol, 1992. **321**(4): p. 591-611.
116. Collier, B., *About the coupling of acetylcholine hydrolysis and choline uptake at cholinergic nerve terminals*. J Neurochem, 1988. **50**(1): p. 323-4.
117. Ferguson, S.M., et al., *Lethal impairment of cholinergic neurotransmission in hemicholinium-3-sensitive choline transporter knockout mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(23): p. 8762-7.
118. Mullen, G.P., et al., *Choline transport and de novo choline synthesis support acetylcholine biosynthesis in Caenorhabditis elegans cholinergic neurons*. Genetics, 2007. **177**(1): p. 195-204.
119. Tucek, S., *Regulation of acetylcholine synthesis in the brain*. J Neurochem, 1985. **44**(1): p. 11-24.
120. Okuda, T. and T. Haga, *Functional characterization of the human high-affinity choline transporter*. FEBS Lett, 2000. **484**(2): p. 92-7.
121. Neumann, S.A., et al., *Heart rate variability is associated with polymorphic variation in the choline transporter gene*. Psychosom Med, 2005. **67**(2): p. 168-71.
122. Haberberger, R.V., et al., *Expression of the high-affinity choline transporter, CHT1, in the neuronal and non-neuronal cholinergic system of human and rat skin*. J Invest Dermatol, 2002. **119**(4): p. 943-8.
123. Lips, K.S., et al., *Expression of the high-affinity choline transporter CHT1 in rat and human arteries*. J Histochem Cytochem, 2003. **51**(12): p. 1645-54.
124. Kobayashi, Y., et al., *Distribution of the high-affinity choline transporter in the human and macaque monkey spinal cord*. Neurosci Lett, 2002. **317**(1): p. 25-8.
125. Lips, K.S., et al., *Localisation of the high-affinity choline transporter-1 in the rat skeletal motor unit*. Cell Tissue Res, 2002. **307**(3): p. 275-80.
126. Misawa, H., et al., *Distribution of the high-affinity choline transporter in the central nervous system of the rat*. Neuroscience, 2001. **105**(1): p. 87-98.

127. Ribeiro, F.M., et al., *Constitutive high-affinity choline transporter endocytosis is determined by a carboxyl-terminal tail dileucine motif*. J Neurochem, 2005. **94**(1): p. 86-96.
128. Cooke, L.J. and R.J. Rylett, *Inhibitors of serine/threonine phosphatases increase membrane-bound choline acetyltransferase activity and enhance acetylcholine synthesis*. Brain Res, 1997. **751**(2): p. 232-8.
129. Issa, A.M., S. Gauthier, and B. Collier, *Effects of the phosphatase inhibitors calyculin A and okadaic acid on acetylcholine synthesis and content of rat hippocampal formation*. J Neurochem, 1996. **66**(5): p. 1924-32.
130. Ivy, M.T., et al., *Hemicholinium-3 mustard reveals two populations of cycling choline cotransporters in Limulus*. Neuroscience, 2001. **102**(4): p. 969-78.
131. Gates, J., Jr., et al., *Regulation of choline transporter surface expression and phosphorylation by protein kinase C and protein phosphatase 1/2A*. J Pharmacol Exp Ther, 2004. **310**(2): p. 536-45.
132. Ferguson, S.M., et al., *Vesicular localization and activity-dependent trafficking of presynaptic choline transporters*. J Neurosci, 2003. **23**(30): p. 9697-709.
133. Okuda, T., et al., *Single nucleotide polymorphism of the human high affinity choline transporter alters transport rate*. J Biol Chem, 2002. **277**(47): p. 45315-22.
134. Robinson, M.B., *Regulated trafficking of neurotransmitter transporters: common notes but different melodies*. J Neurochem, 2002. **80**(1): p. 1-11.
135. Ribeiro, F.M., et al., *The hemicholinium-3 sensitive high affinity choline transporter is internalized by clathrin-mediated endocytosis and is present in endosomes and synaptic vesicles*. J Neurochem, 2003. **87**(1): p. 136-46.
136. Bravo, D.T., N.G. Kolmakova, and S.M. Parsons, *Choline is transported by vesicular acetylcholine transporter*. J Neurochem, 2004. **91**(3): p. 766-8.
137. Apparsundaram, S., et al., *Increased capacity and density of choline transporters situated in synaptic membranes of the right medial prefrontal cortex of attentional task-performing rats*. J Neurosci, 2005. **25**(15): p. 3851-6.
138. O'Regan, S. and F.M. Meunier, *Selection and characterization of the choline transport mutation suppressor from Torpedo electric lobe, CTL1*. Neurochem Res, 2003. **28**(3-4): p. 551-5.
139. O'Regan, S., et al., *An electric lobe suppressor for a yeast choline transport mutation belongs to a new family of transporter-like proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(4): p. 1835-40.
140. Wille, S., et al., *Characterization of CDw92 as a member of the choline transporter-like protein family regulated specifically on dendritic cells*. J Immunol, 2001. **167**(10): p. 5795-804.
141. Yuan, Z., et al., *Genomic organization, promoter activity, and expression of the human choline transporter-like protein 1*. Physiol Genomics, 2006. **26**(1): p. 76-90.
142. Traiffort, E., et al., *Molecular characterization of the family of choline transporter-like proteins and their splice variants*. J Neurochem, 2005. **92**(5): p. 1116-25.
143. Yuan, Z., et al., *Identification and expression of a mouse muscle-specific CTL1 gene*. Gene, 2004. **341**: p. 305-12.



144. Fullerton, M.D., et al., *Impaired trafficking of choline transporter-like protein-1 at plasma membrane and inhibition of choline transport in THP-1 monocyte-derived macrophages*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006. **290**(4): p. C1230-8.
145. Ishiguro, N., et al., *Decreased biosynthesis of lung surfactant constituent phosphatidylcholine due to inhibition of choline transporter by gefitinib in lung alveolar cells*. *Pharm Res*, 2008. **25**(2): p. 417-27.
146. Lecomte, M.J., et al., *Differential expression and regulation of the high-affinity choline transporter CHT1 and choline acetyltransferase in neurons of superior cervical ganglia*. *Mol Cell Neurosci*, 2005. **28**(2): p. 303-13.
147. Vissing, K., et al., *Gene expression of myogenic factors and phenotype-specific markers in electrically stimulated muscle of paraplegics*. *J Appl Physiol*, 2005. **99**(1): p. 164-72.
148. Wang, T., et al., *Choline transporters in human lung adenocarcinoma: expression and functional implications*. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2007. **39**(9): p. 668-74.
149. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
150. Rudajev, V., et al., *Dominant portion of thyrotropin-releasing hormone receptor is excluded from lipid domains. Detergent-resistant and detergent-sensitive pools of TRH receptor and Gqalpha/G11alpha protein*. *J Biochem*, 2005. **138**(2): p. 111-25.
151. Machova, E., et al., *Detection of choline transporter-like 1 protein CTL1 in neuroblastoma x glioma cells and in the CNS, and its role in choline uptake*. *J Neurochem*, 2009. **110**(4): p. 1297-309.
152. Bartus, R.T., et al., *The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction*. *Science*, 1982. **217**(4558): p. 408-14.
153. Machova, E., et al., *Impairment of muscarinic transmission in transgenic APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> mice*. *Neurobiol Aging*, 2008. **29**(3): p. 368-78.
154. Machova, E., et al., *Functional cholinergic damage develops with amyloid accumulation in young adult APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> transgenic mice*. *Neurobiol Dis*, 2010. **38**(1): p. 27-35.
155. Yamamura, H.I. and S.H. Snyder, *High affinity transport of choline into synaptosomes of rat brain*. *J Neurochem*, 1973. **21**(6): p. 1355-74.
156. Cermak, J.M., et al., *Prenatal availability of choline modifies development of the hippocampal cholinergic system*. *FASEB J*, 1998. **12**(3): p. 349-57.
157. Che, Y.H., et al., *Changes in mRNA for choline transporter-like protein following facial nerve transection*. *Brain Res Mol Brain Res*, 2002. **101**(1-2): p. 122-5.