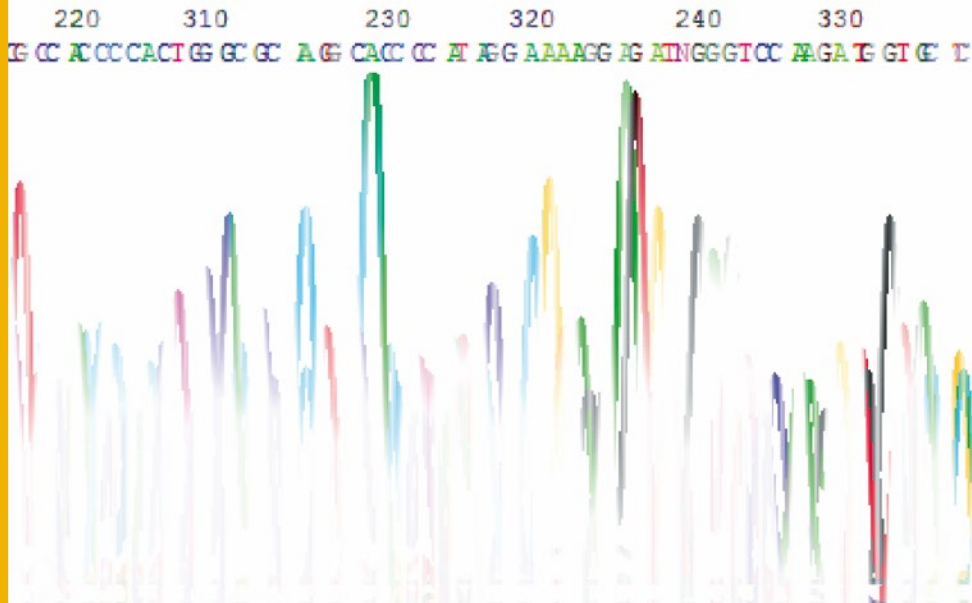


RNDr. Katarína LEXO VÁ KOLEJÁKOVÁ, PhD.

MOLEKULÁRNO-GENETICKÁ DIAGNOSTIKA ALZHEIMEROVEJ CHOROBY

RECENZENT prof. MUDr. Peter Turčáni, PhD.



Vydané s podporou spoločnosti Lundbeck



RNDr. Katarína LEXOVÁ KOLEJÁKOVÁ, PhD.

MOLEKULÁRNO- GENETICKÁ DIAGNOSTIKA ALZHEIMEROVEJ CHOROBY

recenzent: prof. MUDr. Peter Turčáni, PhD.

Vydané s podporou spoločnosti Lundbeck



POĎAKOVANIE

Touto cestou vyslovujem poďakovanie školiteľom dizertačnej práce prof. MUDr. Petrovi Turčáňimu, PhD. a doc. MUDr. Jánovi Chandogovi, CSc. za pomoc, odborné vedenie, cenné rady a pripomienky pri vypracovaní mojej práce.

Ďakujem všetkým pracovníkom Ústavu lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK a UNB na úseku metabolických chorôb za všestrannú pomoc, užitočné rady a vytvorenie príjemného pracovného prostredia.

V neposlednom rade ďakujem mojej rodine a priateľom.

OBSAH

POĎAKOVANIE	3
OBSAH	5
ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK	6
1. ÚVOD	7
2. LITERÁRNY PREHLAD	8
2.1 Klasifikácia Alzheimerovej choroby	8
2.1.1 Klinické prejavy.....	9
2.2 Epidemiológia a rizikové faktory	9
2.2.1 Genetické rizikové faktory.....	10
2.3 Amyloidový prekurzorový proteín	11
2.3.1 Štruktúra amyloidového prekurzorového proteínu.....	12
2.3.2 Funkcia APP.....	14
2.3.3 Protelytické štiepenie APP.....	15
2.3.3.1 α -sekrétáza.....	16
2.3.3.2 β -sekrétáza.....	17
2.3.3.3 γ -sekrétáza.....	18
2.3.4 Lokalizácia sekretáz a APP procesingu v neurónoch.....	18
2.3.5 β -amyloidový peptid a jeho degradácia.....	19
2.3.5.1 Inzulín degradujúci enzým (IDE).....	20
2.3.5.2 Neprilyzín (NEP).....	20
2.3.6 Mutácie v APP géne.....	21
2.3.6.1 Patologický vplyv APP mutácií.....	22
2.4 Presenilíny	24
2.4.1 Základná charakteristika presenilínov.....	24
2.4.2 Štruktúra presenilínov.....	24
2.4.3 Posttranslačné modifikácie a proteolýza presenilínov.....	26
2.4.4 Funkcia presenilínov.....	27
2.4.4.1 γ -sekrétázová aktivita.....	27
2.4.4.2 Programovaná bunková smrť.....	29
2.4.4.3 Notch signálna transdukcia.....	29
2.4.4.4 Signálna dráha β -katenínu.....	29
2.4.4.5 Interakcie s inými proteínmi.....	30
2.4.5 Mutácie v presenilínoch.....	31
2.5 Proteín Tau	32
2.5.1 Molekulárna štruktúra a funkcia tau.....	33
2.5.2 Fosforylácia tau.....	34
2.5.3 Tvorba a morfológia neurofibrilárnych spleť.....	35
2.6 Apolipoproteín E	36
2.6.1 Štruktúra a expresia ApoE.....	36

2.6.2	Polymorfizmy apoE	37
2.6.3	Funkcia apoE	37
2.6.4	Neuropatológia apoE	38
2.7	Patogenéza Alzheimerovej choroby	40
2.7.1	β Amyloidová teória	40
2.7.1.1	Oxidačný stres	41
2.7.1.2	Zápalová odpoveď	42
2.7.1.3	Porucha energetického metabolizmu	42
2.7.1.4	Narušená homeostáza vápnika a kovov	42
2.7.1.5	Aktivácia signálnych dráh	42
2.7.2	Tau proteínová teória	43
2.8	Diagnostika	44
2.8.1	Identifikácia apoE izoform pomocou polymorfizmu dĺžky restriktčných fragmentov (PCR-RFLP)	45
2.8.2	Molekulárno-genetická analýza kandidátnych génov	46
3.	CIELE	47
4.	MATERIÁL A METÓDY	48
4.1	MATERIÁL	48
4.1.1	Výber vzoriek	48
4.1.2	Chemikálie a roztoky	48
4.2	METÓDY	50
4.2.1	Izolácia DNA	50
4.2.2	Určenie genotypov ApoE pomocou restriktčnej analýzy (PCR-RFLP)	51
4.2.3	Optimalizácia podmienok pre analýzu APP génu	53
4.2.4	Optimalizácia podmienok pre analýzu <i>psen1</i> génu	53
4.2.5	Optimalizácia podmienok pre analýzu <i>psen 2</i> a tau	55
4.2.6	Purifikácia PCR produktov pomocou enzýmov	55
4.2.7	Sekvenačná reakcia	55
4.2.8	Prečistenie produktov pred sekvenovaním pomocou ExTerminator Kit	57
4.2.9	Sekvenovanie	57
5.	VÝSLEDKY	58
5.1	GENOTYPIZÁCIA APOE	58
5.1.1	Štatistické vyhodnotenie zastúpenia apoE	63
5.2	MOLEKULÁRNO-GENETICKÁ ANALÝZA GÉNOV <i>APP</i> , <i>PSEN1</i> , <i>PSEN2</i> , <i>TAU</i>	72
5.2.1	Amplifikácia exónov 16 a 17 <i>APP</i> génu	72
5.2.2	Amplifikácia exónov <i>psen1</i> a <i>psen2</i> génov	72
5.2.3	Amplifikácia exónov génu <i>tau</i>	73
5.2.4	Sekvenčné analýzy	73
6.	DISKUSIA	85
7.	ZÁVER	94
8.	POUŽITÁ LITERATÚRA	96

ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

ABR	acidobázická rovnováha
A β	amyloidový β peptid
AICD	amyloidová intracelulárna doména
AD	Alzheimerova choroba
ADFAD	Familiárna Alzheimerova choroba s autozómovo dominantnou dedičnosťou
Amk	aminokyselina
apoE	apolipoproteín E
APLP	amyloid precursor-like protein
APP	amyloidový prekurzorový proteín
BACE	β -site cleavage enzyme
CT	karboxyterminálny koniec
DSM-IV	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders IV
FAD	familiárna Alzheimerova choroba
GSK-3	glykogén syntáza kináza 3
IDE	inzulín degradujúci enzým
KPI	Kunitz protease inhibitor domain
MAP	microtubule associated protein
NINCDS-ADRDA kritériá	National Institute of Neurological and Communicative disease and Stroke/Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA) Criteria For The Clinical Diagnosis of Alzheimer's disease
Psen1	presenilín 1
Psen2	presenilín 2
TMD	transmembránová doména
TACE	tumor necrosis faktor α (TNF α) converting enzyme

1. ÚVOD

Alzheimerova choroba (AD), najčastejšia príčina demencie, je ireverzibilné, progresívne neurodegeneratívne ochorenie, charakteristické poklesom vyšších kognitívnych funkcií, vrátane krátkodobej pamäte, abstraktného myslenia, koncentrácie, rečových schopností, zrakového vnímania a priestorovej orientácie. Po prvýkrát bola popísaná nemeckým neurológom Aloisom Alzheimerom v roku 1907 ako neuropatologický syndróm charakteristický progresívnou demenciou. Alzheimer ako prvý demonštroval vzťah medzi špecifickými kognitívnymi zmenami, neurologickými léziami pri pitve a klinickým priebehom choroby (*Alzheimer, 1907*). AD sa vyznačuje charakteristickou neuropatológiou, ktorá zahŕňa prítomnosť intraneuronálnych neurofibrilárnych spleťí a prítomnosť amyloidových a senilných plakov v extracelulárnom priestore. Neurofibrilárne splete predstavujú hyperfosforylovanú formu s mikrotubulami asociovaného proteínu Tau (*Grundke-Iqbal a kol., 1988*). Amyloidové plaky sú tvorené množstvom proteínov a hlavne amyloidovým β peptidom ($A\beta$) o dĺžke 40-42 aminokyselín. $A\beta$ je proteolytický derivát amyloidového prekursorového proteínu (*Glennner a kol., 1984; Hardy a Allsop, 1991; Selkoe, 1989*). Dané patologické atribúty môžu poslúžiť pri diagnostike a identifikácii kandidátnych génov. Klinické symptómy sú výsledkom dysfunkcie neurónov a ich odumierania v špecifických oblastiach mozgovej kôry.

AD je geneticky heterogénne ochorenie vyskytujúce sa vo familiárnej a sporadickej forme. Familiárna forma AD (FAD) so skorým nástupom je zriedkavé autozomálne dominantné ochorenie, spôsobené mutáciami v génoch pre amyloidový prekursorový proteín (APP), presenilín 1 a presenilín 2 (*Janssen a kol., 2003; Van Duijn a kol., 1991*). Sporadická forma je častejšia a vyznačuje sa neskorým nástupom. Predpokladá sa, že sporadická forma je od veku závislá a je výsledkom pôsobenia genetických a enviromentálnych rizikových faktorov. Zistila sa asociácia sporadickej formy s genotypom apolipoproteínu E, ktorý predstavuje veľmi významný genetický rizikový faktor pri vývoji ochorenia.

Diagnostický prístup zahŕňa rodinnú anamnézu, neurologické a psychologické vyšetrenia, zobrazovacie metódy a molekulárno-genetickú diagnostiku. Molekulárno-genetická analýza kandidátnych génov v rodine s postihnutým pacientom, je veľmi významná nielen pri diagnostike postihnutých jedincov, ale zahŕňa aj identifikáciu patologickej mutácie, určenie nositeľov mutantnej alely, segregáciu alely z rodičov na potomstvo a následné zostavenie rodokmeňa.

Napriek náročným diagnostickým metódam, diagnostika AD in vivo nie je spoľahlivo vypracovaná s výnimkou familiárnych foriem. Až post mortem histopatologické vyšetrenie s detekciou neurofibrilárnych spleťí a senilných plakov môže definitívne potvrdiť diagnózu AD a vylúčiť iný typ demencie.

Práca poskytuje prehľad o epidemiológii, rizikových faktoroch AD, a dôležitých génoch, o ktorých sa predpokladá, že sú zahrnuté v patogenéze AD, teda o kandidátnych génoch. V práci je popísaná úloha jednotlivých génov, ktorých mutácie vedú k vzniku FAD so skorým nástupom a molekulárne funkcie nimi kódovaných proteínov. Taktiež sa zaoberá genetickými rizikovými faktormi pri AD s neskorým nástupom ochorenia.

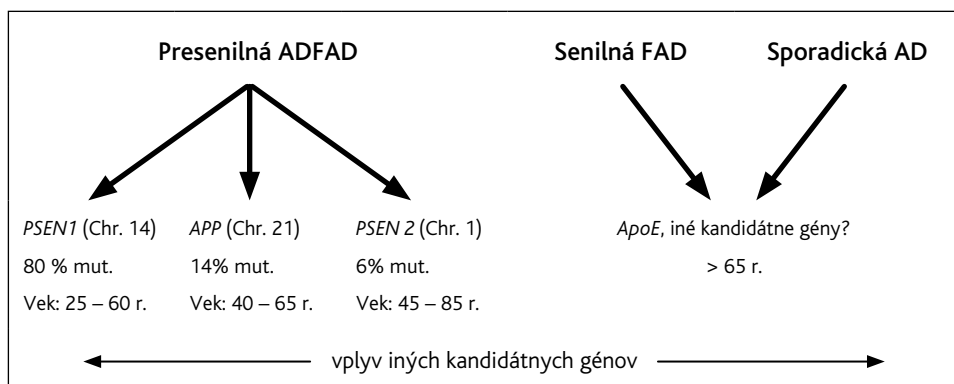
2. LITERÁRNY PREHĽAD

2.1 Klasifikácia Alzheimerovej choroby

Alzheimerova choroba (AD) je multifaktoriálne, geneticky heterogénne ochorenie, vyskytujúce sa vo familiárnej alebo sporadickej forme. Klasifikuje sa na základe veku nástupu ochorenia na formu so skorým nástupom do 65 roku života – presenilnú demenciu a na formu s neskorým začiatkom po roku 65 – senilnú demenciu (Terry a Katzman, 1983). **Alzheimerova choroba so skorým nástupom ochorenia** a familiárnym výskytom (FAD) zodpovedá za 10% všetkých AD prípadov. **13% FAD so skorým nástupom** predstavuje familiárna forma s autozómovo dominantnou dedičnosťou (ADFAD) (Campion a kol., 1999). **Familiárna Alzheimerova choroba so skorým začiatkom a s autozómovo dominantnou dedičnosťou (ADFAD)** sa vyznačuje vysokou penetranciou. Campion a kol. (1999) definovali ADFAD ako výskyt jedného prípadu AD so skorým nástupom v troch generáciách. Stanovili prevalenciu na 5,3 na 100,000 ľudí. Doposiaľ boli popísané tri gény, ktorých mutácie vedú k ADFAD. Sú to gén pre amyloidový prekursorový proteín (*APP*), lokalizovaný na chromozóme 21, presenilín 1 (*psen1*) lokalizovaný na chromozóme 14 a presenilín 2 (*psen2*) na chromozóme 1. Podľa mutačnej databázy AD (Alzheimer Disease & Frontotemporal Dementia Mutation Database) (<http://www.molgen.ua.ac.be/ADMutations/>), 80% predstavujú mutácie v *psen 1*, 14% v géne *APP* a 6% v *psen 2*. Mutácie v daných génoch vysvetľujú 70 % prípadov ADFAD a teda zodpovedajú za menej ako 1 % všetkých prípadov AD. Mutácie v jednotlivých génoch vedú k odlišnému veku nástupu ochorenia. Vek nástupu ochorenia pri mutáciách v *psen 1* je 35-60 rokov, *APP* je 40-65 rokov a *psen 2* je 45-85 rokov (obrázok 1) (Campion a kol., 1999). V rodinách, kde AD segreguje autozómovo dominantne má každý jedinec 50% riziko, že zdedí patologickú mutáciu. Nakoľko väčšina prípadov FAD nie je vysvetlená mutáciami v daných génoch, tak sa predpokladá vplyv aj iných génov a genetických faktorov.

AD s neskorým nástupom, či už s familiárnym alebo sporadickým výskytom, je podmienená **multifaktoriálne**. Okolo 75% tvorí práve sporadická forma AD. Okolo 15% predstavuje forma familiárna s neskorým nástupom ochorenia. Predpokladá sa, že 40% až 50% tvoria genetické rizikové faktory (Lautenschlager a kol., 1996; Rocca a kol., 1991). Väčšina foriem AD má komplexný genetický základ daný jedným alebo viacerými nezávisle pôsobiacimi génmi s neúplnou penetranciou, mnohými interagujúcimi génmi alebo kombináciou genetických faktorov a faktorov životného prostredia.

Obrázok 1.: Opis jednotlivých foriem AD



2.1.1 Klinické prejavy

Klinický priebeh AD je charakteristický pozvoľným začiatkom porúch pamäte, s postupnou progresiou cez štádium mierneho deficitu až k demencii. Začína sa poruchou novopamäte. Pamäťové poruchy sa vo všeobecnosti prejavujú ľahkou stratou schopnosti spomenúť si na nedávne udalosti alebo skutočnosti. Tie sa postupne zvyrazňujú a neskôr sa k nim pridružia zmeny osobnosti a pokles kognitívnych funkcií. Schudobnie abstraktné myslenie i schopnosť racionálne uvažovať. Postihnutý zlyháva v posudzovaní a riešení jednoduchých úloh. S progresiou nastáva postihnutie všetkých zložiek pamäte a pridružuje sa porucha priestorovej a časovej orientácie. Pridružujú sa psychiatrické prejavy ako sú depresia, apatia a anxieta. Postihnutý v noci nespí, blúdi po miestnostiach presvedčený, že je čas obeda alebo vychádzky a dožaduje sa ich. V strednej fáze ochorenia prestáva chápať nové informácie, nezriedka sa stratí, a to i v známom prostredí. Má porušenú dlhodobú pamäť, aj keď ju úplne nestratil. Žiada pomoc pri bežných činnostiach (umývaní, obliekaní, jedení). Sám sa však pohybuje a väčšinou i stravuje. Neskôr pristúpia skraty v správaní i úplná časopriestorová dezorientácia. V pokročilom štádiu Alzheimerovej choroby postihnutý prestáva chodiť, vykonávať bežné činnosti, je inkontinentný. Krátkodobá a dlhodobá pamäť sa úplne stratia. Môže sa pridružiť mutizmus (strata komunikácie, najmä slovnej). Ochorenie končí letálne v priebehu 5-10 rokov od začiatku prvých príznakov, v závislosti na veku nástupu ochorenia a progresie (<http://www.alzinfo.org>, <http://alzheimers.org.uk>).

2.2 Epidemiológia a rizikové faktory

Alzheimerova choroba (AD) je najčastejšia príčina demencie, zodpovedná za dve tretiny prípadov. V západných krajinách je to štvrtá najčastejšia príčina smrti po srdcových ochoreniach, rakovine a mŕtvici. Postihuje asi 1,4% osôb v rozvinutých krajinách. Prevalencia AD je okolo 1% u jedincov vo veku 60-64, okolo 4% u jedincov vo veku 65-74 rokov a narastá exponenciálne s vekom, s tým, že vo veku 75-84 rokov je okolo 20% jedincov postihnutých týmto ochorením (Campion et al., 1999; Kukull a kol., 2002; Rocca, 1991). Prevalencia demencie

sa u jedincov vo veku 65-85 rokov zdvojnásobuje každých 5 rokov. V roku 2001, viac ako 24 miliónov ľudí trpelo demenciou, a predpokladá sa, že toto číslo sa bude každých 20 rokov zdvojnásobovať až na 81 miliónov v roku 2040 (*Ferri a kol., 2005*). Rizikové faktory sa delia do niekoľkých skupín: **a., nemodifikovateľné** (vek, pohlavie, etnická skupina, genetika, perinatálne podmienky, rast), **b., socio-ekonomické modifikovateľné** (faktory životosprávy fajčenie, alkohol, diéta, fyzická a psychická aktivita), **c., metabolické modifikovateľné** (krvný tlak, cholesterol, inzulín). Najpodstatnejším rizikovým faktorom je pokročilý vek. Predpokladá sa, že u každého z nás by sa ochorenie vyvinulo, keby žil 140 rokov. Množstvo pacientov s AD sa zvyšuje so zvyšujúcim sa vekom populácie a zvyšujúcou sa dĺžkou života. Vzťah medzi vekom a AD nie je úplne objasnený, ale predpokladá sa, že so zvyšujúcim sa vekom sa môžu vyskytnúť chyby v syntéze proteínov za vzniku abnormálnych proteínov a ich následnej akumulácie (*van Leeuwen a kol., 2000*).

Pozitívna rodinná anamnéza zvyšuje riziko AD. Celoživotné empirické riziko predstavuje 10-12%. U jedincov, ktorí majú príbuzného prvého stupňa (matka, otec, súrodenec), u ktorého sa ochorenie prejavilo po 65. roku majú riziko okolo 20-25%, teda asi 2,5 krát vyššie. V prípade dvoch postihnutých príbuzných prvého stupňa sa riziko zvyšuje až päťnásobne (*Cupples a kol., 2004; Farrer a kol., 1989; Silvermann a kol., 1994*). Farrer a kol. (1989) v štúdiu na 70 rodinách s jedným alebo viacerými príbuznými s AD stanovil riziko na 53% v prípade AD so skorým nástupom a na 86% v prípade AD s neskorým nástupom. Lautenschlager a kol. (1996) zistili $39.0\% \pm 2.1\%$ riziko vo veku 96 rokov.

Rizikovou skupinou pre vznik AD sú jedinci s **Downovým syndrómom**, u ktorých sa v 4. dekáde života vyvinú neuropatologické príznaky. Predpokladanou príčinou je celoživotná nadexpresia *APP* génu na 21. chromozóme, ktorý kóduje amyloidový prekursorový proteín. Hromadenie začína už v prvej dekáde života (*Brugge a kol., 1994; Margallo-Lana a kol., 2004*).

Niektoré štúdie potvrdili, že ženy majú vyššie riziko **AD**, čo sa môže vysvetľovať vplyvom ženských hormónov na vývoj AD, no na druhej strane sa v mnohých štúdiách nespozorovali rozdiely medzi pohlavím (*Rocca a kol., 1991; Kukull a kol., 2002*).

Medzi rizikové faktory patrí nízka úroveň vzdelania i keď v niektorých štúdiách rizikovú skupinu predstavovali naopak ľudia s vysokoškolským vzdelaním. Taktiež sa zistilo, že redukovaná mentálna a fyzická aktivita počas života a poranenie hlavy patria medzi rizikové faktory (*Fleminger a kol., 2003*). Rizikové sú aj ďalšie faktory ako sú hypercholesterolémia, arteriálna hypertenzia, ateroskleróza, obezita, cukrovka a srdcovo – cievne ochorenia (*De Ronci a kol., 1998; Forster a kol., 1995*). Predpokladá sa, že vitamíny participujúce v metabolizme homocysteínu (B12 a kyselina listová), antioxidanty (Vitamín C a E) a nenasaturované mastné kyseliny majú protektívny charakter (*Pope a kol., 2003*).

2.2.1 Genetické rizikové faktory

Doposiaľ boli identifikované tri kauzálne gény (*APP, psen 1, psen 2*), ktorých mutácie vedú k ADFAD so skorým nástupom. Sú však popísané aj familiárne formy, ale mutácia v daných génoch sa neidentifikovala, z čoho vyplýva, že mutácie aj v iných génoch môžu viesť k FAD so skorým začiatkom.

V prípade AD s neskorým nástupom ochorenia sa odhaduje podiel genetických rizikových faktorov okolo 40% – 50%. Alela e4 apolipoproteínu E sa považuje za hlavný rizikový faktor v prípade sporadickej aj familiárnej formy s neskorým nástupom. Prítomnosť e4 alely zvyšuje riziko nástupu ochorenia u heterozygotov trojnásobne a u homozygotov pätnásťnásobne (Corder a kol., 1993; Farrer a kol., 1997; Khachaturian a kol., 2004).

V niektorých prácach sa popisuje asociácia AD s polymorfizmami v génoch IL-1A a IL-1B. Prítomnosť IL-1A *2 (T) alely u homozygotov znižuje vek nástupu o 9 rokov. Alelická varianta IL-1B 2 zvyšuje riziko. Zložení heterozygoti pre dané alely majú až desaťnásobne zvýšené riziko pre AD (Ravaglia a kol., 2006).

Keďže menej ako 50% pacientov s AD s neskorým nástupom sú nositeľmi apoE e4 alely, tak musia existovať aj iné gény, ktorých polymorfné varianty zvyšujú riziko na AD. Väčšina genetických faktorov zahrnutá v AD s neskorým nástupom sú predispozičné činitele, ktoré nie sú schopné samostatne indukovať ochorenie, ale výrazne zvyšujú riziko pre vznik ochorenia v populácii. Svoj patogénny účinok pravdepodobne navodzujú interakciou s faktormi prostredia alebo inými fyziologickými podmienkami, taktiež sa predpokladá ich vzájomná interakcia a synergický efekt. Na základe ich funkcie, bolo identifikované množstvo potenciálnych génov. Mnohé z daných génov kódujú proteolytické enzýmy, plazmové proteíny, rastové faktory alebo membránové receptory. Niektoré majú viacero polymorfných variant. Proteínové produkty daných génov sú zahrnuté v kaskáde procesov zodpovedných za patogenézu AD. Bolo popísaných vyše 100 kandidátnych génov (Ertekin-Taner, 2010; Kamboh, 2004).

Potenciálne gény a lokusy zahrnuté v patogenéze AD

- *IL1A*, *IL1Ba* (2q14)
- *TfC2* (3q21), *BChE* (3q26.1–q26.2)
- *NOS3* (7q35)
- *VLDL-R* (9pter–p23), *UBQLN1* (9q22)
- *IDE* (10q23–q25), *GSTO1* a *GSTO2* (10)
- *catD* (11p15.5), *SORL1* (11q23), *GAB2* (11q14)
- *α2M* (12p), *LRP* (12), *LBP-1c/CP2/LSF* (12), *A2M* (12)
- *ACT* (14q32.1)
- *ACE* (17q23), *5-HTT* (17q11.1–q12), *BH* (17q11.1–q11.2)
- *APOE* (19q32.2), *TGF-β1* (19q13.1–q13.3), *CST3* (20p11.2)

2.3 Amyloidový prekurzorový proteín

Až 75 rokov od prvého popisu senilných plakov v mozgu AD pacienta sa identifikovalo, že hlavnou zložkou extracelulárnych amyloidových plakov je 4 kDa peptid s β štruktúrou a nazvali ho amyloidový β peptid (Aβ) (Allsop a kol., 1983; Glenner a Wong, 1984). Ďalšími štúdiami sa zistilo, že peptid je fragment vytvorený proteolytickým štiepením väčšieho prekurzorového proteínu a z toho je aj odvodený názov **amyloidový prekurzorový proteín** (APP) (Kang a kol., 1987). Dané skutočnosti umožnili sformulovať amyloidovú hypotézu opierajúcu sa o predpoklad, že nadprodukcia a agregácia Aβ sú hlavnou príčinou progresie AD (Hardy

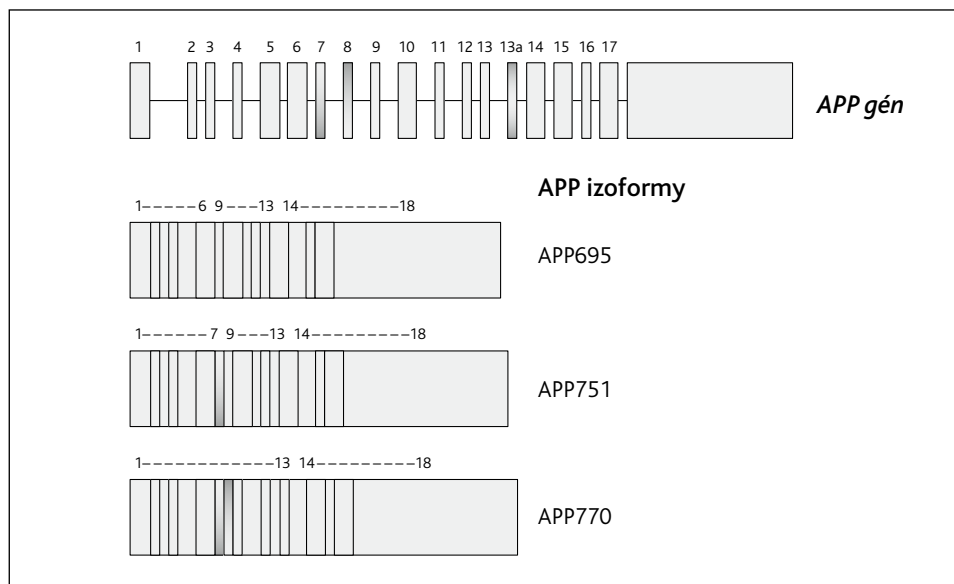
a *Allsop, 1991*). Práve z tohto dôvodu je neurobiologický výskum zameraný na objasnenie funkcie APP, účinku a vzniku A β a jeho úlohu v neurodegenerácii.

Je množstvo faktov dokazujúcich, že tvorba A β je najvýznamnejší proces v patogeneze AD. Jednak v prípade FAD boli identifikované mutácie práve v tých génoch, ktoré sú priamo zahrnuté v procesingu APP a taktiež u pacientov s trizómiou 21. chromozómu sa prejavujú neuropatologické črty AD.

2.3.1 Štruktúra amyloidového prekursorového proteínu

Gén pre amyloidový prekursorový proteín bol klonovaný na základe aminokyselinovej sekvencie A β a bola určená jeho lokalizácia na chromozóme 21 (21q21.3-q22.05). *APP* gén je zložený z 18 exónov a obsahuje 170 kb genómovej DNA (Yoshikai a kol, 1990). Exón 16 a 17 kódujú A β peptid. APP je ubiquitne exprimovaný transmembránový glykoproteín (Kang a kol, 1987). APP podlieha alternatívnemu splicingu za tvorby 10 rôznych izoformiem o dĺžke 563 až 770 aminokyselín (Coulson a kol., 2000). Je exprimovaný v rôznych typoch buniek a tkanív ako aj v endoteliálnych, gliálnych bunkách, astrocytoch a neurónoch mozgu. Dominantné izoformy sú APP695, APP751, APP770 (obrázok 2). Ich odlišnosť spočíva v tom, že APP751 a APP770 obsahujú exón 7, ktorý kóduje tzv. Kunitzovu proteazovú inhibičnú doménu (KPI), zatiaľ čo APP 695 neobsahuje KPI doménu. Všetky formy sú exprimované v mozgu, no najčastejšia je varianta APP695. V mozgu sú izoformy exprimované v pomere (APP770: APP751: APP695 – 1: 10: 20) (Tanaka a kol., 1989).

Obrázok 2. Schematické znázornenie *APP* génu s 18 exónmi a najčastejšie proteínové izoformy APP (Ling a kol., 2003)



Boli identifikované dva APP homológy APLP-1 a APLP-2 (amyloid precursor – like proteins). Majú však malú homológiu k APP regiónu korešpondujúceho k A β doméne a preto nedávajú vznik A β peptidu (Coulson a kol., 2000).

APP je lokalizovaný v mnohých membránových štruktúrach bunky ako sú endoplazmatické retikulum a Golgiho aparát ako aj na povrchu bunkovej membrány (Caporaso a kol., 1994). Je lokalizovaný aj v membránových mikrodoménach, bohatých na cholesterol a GM1 gangliozidoch.

APP je zložený z dlhej ektodomény, transmembránovej domény a cytoplazmatickej domény (obrázok 3). Ektodoména je orientovaná buď extracelulárne alebo do lumenu intracelulárnych vezikúl. Obsahuje N-terminálnu oblasť bohatú na cysteín, ktorá tvorí globulárnu štruktúru, nasleduje acidická doména a za ňou pokračuje glykozylovaný región (Rossjohn a kol., 1999). APP podlieha mnohým posttranslačným zmenám ako sú glykozylácia, sulfonácia, fosforylácia a proteolytické štiepenie (Walter a kol., 1997). Glykozylovaná doména podlieha N- aj O- glykozylácii (Weidemann a kol., 1989). Daná doména je zložená z dvoch častí. Proximálna časť nazývaná CAPPD (Dulovo a kol., 2004), E2 (Wang a Ha, 2004), D6a (Anderson a kol., 2006) je štruktúrovaná, zložená z hélixov, ktoré navzájom interagujú za tvorby antiparalelného diméru. Doména je vysoko konzervovaná u APP ortológov od Drozofily až po človeka, čím sa umožňuje predpoklad, že má dôležitú funkciu. Predpokladá sa jej význam pri procesingu APP. Distálna časť nie je štruktúrovaná. Vysoko glykozylovaný APP má funkciu v bunkovej adhézii a v interakcii s extracelulárnou matrix. V ektodoméne sa nachádza niekoľko funkčných domén, ktoré viažu meď, zinok, heparín, kolagén a rastový faktor (Behr a kol., 1996; Multhaup a kol., 1995; Multhaup a kol., 1996). Rastový faktor sa viaže na neurotrofnú doménu s motívom RERMS (Rossjohn a kol., 1999). Predpokladá sa jeho význam v trofických procesoch neurónov a raste neuritov. Meď viažuca doména je homologická k šaperónom medi. Predpokladá sa úloha APP v homeostáze medi možným prenosom medi k metaloenzýmom ako superoxidismutáza alebo Cu ATPáza. APP umožní redukciu Cu²⁺ na Cu⁺ a má neuroprotektívny efekt ako antioxidant (Hesse a kol., 1994; Multhaup a kol., 1996). U niektorých izoforiem sa nachádza KPI doména alebo OX2 (APP770) doména. KPI doména inhibuje serín proteázy ako sú trypsin a chymotrypsín a krvné koagulačné faktory IX a IXa. Expresia KPI izoforiem v krvných bunkách a doštičkách slúži ako funkcia v hojení rán (Ponte a kol., 1988). Funkcia OX2 nie je známa.

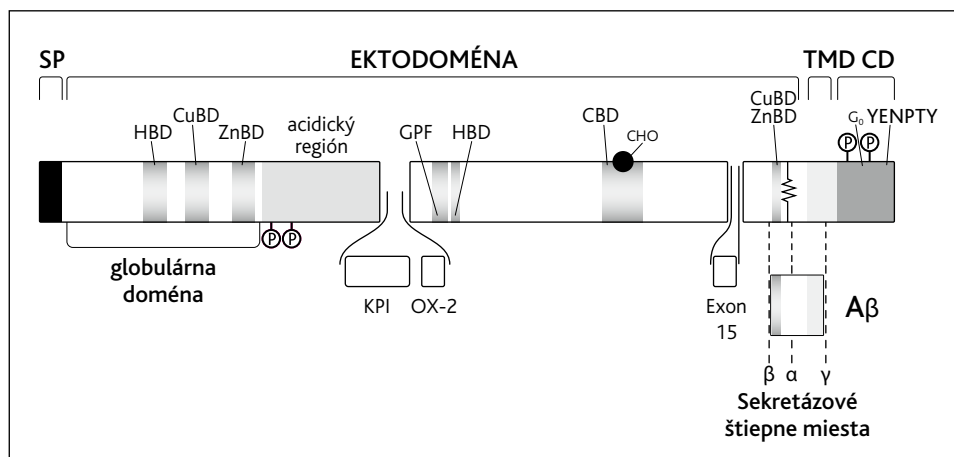
APP cytoplazmatická doména je krátka, zložená z 51 aminokyselín. Má množstvo motívov, ktoré sú dôležité pri regulácii transportu APP a v signálnej transdukcii. Nachádza sa tu klatrín viažuca doména a doména pre Go heterotrimerický proteín (Nordstedt a kol., 1993; Nishimoto a kol., 1993). YENPTY motív viaže FE65 a X11 proteíny. Sú to cytosólické adaptorové molekuly, ktoré interagujú s inými proteínmi a transkripčnými faktormi za tvorby komplexov, ktoré sprostredkujú prenos signálu (Borg a kol., 1996; Sabo a kol., 1999). Väzba proteínov je regulovaná fosforyláciou. V CT doméne je aj VEVD motív, ktorý obsahuje štiepne miesto pre kaspázy 6 a 8. Štiepením kaspázami sa naruší signalizácia APP a spúšťa sa apoptóza (Pellegrini a kol., 1999).

A β doména (597 – 639 amk u APP695) sa nachádza z časti v ektodoméne a z časti v hydrofóbnej transmembránovej doméne. Obsahuje meď, zinok a heparín viažucu doménu. Motív

RHDS je zodpovedný za formovanie komplexov s dvojmocnými kationmi, za vzniku cytotoxických agregátov (*Ghiso a kol., 1992*). V A β doméne sa nachádzajú aj štiepne miesta pre sekretázy.

Obrázok 3. Amyloidový precursorový proteín a jeho domény

SP-siglnálny peptid, TMD-transmembránová doména, CD-cytoplazmatická doména, HBD-heparín viažuca doména, CuBD-meď viažuca doména, ZnBD-zinok viažuca doména, CBD-kolagén viažuca doména, GPF-miesto väzby rastového faktoru, KPI-Kunitz proteázová doména, CHO-miesto glykozylácie, Go-doména pre Go heterotrimerický proteín, YENPTY motív viaže FE65 a X11 proteíny (*Evin a Wiedemann, 2002*).



2.3.2 Funkcia APP

Hlavné funkcie APP, ako už boli niektoré popísané, vyplývajú z jeho štruktúry a funkčných domén, ktoré obsahuje. Samotný APP ako aj jeho fragmenty participujú v bunkovej adhézii, neurotrofnej, neuroproliferatívnej a neuroprotektívnej aktivite, axonálnom transporte, intracelulárnej komunikácii, signálnej transdukcii od membrány k jadru bunky, génovej transkripcii, v metabolizme cholesterolu a homeostáze medi (*Breen a kol., 1991; De Strooper a Annaert, 2000; Selkoe a kol., 1988; Turner a kol., 2003*). Predpokladá sa, že APP má dôležité funkcie, preto bolo prekvapujúce, že APP knock-out myši mali relatívne normálny fenotyp až na redukcii hmotnosti, motorickej aktivity, synaptickej transmisie ako aj hypersenzitivitu k epileptickým záchvatom. Je však pravdepodobné, že funkciu APP nahradili jeho homológy. Avšak myši bez APP a APLP génov, prenatálne zomierali, čím sa predpokladá, že ich funkcie sú významné pre normálny bunkový metabolizmus a vývin (*von Koch a kol., 1997*). Úloha APP v adhézii súvisí s väzbou špecifických substrátov ako kolagén, heparín, laminín a inými adhéznymi molekulami ako sú β -1-integrín a telencefalín. Signálna transdukcia a regulácia génovej expresie súvisia s väzbou rôznych proteínov na CT doménu (*Storey a kol., 1996; Storey a kol., 1999*).

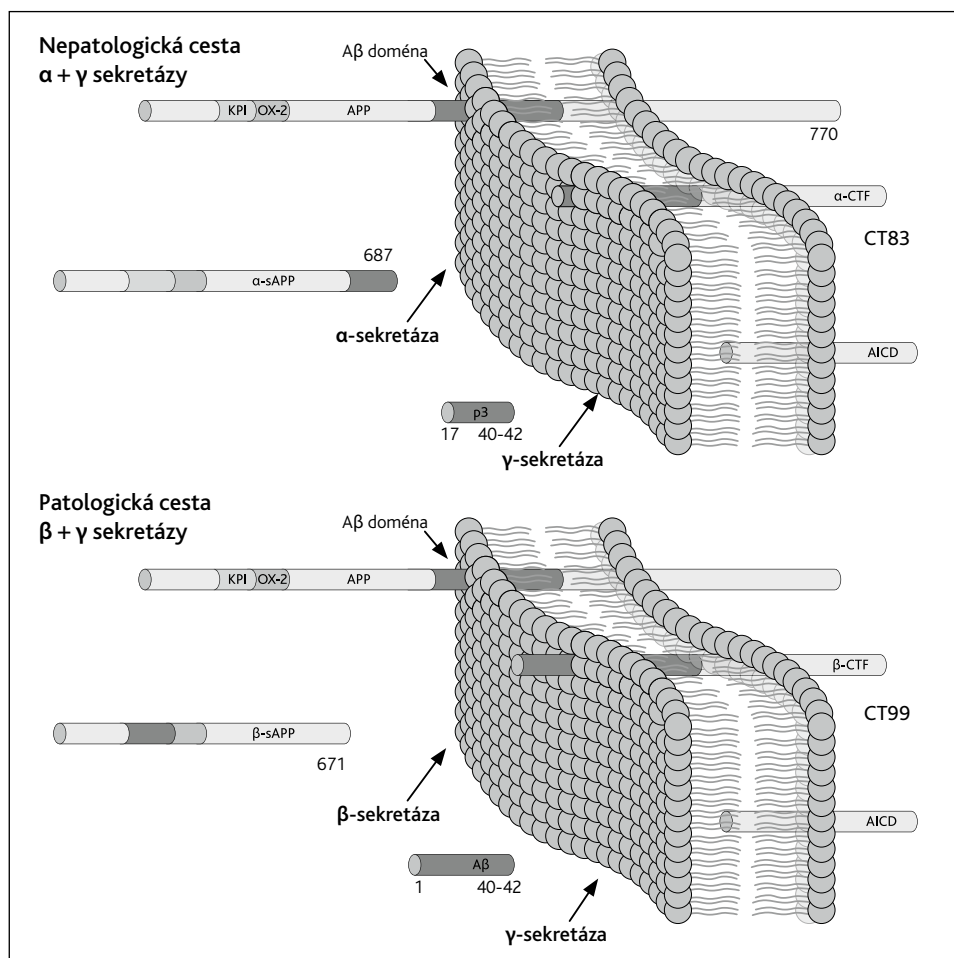
APP na povrchu bunkovej membrány vystupuje ako receptor spojený s G proteínmi a sprostredkuje transdukciiu extracelulárneho signálu do vnútra bunky cez C-terminálnu doménu. APP ako receptor viaže G_o proteín a indukuje sa tak tvorba G proteínového komplexu, ktorý disociuje na dve podjednotky G_α a dimér $G_{\beta\gamma}$, ktoré následne aktivujú rôzne downstream signálne dráhy, ako je aj dráha pre apoptózu (Brouillet a kol., 1999; Nishimoto a kol., 1993; Okamoto a kol., 1995). Taktiež sa predpokladá, že APP sprostredkovaná aktivácia G proteínov je zahrnutá v synaptickej transmisii a plasticite a v aktivite neurónov. Dôkazom toho sú aj myši s nulovými APP mutáciami, ktoré mali určité abnormality v štruktúre a funkcii neurónov ako sú glióza, znížená hladina synaptofyzínu v hippocampe a redukovanú dĺžku dendritov neurónov v hippocampe (Zheng a kol., 1995).

Väzbou Fe65 adaptorového proteínu a proteínu MENA na APP, ktoré následne viažu profilín sa umožní formácia aktínového filamentu. To priamo spája APP s bunkovým cytoskeletom (Sabo a kol., 2001). V niektorých prácach sa popisuje úloha APP v učení a pamäti (Dawson a kol., 1999).

2.3.3 Protelytické štiepenie APP

APP je štiepený tromi rôznymi sekretázami α -, β -, a γ - sekretázou. Dané sekretázy sú zahrnuté v dvoch rôznych dráhach štiepenia, konkrétne amyloidogénnej a neamyloidogénnej. Prvý krok neamyloidogénneho (nepatogénne) štiepenia začína štiepením α -sekretázy vo vnútri A β domény medzi lys16-leu17 (687-688 amk; APP770) za vzniku dlhého solubilného fragmentu α -sAPP o dĺžke 687 amk a COOH terminálneho fragmentu o dĺžke 83 amk (CT83), ktorý zostáva ukotvený v membráne. CT83 fragment je štiepený γ - sekretázovým komplexom za vzniku malého 3 kDa p3 fragmentu a AICD (amyloidová intracelulárna doména) fragmentu o dĺžke 57-59 amk (Evin a kol., 1994; Seubert a kol., 1992). Amyloidogénna cesta štiepenia začína β -sekretázou, ktorá štiepi pred A β doménou (671-672 amk; APP770) za vzniku solubilného β -sAPP fragmentu o dĺžke 671 amk a v membráne viazaného CT99 fragmentu. CT99 je štiepený γ - sekretázovým komplexom za vzniku 4 kDa A β fragmentu a AICD (amyloidová intracelulárna doména) fragmentu o dĺžke 57-59 amk (Huse a Doms, 2000). γ -sekretázové štiepenie (711-712/713-714) CT99 môže dať vznik A β 40 alebo A β 42. Hydrofóbny A β 42 je náchylnejší k tvorbe fibríl ako A β 40. A β 42 je síce menej častá forma, ale je hlavnou zložkou amyloidových plakov.

Obrázok 4. Nepatologická a patologická dráha proteolytického štiepenia APP



α a β sekretázová aktivita sú v rovnováhe a súťažia o APP. V prípade zvýšenia jednej aktivity, druhá poklesne. Takže zvýšenie β aktivity jednak zvýši tvorbu A β , súčasne však poklesne tvorba α APP.

2.3.3.1 α -sekretáza

Štiepenie APP α -sekretázou je hlavná a ubikvitná cesta APP metabolizmu vo väčšine buniek (Nitsch a kol., 1992). Boli zistené konštitutívna a indukibilná α -sekretázová aktivita. Zdroj konštitutívnej aktivity zatiaľ nebol presne identifikovaný. Inducibilná α -sekretázová aktivita je pod kontrolou proteínkinázy C (PKC) (Nitsch a kol., 1997). α -sekretázová aktivita sa môže zvýšiť vplyvom forbol esterov, estrogénov, testosterónu, neurotransmiterov a rastových

faktorov. Je popísaných niekoľko potenciálnych proteínov s α -sekretázovou aktivitou, ktoré sa podieľajú na štiepení APP. Sú to transmembránové proteíny, dizintegríny a metaloproteázy (ADAM). Konkrétne tumor necrosis faktor α (TNF α) konvertujúci enzým (TACE, ADAM17), ADAM 10 a ADAM 9. Enzýmy majú podobnú organizáciu domén s potenciálnymi funkciami vo fúzii buniek, bunkovej adhézii, intracelulárnej signalizácii a proteolýze. Konštitutívna α -sekretázová aktivita sa našla hlavne na bunkovom povrchu, zatiaľ čo indukibilná v Golgiho aparáte (Blobel, 1997; Hooper a Turner, 2002; Parvathy a kol., 1999).

Hlavná funkcia TACE, ADAM 17 je štiepenie TNF α prekursoru za uvoľnenia extracelulárnej domény a TNF α z bunky. TACE štiepi aj iné proteíny ako p75 TNF receptor, TGF α a taktiež Notch receptor. Notch receptor je zapojený v signálnej dráhe počas embryonálneho vývinu. U myší bez TACE génu sa znížila tvorba produktu α -sekretázového štiepenia α -sAPP avšak bazálna α -sekretázová aktivita zostala zachovaná a nedala sa zvýšiť vplyvom forbolesterov, čo nasvedčuje, že TACE je zapojený do regulovanej PKC α -sekretázovej aktivity (Black a kol., 1997; Buxbaum a kol., 1998b; Moss a kol., 1997). ADAM 10 metaloproteáza taktiež vykazuje α -sekretázovú aktivitu. Nadexpresia ADAM 10 zvýšila jednak bazálnu tak indukovanú aktivitu. Bodové mutácie znížili jednak bazálnu tak indukovanú aktivitu. Predpokladá sa, že štiepi APP v neurónoch a aj v periférnych bunkách (Colciaghi a kol., 2002; Fahrenholz a kol., 2000).

Kandidátne proteíny sú syntetizované ako preproteíny. Prodoména inhibuje ich proteázovú aktivitu a preto musí byť odštiepená, aby sa stali aktívnymi, čo prebieha v Golgiho aparáte. Štiepené sú proproteínovými konvertázami PPC, ktoré štiepia medzi pro a metaloproteázovou doménou. Nadexpresia PPC viedla k výraznému zvýšeniu α -sekretázovej aktivity (Schlondorff a kol., 2000).

2.3.3.2 β -sekretáza

Sú identifikované dva enzýmy s β -sekretázovou aktivitou, tzv. β -miesto štiepiace enzýmy (β -site cleavage enzyme) BACE1 a BACE2. BACE1 (Asp2, memapsín2) je transmembránová aspartyl proteáza, zložená z prodomény, katalytickej domény, transmembránovej a cytoplazmatickej domény (Howlett a kol., 2000; Vassar a kol., 1999; Yan kol., 1999). BACE1 mRNA je exprimovaná vo vysokých hladinách v pankrease, mierne v mozgu a slabo v periférnych tkanivách, ale samotná β -sekreázová aktivita je najvyššia v mozgu. Proteáza ako proenzým je tvorená v ER a jadrovej membráne (Huse a Doms, 2000). Prodoména je štiepená furínom alebo inými proproteínovými konvertázami, tesne pred vstupom do Golgiho aparátu. Prodoména nie je dôležitá pre aktivitu, ale má význam pre správne poskladanie aktívnej domény. Maturovaný enzým začína od Glu 46. Je N-glykozylovaný na asparagínových zvyškoch: Asn 153, 172, 223, 354 a má tri intramolekulové disulfidové väzby v ektodoméne, ktoré regulujú dopravenie BACE1 do bunkových štruktúr. Dva aspartáty v ektodoméne Asp 93 a 289 sú esenciálne pre aktivitu. BACE1 je fosforylovaný v cytoplazmatickej doméne na seríne 498 (Capell a kol., 2000; Haniu a kol., 2000). Nadexpresia BACE1 výrazne zvýšila množstvo β -sekretázových štiepných produktov (Vassar a kol., 1999). Naopak u myší bez BACE1 sa úplne narušila tvorba A β , čo naznačuje, že BACE1 je hlavná β -sekretáza (Cai a kol., 2001). BACE1 knockout myši boli zdravé s normálnym fenotypom, čo naznačuje, že inhibícia β sekretázovej aktivity nie je pre organizmus toxická a mohla by to byť vhodná cesta terapie AD. Gén pre

BACE1 je lokalizovaný na chromozóme 11 a neboli popísané zatiaľ žiadne mutácie v danom géne vedúce k AD. BACE 1 štiepi buď v β štiepnom mieste v Asp1 za následnej tvorby A β 1-40/42 alebo v β mieste v polohe Glu11 za tvorby A β 11-40/42. A β 11-40/42 sa našli vo vyššom množstve v AD mozgu (*Gouras a kol., 1998*). Štiepenie v β alebo β mieste závisí od intracelulárnej lokalizácie. V ER sa uprednostňuje β miesto a v trans Golgi β miesto. BACE1 efektívne štiepi APP avšak v prípade mutácie v APP sa aktivita zvyšuje až desaťnásobne. BACE1 je lokalizované v trans Golgi a endozómoch, ale taktiež aj v ER a na povrchu bunky (*Capell a kol., 2000; Huse a kol., 2000*).

Transmembránový aspartyl proteáza BACE2 má 55% homológiu s BACE1. BACE2 mRNA je exprimovaná vo veľkom množstve v hrubom čreve, žalúdku, obličkách, pankrease, prostate, placentе a trachey a len v nízkych hladinách v mozgu (*Yan a kol., 2001*). Tým sa predpokladá, že asi nemá dôležitú úlohu pri patogenéze AD. BACE2 štiepi buď v β štiepnom mieste alebo v phe19 a phe20 v A β doméne, čo vedie k tvorbe α APP a p3 fragmentu a redukuje tvorbu A β peptidu (*Bennett a kol., 2000; Farzan 2000*). Zistilo sa však, že Flámska mutácia v APP zvyšuje produkciu A β peptidu vplyvom BACE2. V niektorých prácach sa popisuje, že môže byť zahrnutá v neuropatológii podobnej AD u pacientov s Downovým syndrómom, keďže je lokalizovaná na chromozóme 21 (*Motonaga a kol., 2002*).

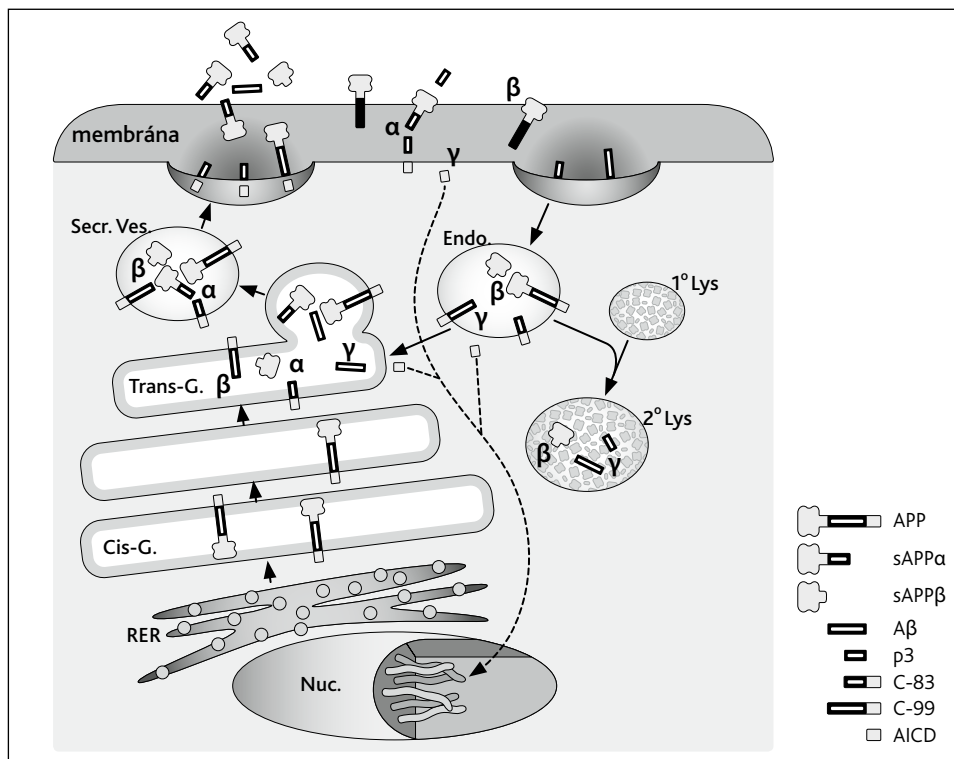
2.3.3.3 γ -sekretáza

Je to intramembránový proteázový komplex zložený z presenilínov, proteínu nikastrín, pen2 a aph1. Bližšie je γ -sekretázová aktivita popísaná v kapitole 4.4.4.1.

2.3.4 Lokalizácia sekretáz a APP procesingu v neurónoch

α -sekretázová aktivita je lokalizovaná v plazmatickej membráne, v sekrečných vezikulách, v trans-Golgi a v endoplazmatickom retikule. β -sekretázová aktivita je lokalizovaná v endoplazmatickom retikule, v sekrečných vezikulách, v trans-Golgi, endozómoch a lyzozómoch a v plazmatickej membráne. γ -sekretázová aktivita je lokalizovaná v trans-Golgi, endozómoch a lyzozómoch a v plazmatickej membráne, ale závisí od typu bunky (*Cappell a kol., 2000; Huse a kol., 2000; Nunan a Small, 2000; Parvathy a kol., 1999*).

Obrázok 5. Po translácii je APP z drsného endoplazmatického retikula (RER) transportované cez Golgiho aparát do plazmatickej membrány. APP a C-terminálne fragmenty sú reinternalizované cez endozomálny systém (Endo.) priamo do trans-Golgi (Trans-G.) alebo do sekundárnych lyzozómov (2.Lys.), kde sú degradované (plné šípky). C-terminálne fragmenty sú štiepené za uvoľnenia AICD fragmentov, ktoré sú dôležité pri regulácii génov transkripcie v jadre (Nuc.) (prerušované šípky) (Turner a kol., 2003)



2.3.5 β -amyloidový peptid a jeho degradácia

A β je konštitutívne produkovaný počas normálneho metabolizmu bunky, je prítomný v malých množstvách ako solubilný monomér cirkulujúci v cerebrospinálnom moku a krvi (Haas a kol., 1992). A β peptidy varírujú v dĺžke od 39 do 43 aminokyselín (Snyder a kol., 1994). A β 42 je fibrillogénny a neurotoxický a predpokladá sa jeho centrálna úloha v patogenéze AD, ktorá je popísaná v kapitole 2.7.1 (Walsh a kol., 2002a, b). A β existuje ako monomér, dimér alebo oligomér a ďalšou agregáciou sa tvoria protofibrily a následne zrelé fibrily (Walsh a kol., 2000). V in vitro experimentoch sa zistilo, že agregácia do fibríl závisí od času a koncentrácie (Harper a Lansbury, 1997). Časová závislosť agregácie sa vyznačuje lag fázou, počas ktorej sa nepozoruje agregácia a po nej nastáva rapidná agregácia. Agregácia vyžaduje kryštalizačný

proces (*Jarrett a kol., 1993*). Nastáva zmena v štruktúre z α hélixov na β skladaný list. A β agregované formy sú veľmi stabilné a odolné voči denaturačným činidlám ako SDS alebo urea (*Walsh a kol., 2000*).

Kedže je A β konštitutívne produkovaný, musí byť zabezpečený mechanizmus jeho degradácie, aby nenastala jeho akumulácia. Jeho ustálený stav je determinovaný rovnováhou medzi jeho biosyntézou a degradáciou enzýmami (*Evin a Wiedermann, 2002*). Pričom znížený katabolizmus by mohol zohrávať významnú úlohu v AD s neskorým nástupom. Doposiaľ je popísaných niekoľko kandidátnych proteáz v mozgu ako sú inzulín degradujúci enzým, neprilyzín, endotelín konvertujúci enzým, plazmín, trypsínová endopeptidáza, aminopeptidáza a katepsín.

2.3.5.1 Inzulín degradujúci enzým (IDE)

Je 110 kDa metaloproteáza, vyskytujúca sa ako solubilný proteín v cytoplazme alebo aj ako s membránou asociovaná forma v neurónoch (*Selkoe, 2001*). Degraduje množstvo peptidov ako inzulín, solubilnú a membránovú formu A β , glukagón a TGF- α . Endogénny IDE degraduje syntetický A β v homogenátoch a membránových frakciách mozgu (*Qiu a kol., 1998*). Oligoméry A β v kultivačnom médiu sú rezistentné k IDE, zatiaľ čo monoméry boli enzýmom degradované. Z toho vyplýva, že IDE sprostredkuje degradáciu rozpustných monomérov A β a nie je schopný degradovať nerozpustné oligoméne formy (*Edbauer a kol., 2002*; *Vekrellis a kol., 2000*; *Perez a kol., 2000*). Produkty degradácie A β nie sú neurotoxické a nie sú schopné tvoriť amyloidové plaky. Rekombinantný IDE redukuje A β toxitu v kortikálnych neurónových kultúrach (*Kurochkin, 1998, 2001*).

IDE gén je lokalizovaný na chromozóme 10q23-q25 a je jeden z kandidátnych génov pre AD s neskorým nástupom (*Affholter a kol., 1999*). V rôznych rodokmeňoch s AD s neskorým začiatkom sa popisuje väzba k DNA markerom v blízkosti 10q lokusu. Abraham a kol. (2001) popisujú 8 jednonukleotidových polymorfizmov v IDE avšak asociácia s AD fenotypom nebola potvrdená (*Bertram a kol., 2000*).

2.3.5.2 Neprilyzín (NEP)

Je 90-110 kDa membránový glykoproteín, ktorý patrí do rodiny neutrálnych zinkových metaloproteáz. NEP je endopeptidáza, ktorá hydrolyzuje množstvo cirkulujúcich peptidov ako sú enkefalin, atriálny natriuretický peptid, endotelín, substancia P, neurotenzín, oxytocín, bradykinín a A β . NEP obsahuje 10 konzervovaných cysteínových zvyškov v extracelulárnej doméne, ktoré sú dôležité pre funkciu (*Cohen a Miller, 1999*; *Turner a kol., 2001*).

Gén pre NEP je lokalizovaný na chromozóme 3q21-q27 a je zložený z 24 exonov (*Tran-Patterson a kol., 1989*). NEP je exprimovaný v nižších hladinách v mozgu a vo vyšších v obličkách. Popisuje sa, že NEP je dôležitý v degradácii nerozpustných A β 42 lokalizovaných v membráne (*Carson a Turner, 2002*). Inhibícia neprilyzínu vedie k zníženiu degradácie membránovej frakcie A β . Ustálená hladina endogénneho A β je zvýšená v mozgu mladých neprilyzín deficitných myšiach, ale zvýšenie nebolo také rapidné, aby nastala tvorba amyloidových plakov, čo nasvedčuje pre participáciu aj iných proteáz. Hladina A β v neprilyzín deficitných myšiach je najvyššia v hippocampe a najnižšia v cerebelle, čo koreluje s výskytom plakov v AD mozgu.

Hladina NEP mRNA je najnižšia práve v hippocampe (*Iwata a kol., 2000; Iwata a kol., 2001*).

Predpokladá sa, že znížená aktivita neprilyzínu spôsobená vekom by mohla viesť k akumulácii A β a k vývinu AD. Zisťuje sa väzba medzi AD a markermi na chromozóme 3. Avšak žiadne rozdiely v alelových frekvenciách štyroch dinukleotidových opakovaní v NEP géne sa nespozorovali medzi pacientmi AD a kontrolnou skupinou (*Oda a kol., 2002*).

2.3.6 Mutácie v APP géne

Doposiaľ je popísaných približne 32 rôznych mutácií v 16. a 17. exóne APP génu v 89 rodinách, ktoré zahŕňajú missense mutácie a aj duplikácie (www.molgen.ua.ac.be/ADMutations). Prvá mutácia, ktorá vedie k aminokyselinovej substitúcii glutamátu (Glu) na glutamín (Gln) sa identifikovala v A β doméne v kodóne 693 a bola nazvaná **Holandská mutácia** (*Levy a kol., 1990*). Mutácia je zodpovedná za Hereditárny cerebrálny výron s amyloidózou (Hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis-Dutch type HCHWA-D). Amyloidové plaky s A β peptidom sa našli v stenách mozgových ciev a difúzne plaky sa našli v mozgovom parenchýme (*Van Broeckhoven a kol., 1990*). Vek nástupu sa pozoroval okolo 50 a viac rokov. Predpokladá sa, že mutácia v kodóne 693 má vplyv na sekundárnu štruktúru A β peptidu v bunkovej membráne a vedie k akumulácii A β (*Fabian a kol., 1993*).

V kodóne 693 je popísaná aj ďalšia substitúcia, ktorá vedie k zámene glutamátu na glycín (Gly) a volá sa **Arktická mutácia**. Predpokladaný vek nástupu je okolo 58 rokov (*Kamino a kol., 1992*). V danej pozícii je popísaná aj zámena Glu na Lys (**Talianska mutácia**) (*Tagliavini a kol., 1999*).

Mutácia v exóne 17 APP génu sa našla v Britskej rodine s FAD. Ide o tranzíciu cytozínu za tymín čo vedie k zámene aminokyseliny valín (Val) za izoleucín (Ile) v kodóne 717 (**Londýnska mutácia**) (*Goate a kol., 1991*). Pri skríningu vyše 100 nepríbuzných sporadických prípadov AD a kontrolného súboru sa daná mutácia nenašla (*Goate a kol., 1991; Van Duijn a kol., 1991b*). Daná mutácia bola popísaná v mnohých rodinách s FAD. V kodóne 717 sa našli rôzne alelické varianty Val na Ile, Val na Leu, Val na Phe a Val na Gly (*Murrel a kol., 1991*).

Flámska mutácia vedie k zámene alanínu (Ala) na glycín (Gly) v pozícii 692 a bola popísaná v Holandskej rodine s FAD. Spôsobuje intermediárny fenotyp medzi kongofilnou angiopatiou a AD (*Hendriks a kol., 1992*).

Patologické mutácie sú popísané aj v kodóne 716. Zámena izoleucínu (Ile) za valín (Val) je **Floridská mutácia** a taktiež je tu popísaná aj zámena Ile za Thr. Obidve vedú k AD fenotypu s vekom nástupu okolo 55 rokov (*Eckman a kol., 1997; Terrini a kol., 2002*).

V dvoch Švédskych rodinách s FAD sa identifikovala **Švédska mutácia** pozostávajúca zo substitúcie dvoch báзовých párov, pričom nastane zámena lyzínu na asparágovú kyselinu v polohe 670 a zámena metionínu (Met) za leucín (Leu) v polohe 671. Zámena aminokyselín nastáva pred A β doménou (*Mullan kol., 1992*).

V kodóne 714 sa identifikovali dve rôzne zámesty treonín (Thr) za alanín (Ala) tzv. **Írnska mutácia** s vekom nástupu okolo 52 rokov a treonín na izoleucín (Ile) tzv. **Rakúska mutácia**, v prípade ktorej sa v mozgu našli plaky zložené výlučne z A β 42 s úplnou absenciou A β 40 (*Kumar-Singh a kol., 2000; Pasaler a kol., 2002*).

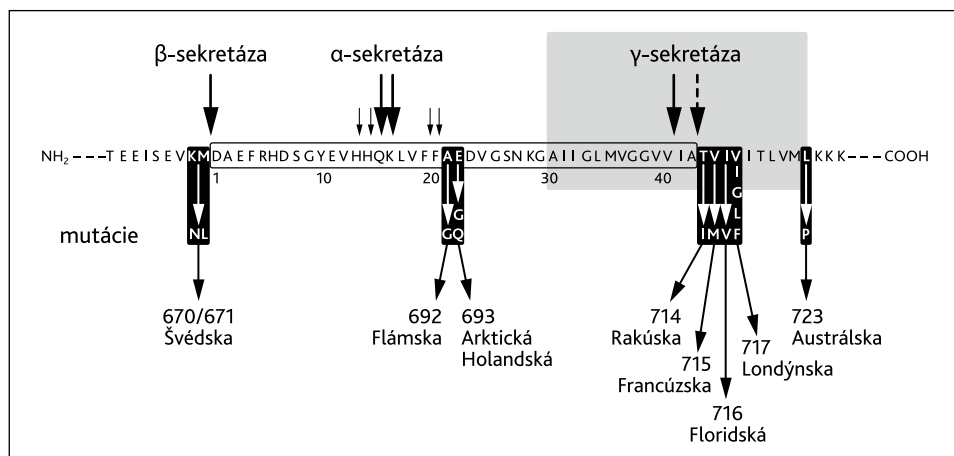
Zámena valínu za metionín v polohe 715 (**Francúzska mutácia**) sa identifikovala u pacientov s FAD s vekom nástupu okolo 52 rokov. V rovnakej polohe sa našla aj **Nemecká mutácia**, ktorá vedie k zámene valínu za alanín s vekom nástupu okolo 47 rokov (*Ancolio a kol., 1999; De Jonghe a kol., 2001*).

2.3.6.1 Patologický vplyv APP mutácií

Presný mechanizmus ako missense mutácie vplyvajú na tvorbu A β a patológiu AD nie je známy. Mutácie sú lokalizované v blízkosti sekretázových štiepných miest. Analýzou plazmového A β z postihnutých jedincov ako aj A β z bunkových línií nesúcich mutantný APP sa zistila výrazne zvýšená produkcia A β , zvýšený pomer A β 42/A β 40 a následná tvorba protofibríl. Predpokladá sa, že missense mutácie majú vplyv na štiepenie APP, uprednostňuje sa štiepenie β sekretázou, za vzniku β APP a následne neurotoxickej A β (*Mullan a kol., 1992*). Nachádzajú sa v blízkosti β -sekretázového štiepného miesta (Lys670Asp/Met671Leu), α -sekretázového štiepného miesta (Ala692Gly, Glu693Gln, Glu693Gly, Asp694Asn), γ -sekretázového štiepného miesta (Thr714Ala, Thr714Ile, Val715Met, Val715Ala, Ile716Val, Val717Ile). Mutácie v kodóne 716 a 717 vedú k selektívnemu zvýšeniu tvorby A β 42 a A β 43, ktoré rapídne agregujú a vedú k tvorbe plakov (*Citron a kol., 1992*). Mutácia 670/671 vedie k tvorbe aj A β 40 aj A β 42. Mutácie Ala692Gly a Glu693Gln majú efekt na β -sekretázové štiepenie, porušením α -štiepenia, čo vedie k tvorbe A β (*Citron a kol., 1994; Haas a kol., 1994*). Vo všeobecnosti platí, že mutácie v blízkosti β -sekretázového štiepného miesta majú vplyv na tvorbu aj A β 40 aj A β 42, zatiaľ, čo mutácie v blízkosti γ -sekretázového štiepného miesta výrazne zvyšujú tvorbu A β 42 a A β 43.

Obrázok 6. Sekvencia A β peptidu a jeho štiepne miesta

Sekvencia A β je v rámečku. Dlhé šípky znázorňujú sekretázové štiepne miesta. Krátke šípky znázorňujú miesto, kde sa predpokladá štiepenie inzulín degradujúcim enzýmom. Taktiež sú znázornené niektoré bodové mutácie vedúce k FAD (*Evin a Wiedemann, 2002*)



Tabuľka 1. Mutácie v APP géne

<i>Mutácia</i>	<i>Lokalizácia</i>	<i>Fenotyp</i>	<i>Priemerný vek nástupu</i>
Glu665Asp	Exón 16	AD s neskorým nástupom	86 ?
Lys670Asp/Met671Leu (Švédská mutácia)	Exón 16	Alzheimerova choroba	52 (44-59)
Ala673Thr	Exón 16	Nepatologická	–
His677Arg	Exón 16	Alzheimerova choroba	55
Asp678Asn	Exón 16	Alzheimerova choroba	60
Ala692Gly (Flámska mutácia)	Exón 17	Kongofilná angiopatia a AD	40-60
Glu693Gly (Arktická mutácia)	Exón 17	Alzheimerova choroba	58
Glu693Gln (Holandská mutácia)	Exón 17	HCHWA-D	~ 50
Glu693Lys (Talianska mutácia)	Exón 17	Alzheimerova choroba/Cerebral hemorrhage	?
Asp694Asn (Iľovská mutácia)	Exón 17	Alzheimerova choroba/Cerebral hemorrhage	69
Leu705Val	Exón 17	Alzheimerova choroba	?
Ala713Thr	Exón 17	AD? Patogenéza neobjasnená	-
Ala713Val	Exón 17	Schizofrénia	?
Thr714Ala (Iránska mutácia)	Exón 17	Alzheimerova choroba	52 (40-60)
Thr714Ile (Rakúska)	Exón 17	Alzheimerova choroba	35-45
Val715Met (Francúzska mutácia)	Exón 17	Alzheimerova choroba	52 (40-60)
Val715Ala (Nemecká mutácia)	Exón 17	Alzheimerova choroba	47
Ile716Val (Floridská mutácia)	Exón 17	Alzheimerova choroba	55
Ile716Thr	Exón 17	Alzheimerova choroba	55
Val717Phe (Indiánska mutácia)	Exón 17	Alzheimerova choroba	47 (42-52)
Val717Gly	Exón 17	Alzheimerova choroba	55 (45-62)
Val717Ile (Londýnska mutácia)	Exón 17	Alzheimerova choroba	50-60
Val717Leu	Exón 17	Alzheimerova choroba	38
Leu723Pro (Austrálska mutácia)	Exón 17	Alzheimerova choroba	45-60
Lys724Asn (Belgická mutácia)	Exón 17	Alzheimerova choroba	?

Alzheimer Disease Mutation Database (<http://www.alzforum.org/res/com/mut/app/table1.asp>)

2.4 Presenilíny

2.4.1 Základná charakteristika presenilínov

Pomocou genetických väzbových analýz sa v roku 1992 detekoval lokus asociovaný s FAD so skorým nástupom ochorenia na dlhom ramienku chromozómu 14 (*Schellenberg a kol.*, 1992). V roku 1995 bol gén *psen 1* (14q24.3), identifikovaný a izolovaný pomocou pozičného klonovania (*Sherrington a kol.*, 1995). Podarilo sa identifikovať jeho homológ *psen 2* na chromozóme 1q42.1 (*Levy-Lehad a kol.*, 1995). *Psen 1* gén obsahuje 50-75 kb génomovej DNA a je organizovaný do 12 exónov (*Rogaev a kol.*, 1997). *Psen 2* gén obsahuje 24 kb génomovej DNA a je organizovaný taktiež do 12 exónov (*Levy-Lehad a kol.*, 1996). Otvorený čítací rámec je kódovaný v obidvoch prípadoch exónmi 3-12.

Psen 1 a *psen 2* dávajú vznik dvom hlavným mRNA transkriptom. 7kb a 2,7 kb *psen 1* mRNA a 2,3kb a 2,6 kb *psen 2* mRNA. Presenilín 1 je exprimovaný v rôznych typoch buniek, hlavne v centrálnom nervovom systéme a periférnych tkanivách. V CNS je presenilín 1 lokalizovaný v hippocampe, neokortexe, purkyňeho a granulárnych bunkách, subicullu, v olfaktorálnom bulbe, jadrách mozgového kmeňa a talame (*Sherrington a kol.*, 1995; *Lee a kol.*, 1996). Presenilín 2 je exprimovaný v mozgu, pľúcach, pečeni, srdci, pankrease, kostrovom svalstve a placentе (*Rogaev a kol.*, 1995). Je popísaných niekoľko zstrihových variantov presenilínu 1. Napríklad alternatívnym zstrihom exónu 3 nastane delécia tetrapeptidu Val-Arg-Ser-Gln.

2.4.2 Štruktúra presenilínov

Presenilíny (PS) sú ubikvitinózne exprimované transmembránové proteíny. *Psen 1* kóduje 50 kDa proteín so 467 aminokyselinami, *psen 2* kóduje 55 kDa proteín so 448 aminokyselinami (*Levy-Lehad a kol.*, 1996; *Sherrington a kol.*, 1995). Determinácia membránovej topológie presenilínov je v centre záujmu mnohých štúdií, pretože by napomohla k zlepšeniu pochopenia ich funkcie. Je navrhnutých množstvo modelov na základe rozličných experimentálnych prístupov. Používa sa značenie protilátkami po selektívnej permeabilizácii bunkovej membrány alebo konštrukcia chimerických proteínov. Štúdie sú zamerané na určenie orientácie N a C terminálneho konca a počtu transmembránových segmentov (*Doan a kol.*, 1996, *Li a Greenwald*, 1996).

Na základe hydropacej analýzy sa zistila prítomnosť hydrofilného N-terminálneho konca a desiatich hydrofóbných regiónov (HR), ktoré by mohli byť lokalizované v membráne. Väčšina segmentov je spojená s krátkymi slučkami, iba HR7 a HR8 sú spojené dlhou hydrofilnou slučkou (*Kyte and Doolittle*, 1982).

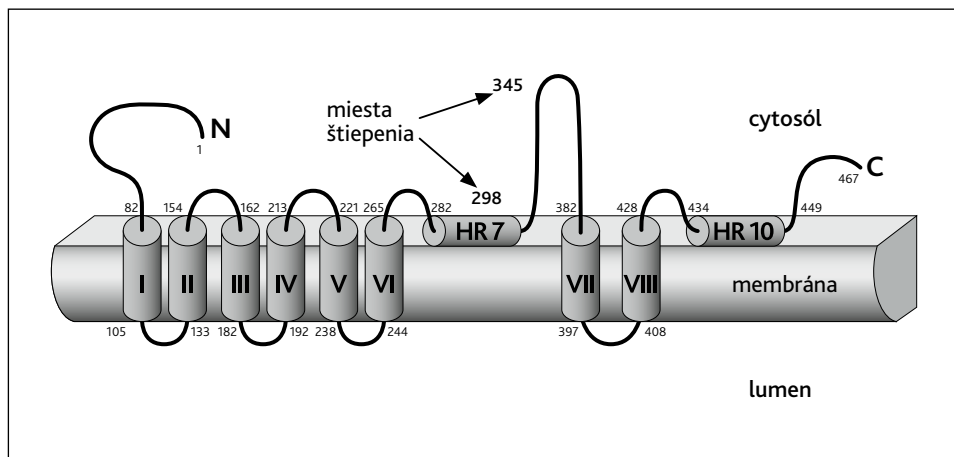
Navrhnuté modely sa zhodujú v počte šiestich hydrofóbných transmembránových domén a v orientácii N konca do cytosólu. Líšia sa v lokalizácii C konca a ďalších membránových domén. Najpravdepodobnejší je model, ktorý navrhli Li a Greenwald (1996, 1998) (obrázok 7). Model predpokladá osem transmembránových domén (TMD), ktoré sú pospájané hydrofilnými slučkami, amino- a karboxy-terminálny koniec orientovaný do cytosólu a dlhú slučku medzi 6. a 7. transmembránovou doménou orientovanou do cytosólu. HR7 a HR10 sú asociované s membránou, ale neprechádzajú ňou. Najnovšie štúdie potvrdili cytosólovú

orientáciu N-terminálneho konca a dlhej hydrofilnej slučky, ale predpokladajú, že C-terminálny koniec je orientovaný do lumenu a HR pri C konci je deviatou transmembránovou doménou (*Laudon a kol., 2005*).

Presenilínové homológy sa našli v rôznych organizmoch. Nie len u cicavcov a stavovcov, ale v celej zvieracej ríši ako napr. *Xenopus leavis*, *Drosophilla melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* a v rastlinnej ríši u *Arabidopsis thaliana*. Medzi ľudskými presenilínmi a presenilínmi iných druhov existuje vysoký stupeň homológie. PS1 a PS2 majú na 67% identickú primárnu sekvenciu. Majú 57% homológiu k presenilínom *Drosophilla melanogaster* (*Boulianne a kol., 1997*). U *Xenopus leavis* je 90% homológia PS-alpha s PS1 a 86% homológia PS-beta s PS2 (*Tsujimaru a kol., 1997*). U *Arabidopsis thaliana* je 33% homológia s ľudskými presenilínmi. Aminokyselinová sekvencia v hydrofóbných regiónoch je úplne identická medzi PS1 a PS2 a vysoko konzervovaná medzi druhmi. Vysoká homológia je aj v blízkosti C-terminálneho konca. Tieto evolučne konzervované oblasti sú dôležité pre funkciu a štruktúru presenilínov. N-terminálna časť nie je evolučne konzervovaná.

Obrázok 7. Membránová topológia presenilínu 1

Osem transmembránových domén (I-VIII), HR7 a 10 sú asociované s membránou (*Li a Greenwald 1996, 1998*).



PS1 je lokalizovaný v endoplazmatickom retikule, ER/Golgiho kompartmentoch, endozónoch, lyzozónoch, jadrovej membráne, plazmatickej membráne a mitochondriách (*Cook a kol., 1996; Culvenor a kol., 1997*). Kvantitatívnou imunoelektrónovou mikroskopiou sa zistilo, že 52% endogénneho PS1 sa nachádza v pre-Golgiho membránach, ktoré obsahujú jadrový obal a v ER, iba 1% je v Golgiho komplexe, 25% v plazmatickej membráne a 13% v endocytických kompartmentoch.

2.4.3 Posttranslačné modifikácie a proteolýza presenilínov

Presenilíny nepodliehajú glykozylácii, sulfonácii, acylácii, ale sú fosforylované na serínových zvyškoch (Walter a kol., 1997). Najvýznamnejšia posttranslačná modifikácia je proteolytické štiepenie. PS1 je syntetizovaný ako holoproteín, ktorý je veľmi nestabilný a rýchlo degraduje (Thinakaran a kol., 1996). Holoproteín je aktívne katabolizovaný tromi proteolytickými mechanizmami. PS1 aj PS2 sú degradované v proteozómoch, čo svedčí aj o ich ubikvitinácii. Tieto multikatalytické komplexy kontrolujú ich bunkovú koncentráciu (Fraser a kol., 1998).

V druhom prípade ide o endoproteolytické štiepenie v hydrofilnej slučke medzi šiestym a siedmym transmembránovým regiónom v polohe 298. Štiepením PS1 vznikajú 27-28 kDa N-terminálne (NTF) a 18-20 kDa C-terminálne fragmenty (CTF). Štiepením PS2 vznikajú 34 kDa N-terminálne a 20 kDa C-terminálne fragmenty (Podlisny a kol., 1997). Pomer NTF a CTF je 1:1, a ani nadexpresia PS1 nespôsobila výrazný nárast tvorby fragmentov. Z toho dôvodu sa predpokladá, že štiepenie je prísne regulovaný proces (Thinakaran a kol., 1996). Aj holoproteín aj jeho fragmenty sú súčasťou vysokomolekulárných, multimérnych proteínových komplexov. Holoproteín je komponent 180 kDa komplexu, ktorý je lokalizovaný v drsnom ER (Capell a kol., 1998; Yu a kol., 1998). NTF a CTF sú súčasťou 250 kDa multimérnych komplexov lokalizovaných v ER a Golgiho aparáte (Capell a kol., 1998; Thinakaran a kol., 1998; Yu a kol., 1998). Holoproteín PS1, ktorý sa neinkorporuje do komplexov je rýchlo rozložený s polčasom rozpadu 1,5 – 2 hodiny. Fragmenty sú stabilnejšie s polčasom rozpadu 24 hodín. Inkorporácia presenilínov a ich derivátov do proteínových komplexov je potrebná pre ich biologickú funkciu. Štiepenie presenilínov je vysoko konzervované a dôležité pre ich stabilitu a aktivitu (Thinakaran a kol., 1998). Enzymová aktivita zodpovedná za štiepenie nebola doposiaľ identifikovaná. Predpokladá sa hypotetická presenilináza alebo aj autokatalytické štiepenie (Capell a kol., 1998).

Či holoproteín alebo jeho fragmenty vykonávajú biologickú funkciu zatiaľ nie je presne objasnené. Aj v prípade porušenia štiepenia presenilínov, vykazoval holoproteín γ -sekrétázovú aktivitu. Štiepenie nastáva v oblasti 298, ktorá je kódovaná 9. exónom, kde sa vyskytuje aj veľa mutácií. Predpokladá sa, že pre patologickú funkciu nie je potrebné štiepenie, pretože sú popísané mutantné varianty, ktorých štiepne miesto bolo porušené a nenastalo štiepenie a aj tak sa zachovala aktivita, ktorá viedla k tvorbe A β 42 (Podlisny a kol., 1997; Steiner a kol., 1999). Preto sa predpokladá, že štiepenie presenilínov je nezávislé od γ -sekrétázovej aktivity.

Tretí proteolytický mechanizmus je štiepenie kaspázou 3. Aktivácia apoptózy vedie k aktivácii kaspázy 3, ktorá následne štiepi PS1 v aspartátovom zvyšku v polohe 345 a PS2 v polohe 329 (Kim a kol., 1997). Nie je však jasné, či kaspázou sprostredkované štiepenie presenilínov je aktívne zahrnuté v regulácii apoptotickej signálnej dráhy (niektoré štúdie predpokladajú anti-apoptotický efekt C-terminálnych derivátov kaspázového štiepenia) alebo je náhodne štiepený potom ako sa aktivovala apoptóza. Inhibícia kaspázového štiepenia nemá vplyv na biologickú aktivitu presenilínov ani amyloidogézu (Brockhaus a kol., 1998).

2.4.4 Funkcia presenilínov

2.4.4.1 γ -sekretázová aktivita

De Strooper a kol. (1998) po prvýkrát popísali významnú úlohu PS1 v procese štiepenia APP, keď zistili, že myši bez *psen 1* majú redukované množstvo A β 40/A β 42 v nervových tkanivách a nahromadené produkty α - a β -sekretázového štiepenia C83 a C99. Zvyšná γ -sekretázová aktivita je spôsobená PS2, pretože myši bez *psen 1* a *psen2* nevykazujú takmer žiadnu γ -sekretázovú aktivitu (Donoviel a kol., 1999; Nunan a Small, 2000). Presenilíny priamo alebo nepriamo kontrolujú patofyziologickú maturáciu β -APP. AD pacienti s mutáciami v presenilínoch majú signifikantne zvýšenú hodnotu plazmatického A β 42 spolu s masívnym ukladaním A β 42 v mozgu (Iwatsubo a kol., 1998). Výrazne zvýšená hladina A β 42 sa zistila vo všetkých biologických systémoch s nadexpresiou mutantných presenilínov akými sú transfekované bunky a transgénne myši (Borchelt a kol., 1996; Citron a kol., 1997).

Presný mechanizmus štiepenia APP presenilínmi nie je známy. Jeden model predpokladá, že presenilíny predstavujú hlavné katalytické centrum γ -sekretázovej aktivity. Predpokladá sa, že presenilíny sú autokatalyticky aktivované aspartyl proteázy (Herreman a kol., 2000; Wolfe a kol., 1999). Nasvedčuje tomu identifikácia dvoch aspartátových zvyškov, ktoré sú vysoko evolučne konzervované. Jeden sa nachádza v transmembránovej doméne 6 (D257 v PS1, D263 v PS2) v NTF a druhý v transmembránovej doméne 7 (D385 v PS1, D366 v PS2) v CTF. Mutácie v aspartátových zvyškoch signifikantne znižujú produkciu A β peptidu a p3, čím sa predpokladá, že dané aspartátové zvyšky sú esenciálne pre γ -sekretázovú aktivitu a tvoria aktívne centrum. Mutáciami sa jednak naruší γ -sekretázová aktivita, ale ruší sa aj endoproteolýza presenilínov, čím sa predpokladá, že aspartátové zvyšky majú význam aj pri štiepení (Wolfe a kol., 1999). Ďalším dôkazom sekretázovej aktivity presenilínov je, že γ -sekretázové inhibítory sa špecificky viažu na C- a N-terminálne fragmenty a inhibujú γ -sekretázovú aktivitu (Li a kol., 2000).

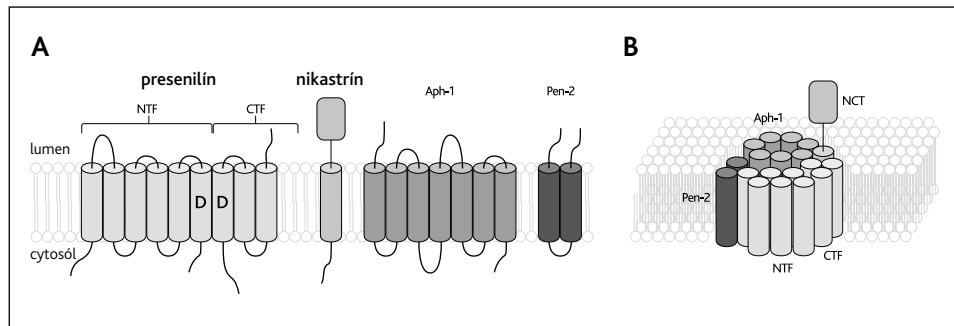
Ďalší model predpokladá, že presenilíny sú zahrnuté v intracelulárnom transporte APP do kompartmentov s γ -sekretázovou aktivitou. Popisuje sa dôležitosť vzájomnej interakcie APP a presenilínov v tvorbe A β 42. Fyzická interakcia medzi APP a presenilínmi v ER je najpravdepodobnejší mechanizmus štiepenia APP (Cook a kol., 1997; Hartmann a kol., 1997). Presenilíny interagujú s APP v oblasti A β transmembránovej domény. Nebol popísaný žiaden rozdiel v interakcii medzi štandardným a mutantným typom presenilínu. Predpokladá sa, že mutácie nenia interakciu APP a presenilínov, ale modifikujú štruktúru komplexu a tým vplyvajú na štiepenie APP (Cook a kol., 1997).

Po identifikácii presenilínov ako katalytického centra γ -sekretázovej aktivity, sa začali hľadať ďalšie proteíny predpokladaného multimérneho komplexu, ktoré sú nutné pre stabilitu komplexu, reguláciu presenilínov a γ -sekretázovú aktivitu (Small, 2002). Identifikoval sa s presenilínom interagujúci proteín nikastrín. Je to transmembránový vysoko glykozylovaný proteín so 709 aminokyselinami, ktorý tvorí vysokomolekulárne komplexy s PS1 a PS2 a je taktiež zahrnutý do štiepenia APP a proteínu Notch (Yu a kol., 2000). Na mnohých zvieracích modeloch sa potvrdilo, že nulové mutácie génu pre nikastrín vedú k letálnemu fenotypu ako v prípade knockout presenilínov a Notch (Li a kol., 2003; Yu a kol., 2000). Gén kódujúci

nikastrín sa nachádza na chromozóme 1q23, ktorý je považovaný za kandidátny lokus AD s neskorým nástupom. Nikastrín má konzervovanú doménu ako proteíny z rodiny transferínových receptorov, ktorá viaže APP a interaguje s NTF a CTF presenilínov. Viaže C83/C99 APP a má vplyv na tvorbu A β . Nikastrín je zapojený aj do štiepenia presenilínov. Missense mutácie v konzervovanom motíve DYIGS (336–340) nikastrínu zvyšujú hladinu A β 40/ A β 42 a delécia tohto motívu inhibuje tvorbu A β . Iba maturovaný N-glykozylovaný nikastrín sa selektívne viaže na presenilín v aktívnej γ -sekretáze (Arawaka a kol., 2002; Edbauer a kol., 2002; Kimberley a kol., 2002; Leem a kol., 2002). Genetickým skríningom boli identifikované ďalšie dva gény potrebné pre γ -sekretázovú aktivitu. *Aph-1*, ktorý kóduje proteín so siedmymi transmembránovými doménami a *Pen-2*, ktorý kóduje proteín s dvomi transmembránovými doménami. Nadexpresia všetkých štyroch proteínov vedie k zvýšenej hladine NTF a CTF, maturovaného nikastrínu a γ -sekretázovej aktivity. Predpokladá sa, že proteínový komplex pozostávajúci z presenilínov, nikastrínu, aph-1 a pen-2 je potrebný pre γ -sekretázovú aktivitu (obrázok 8) (Francis a kol., 2002; Kimberley a kol., 2003). Biogenéza, maturácia, stabilita a ustálený stav jednotlivých komponentov podlieha vzájomnej regulácii. Znížená expresia niektorých zložiek má vplyv na stabilitu ostatných zložiek komplexu. Dôkazom toho je, že v prípade absencie presenilínov je maturácia nikastrínu inhibovaná a nikastrín sa neviaže do proteínového komplexu (Leem a kol., 2002). Deficiencia presenilínov taktiež naruší intracelulárny transport aph-1 a pen-2. Presenilíny nepodliehajú štiepeniu za tvorby NTF a CTF v bunkách bez nikastrínu (Wang a kol., 2004; Zhang a kol., 2005). Tvorba komplexu začína v ER hneď po translácii a membránovej lokalizácii proteínov. Nikastrín a aph-1 tvoria subkomplex, v ktorom je nikastrín nematurovaný a hypoglykozylovaný. Následne sa pridá PS1 holoproteín interakciou s nikastrínom. V poslednom kroku sa pridá pen-2 interakciou s TMD4 PS1. PS1 sa štiepi a vzniká komplex s NTF a CTF PS1, maturovaným, glykozylovaným nikastrínom a γ -sekretázovou aktivitou (Capell a kol., 2003; Kim a kol., 2005; Watanabe a kol., 2005).

Obrázok 8. Komponenty γ -sekretázovej aktivity

A. γ -sekretáza pozostáva zo štyroch integrálnych membránových proteínov: presenilínov, nikastrín, aph-1, pen-2. Presenilíny sú štiepené za vzniku NTF a CTF. Dva aspartáty esenciálne pre aktivitu sú znázornené. **B.** Model ako sú jednotlivé zložky γ -sekretázy usporiadané v aktívnom proteázovom komplexe (Fraering a kol., 2004).



2.4.4.2 Programovaná bunková smrť

Významnú úlohu v apoptóze zohráva štiepenie presenilínov kaspázou 3. Zistilo sa, že v kultivovaných bunkách, ktoré exprimovali mutantný PS2 bol vyšší podiel alternatívne štiepených fragmentov (kaspázou 3) ako fragmentov normálneho štiepenia, zatiaľ čo v kultivovaných bunkách, ktoré exprimovali wild type PS2 to bolo naopak. C-terminálne fragmenty PS2 získané fyziologickým štiepením majú anti-apoptotický efekt, ale fragmenty získané alternatívnym štiepením tento efekt nemajú (Kim a kol., 1997). C-terminálne fragmenty PS2 sú fosforylované in vivo. Fosforylácia PS2 inhibuje štiepenie kaspázou 3 a indukuje anti-apoptotický efekt (Walter a kol., 1999). To, že kaspázou štiepené mutantné PS2 modulujú bunkovú smrť sa zistilo tým, že mali apoptotický efekt v HeLa bunkách na rozdiel od wild type PS2 (Janicki a Monteiro, 1997). Či proapoptotická funkcia mutantného PS2 súvisí so zvýšenou tvorbou toxického A β sa presne neidentifikovalo. Zmena fosforylácie PS2 indukuje vnímavosť neurónov na apoptotické stimuly (Walter a kol., 1999).

Anti-apoptotický efekt majú aj fragmenty PS1 získané fyziologickým štiepením. Kaspázou získané C-terminálne fragmenty blokujú daný efekt a rušia aj väzbu s β -katenínom, čo taktiež vedie k apoptóze (Tesco a kol., 1998; Zhang a kol., 1998).

Predpokladá sa, že v dôsledku mutácií v *psen 1* a *psen 2* sú presenilíny náchylnejšie k štiepeniu kaspázou 3 a to je mechanizmus, ktorým je kaspáza zahrnutá v patogeneze AD.

2.4.4.3 Notch signálna transdukcia

Predpokladá sa významná úloha presenilínov v regulácii signálnej transdukcie počas embryonálneho vývinu (Shen a kol., 1997). Presenilíny sú zahrnuté v Notch signálnej dráhe. Notch je transmembránový proteín zahrnutý v intracelulárnej signalizácii v embryogenéze. Je štiepený za vzniku intracelulárneho fragmentu, ktorý je translokovaný do jadra, interaguje s transkripčnými faktormi a spúšťa transkripciu cieľových génov potrebných pre vývin. Úloha presenilínov v Notch signalizácii bola potvrdená zvieracím modelom, keď myši bez presenilínov zomierali v prvých dňoch života. Mali závažné skeletálne abnormality, redukovanú hmotnosť a veľkosť, deformované pľúca a poruchu neurogenézy. Základom poruchy vývinu axiálnej kostry je narušená segmentácia v embryogenéze. Podobný je fenotyp myši bez Notch génu. Taktiež sa zistila znížená expresia Notch v rôznych typoch buniek (Shen a kol., 1997; Wong a kol., 1997). Dôkazom, že presenilíny sú potrebné k štiepeniu Notch, je inhibícia štiepenia Notch inhibíciou γ -sekretázovej aktivity.

Zistilo sa, že nadexpresia normálnych alebo mutantných presenilínov zvrátila neonatálnu letalitu myši, čo naznačuje, že mutácie nemajú vplyv na funkciu presenilínov vo vývine (Davis a kol., 1998).

2.4.4.4 Signálna dráha β -katenínu

PS1 interaguje v mozgu a periférnych tkanivách priamo s β -katenínom, členom katenínovej proteínovej superrodiny. Kateníny sú proteíny príbuzné k armadillo proteínom u *Drosophilla melanogaster*. β -katenín sa viaže na PS1 v oblasti dlhej hydrofilnej slučky v polohe 372-399 (Murayama a kol., 1998; Tesco a kol., 1998). V danej slučke je motív, ktorý je vysoko konzervovaný aj v PS2. K hlavným funkciám katenínov patrí bunková adhézia, štrukturálna úloha

v stabilizácii intracelulárnych spojení a Wingless/Wnt signálna transdukcia. Wnt signalizácia je zahrnutá v mnohých esenciálnych vývinových procesoch. Cytoplazmatická hladina β -katenínu je kontrolovaná glykogén-syntázou –kinázou-3 β (GSK-3 β), ktorá v aktívnom stave fosforyluje β -katenín a ten je degradovaný v proteazóme (Aberle a kol., 1997). To prebieha v prípade ak Wnt signalizácia nie je aktívna. Ak sa aktivuje Wnt signalizácia, β -katenín sa viaže na transkripčné faktory a v jadre spúšťa transkripciu cieľových génov (Resnik, 1997). Tvorba komplexu β -katenínu s PS1 výrazne stabilizuje β -katenín. Mutantný PS1 znižuje stabilitu β -katenínu a tým sa spúšťa jeho degradácia a naruší sa Wnt signalizácia. U pacientov s AD s mutáciou v presenilínoch je výrazne redukovaná jadrová translokácia β -katenínu. Strata β -katenínovej signalizácie zvyšuje citlivosť neurónov na apoptózu indukovanú A β . Mutantné presenilíny sú teda priamo spojené s neurodegeneráciou v dôsledku porušenia stability β -katenínu. Taktiež sa predpokladá, že štiepenie kaspázou naruša tvorbu komplexu PS1 a β -katenínu, čo taktiež vedie k zníženiu stability β -katenínu (Zhang a kol., 1998).

GSK-3 β fosforyluje aj proteín tau. Mutantný PS1 je schopný interagovať s tau a GSK-3 β a sprostredkuje fosforyláciu tau, preto sa predpokladá, že je zahrnutý v regulácii fosforylácie tau a teda aj v tvorbe neurofibrilárnych spleťí (Imahori a Uchida, 1997).

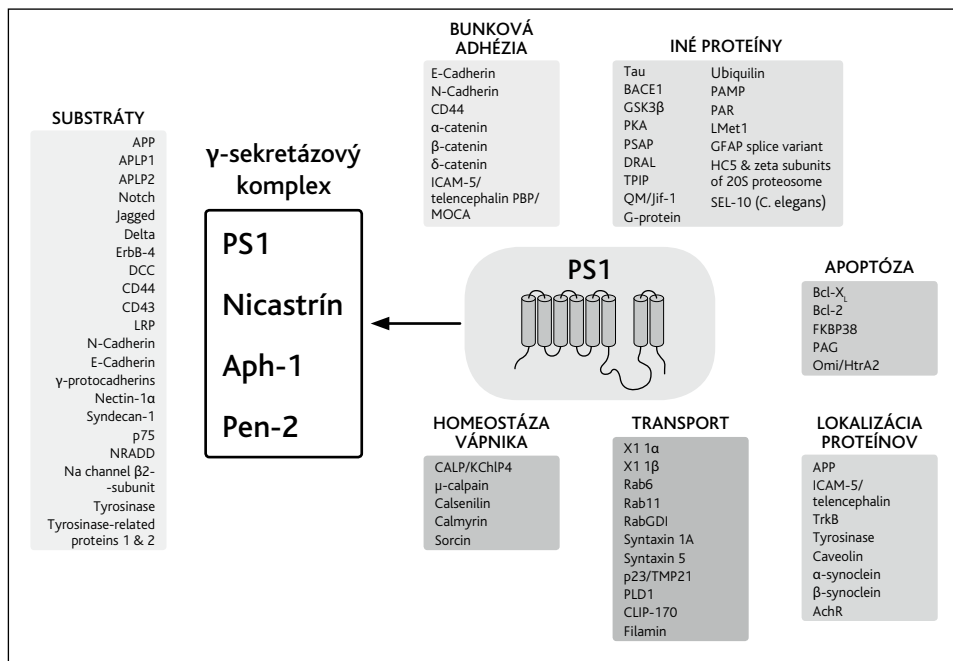
2.4.4.5 Interakcie s inými proteínmi

Presenilíny interagujú s mnohými proteínmi (obrázok 9). Zistila sa interakcia s neuronálnym vápnik viažucim proteínom, kalsenilínom, čo priamo spája funkciu presenilínov s reguláciou intracelulárnej hladiny vápnika (Buxbaum a kol., 1998).

Interakcia PS1 karboxyterminálneho konca s G-proteínom svedčí o ich úlohe v regulácii G-proteínovej aktivácie (Smine a kol., 1998).

Mnohé proteíny interagujú s dlhou hydrofilnou slučkou presenilínov ako napr. proteín cytoskeletu filamín; μ -kalpain; Rab6 a 11, malé GTPázy, zahrnuté vo vezikulárnom transporte; antiapoptotické molekuly Bcl-XL/bcl-2, čo nasvedčuje funkciu v kontrole bunkovej smrti; interakcia s epiteliálnym kadherínom a telencefalínom nasvedčuje úlohu v bunkovej adhézii. Taktiež je popísaná úloha presenilínov pri správnom skladaní a transporte proteínov a bunkovom delení (Van Gassen a kol., 2000).

Obrázok 9. Jednotlivé funkcie presenilínov a ich interakcia s proteínmi (Vetrivel a kol., 2006)



2.4.5 Mutácie v presenilínoch

Do dnešnej doby je popísaných 185 rôznych mutácií v *psen1* v 405 rodinách a 13 mutácií v *psen2* géne (Alzheimer Disease Mutation Database www.molgen.ua.ac.be/ADMutations). Mutácie v *psen1* sú zodpovedné za vyše 50% všetkých FAD s autozómovo dominantnou formou dedičnosti a úplnou penetranciou (Cruts a kol., 1998). Väčšina mutácií v *psen1* sú substitučné mutácie meniace zmysel genetickej informácie (zámena jednej aminokyseliny za druhú – missense). Missense mutácie sú rozložené po celej kódujúcej oblasti a sú lokalizované hlavne vo vysoko konzervovaných transmembránových doménach a v aminokyselinovej polohe 260–290 (Dillen a Annaert, 2006). Zasahujú aminokyseliny konzervované medzi PS1 a PS2. Mutácie vedú k odlišnému veku nástupu ochorenia, ktorý varíruje od 25 rokov (Leu392Val) až do 60 rokov (Ala79Val). Okrem missense mutácií sú popísané aj delécie ako napr. 22932_22937delATCATG. Táto hexanukleotidová delécia v exóne 4 vedie k delícii dvoch aminokyselín metionínu a izoleucínu v TM I doméne. Priemerný vek nástupu je 36 rokov a priemerný vek úmrtia je 44 rokov (Steiner a kol., 2001). Ďalšia popísaná trinukleotidová delécia v exóne 6 38795_38797delTAT vedie k delícii izoleucínu v TM III. Priemerný vek nástupu je 52 rokov (Beck a kol., 2002). Výrazné genómové delécie sa našli v oblasti 56305_62162del, čo vedie k delícii exónu 9 (Crook a kol., 1998). Známa je aj trinukleotidová delécia v exóne 12 71122_71124delACC, čo vedie k delícii treonínu s priemerným vekom nástupu 34,5 rokov (Ishikawa a kol., 2005).

Okrem delécií sú popísané aj inzercie. Inzercia 6 nukleotidov v exóne 5, 25669_25670in-
sTTATAT vedie k inzercii fenylnalanínu a izoleucínu medzi lyzín 155 a tyrozín 156. Priemerný
vek nástupu je 28 rokov a úmrtia 35. Inzercia 18 nukleotidov je popísaná v intróne 8 a tri-
nukleotidová inzercia v exóne 10 (Rogaeva a kol., 2001).

Taktiež sú popísané zozriahové mutácie v intróne 4, čo vedie k vzniku troch rôznych tran-
skriptov. Prvý s inzerciou treonínu medzi kodónom 113 a 114. Ďalšie dva s čiastočnou alebo
úplnou deléciou exónu 9. Tieto dva vedú k posunu čítacieho rámca a k tvorbe stop kodónu.
Priemerný vek nástupu je okolo 35,6 a priemerný vek úmrtia je 42 rokov (Tysoe a kol., 1998).
Ďalšia zozriahová mutácia v intróne 8 vedie k delícii exónu 9 T291_S319del a k **aminoky-
selinovej substitúcii serínu za cysteín v kodóne 290**. Priemerný vek nástupu je 47,5 rokov
(Sato a kol., 1998).

Výrazne nízke zastúpenie mutácií vedúcich k posunu čítacieho rámca alebo k strate expsie
naznačujú, že výrazné zmeny štruktúry presenilínov nie sú zlúčiteľné zo životom.

V *psen1* bola v jednej anglickej rodine identifikovaná aj mutácia s neúplnou penetranciou,
ktorá vedie k zámene aminokyseliny izoleucín za valín v kodóne 141, s priemerným vekom
nástupu 55 rokov. Táto mutácia bola zistená aj u zdravých jedincov vo veku 68 rokov (Rossor
a kol., 1996).

Mutácie v *psen 2* vedú k neskoršiemu veku nástupu ochorenia v priemere 57 rokov. Sú
popísané len missense mutácie. Prvá mutácia bola identifikovaná genetickou väzbovou ana-
lýzou chromozómu 1 v nemeckej rodine. Ide o bodovú mutáciu v exóne 5, ktorá vedie v TM
II doméne proteínu k zámene asparagínu za izoleucín v kodóne 141. Priemerný vek nástupu
je 56,9 rokov (Levy-Lahad, 1995; Rogaev a kol., 1995). Charakteristické pre mutácie v *psen2*
je ich neúplná penetrancia alebo sa aj predpokladá, že v dôsledku neskoršieho veku nástupu
pacient zomiera skôr ako sa ochorenie stihne prejaviť (Levy-Lahad, 1995).

Vplyv mutantných presenilínov na patogenézu AD vyplýva z jeho hlavných funkcií, ktoré
v prípade mutácie môžu byť narušené (loss of function). Predpokladá sa však, že mutácie
v presenilínoch majú za následok aj získanie novej funkcie presenilínov (gain of function), čo
sa prejaví vplyvom na γ -sekretázové štiepenie β APP, tak že sa selektívne uprednostňuje tvorba
vysoko toxických A β 42 peptidov. Táto skutočnosť sa potvrdila vo všetkých biologických sys-
témoch s nadexpresiou mutantných presenilínov (Borchelt a kol., 1996; Citron a kol., 1997).
Presný mechanizmus ako sa mení špecifita štiepneho miesta β APP nie je presne známy, ale
predpokladá sa, že sa v dôsledku mutácie mení proximita C- a N-terminálnych častí PS1, čo
vedie ku konformačným zmenám v aktívnych centrách γ -sekretázy a tým sa uprednostňuje
štiepenie za vzniku A β 42 (Berezovska a kol., 2005). Ďalšie mechanizmy sú indukcia apoptózy,
vplyv na fosforyláciu tau, zmena v homeostáze vápnika a narušenie interakcie s mnohými
proteínmi ako napr. β -katenínom.

2.5 Proteín Tau

Rôzne sporadické a familiárne neurodegeneratívne ochorenia klinicky sa prejavujúce de-
mentným syndrómom a motorickou dysfunkciou sú charakteristické intracelulárnou akumu-
láciou filamemtov zložených z proteínu tau. Vo všeobecnosti sa tieto ochorenia s podobnou

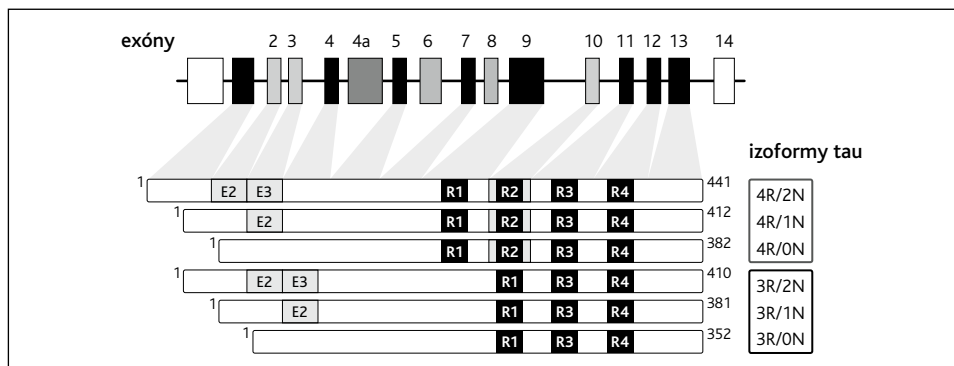
histopatologickou črtou označujú „tauopatie“. Medzi tieto ochorenia sa zaraďuje aj Alzheimerova choroba, ktorej významnou patologickou črtou sú lézie hyperfosforylovaného tau vo forme neurofibrilárnych spleť (NFS) (*Grundke-Iqbal a kol., 1986; Wischik a kol., 1988*).

2.5.1 Molekulárna štruktúra a funkcia tau

Tau je s mikrotubulami asociovaný proteín (MAP). Gén kódujúci tau sa nachádza na chromozóme 17q21 (*Neve a kol., 1986*). Je zložený zo 16. exónov, pričom väčšina tau v CNS je kódovaná 11. exónmi (obrázok 10) (*Andreadis a kol., 1992*). Tau proteín je exprimovaný hlavne v neurónoch centrálneho nervového systému (CNS) a v periférnom nervovom systéme (*Binder a kol., 1985; Couchie a kol., 1992*). V neurónoch sa nachádza hlavne v axónoch. V nízkych hladinách je exprimovaný aj v astrocytoch a oligodendrocytoch CNS (*LoPresti a kol., 1995*).

V ľudskom mozgu je exprimovaných 6 izoformiem tau varíujúcich v dĺžke od 352 do 441 aminokyselín ako výsledok alternatívneho zostrihu exónov 2, 3, 10 (*Goedert a kol., 1989a*). Izoformy sa odlišujú, v dôsledku alternatívneho splicingu exónu 10, prítomnosťou troch (3R tau) alebo štyroch (4R tau) tandemových opakovaní v C-terminálnej časti proteínu. Tieto opakovania sú súčasťou domén viažucich mikrotubuly (MT) zložených z 31 alebo 32 aminokyselinovej sekvencie a sú kódované exónmi 9-12 (*Goedert a kol., 1989a, b*). Samotný motív viažuci mikrotubuly je zložený z 18 vysoko konzervovaných aminokyselín (*Butner a Kirschner, 1991*). Izoformy sa taktiež odlišujú alternatívnym splicingom exónov 2 a 3, čo vedie k absencii (0N) alebo prítomnosti sekvencie s 29 aminokyselinami (E2, 1N) alebo s 58 aminokyselinami (E2+E3, 2N) v N-terminálnej časti proteínu. V dospelom ľudskom mozgu je expresia 3R tau a 4R tau približne vyrovnaná (*Goedert a kol., 1989a, b*). Zastúpenie izoformiem 0N je 54%, 1N 37 % a 2N sa vyskytuje v najnižšom množstve 9% (*Forman a kol., 2000*).

Obrázok 10. Schéma ľudského tau génu a šiestich tau izoformiem vytvorených alternatívnym zostrihom. Tau gén obsahuje 16 exónov, exón 0 je súčasťou promótoru. Alternatívnym zostrihom exónov 2 (E2), 3 (E3) a 10 vzniká šesť alternatívnych izoformiem tau. Exóny 6 a 8 nie sú transkribované v ľudskej CNS. Exón 4a taktiež nie je transkribovaný v CNS, ale je exprimovaný v PNS a vedie k tvorbe „veľkej“ izoformy tau. Čierne rámečky znázorňujú tandemové opakovania (R1-R4) (*Forman a kol., 2000*).



Alternatívny mRNA splicing je regulovaný vývinom. Kým vo fetálnom mozgu je exprimovaná iba najkratšia izoforma s 352 aminokyselinami 3R/ON, v dospelom mozgu je exprimovaných všetkých 6 izoformiem (*Goedert a kol., 1989a, b; Goedert a Jakes, 1990*). V PNS je v dôsledku transkripcie exónu 4a exprimovaný tau proteín s veľkou molekulovou hmotnosťou tzv. „veľký“ tau (*Georgieff a kol., 1991; Taleghany a Oblinger, 1992*).

K hlavným funkciám proteínu tau patrí asemlácia mikrotubulov, regulácia stability a orientácie mikrotubulov, udržovanie integrity neurónov a axonálny transport. Tau reguluje koncentráciu, pri ktorej tubulín polymerizuje do mikrotubulov (*Cleveland a kol., 1977; Weingarten a kol., 1975*). 4R tau izoforma efektívnejšie iniciuje polymerizáciu mikrotubulov a lepšie viaže mikrotubuly (*Butner a Kirschner, 1991*). Myši bez tau génu nemajú patologický fenotyp ani žiadne abnormality mozgu, čo naznačuje, že tau nie je esenciálny proteín a jeho funkciu nahrádzajú iné s mikrotubulami asociované proteíny nervového systému (*Harada a kol., 1994*).

2.5.2 Fosforylácia tau

Tau je fosfoproteín, ktorý má 79 potenciálnych serínových a treonínových fosforylačných miest na najdlhšej izoforme. Popisuje sa fosforylácia na 30 miestach na normálnom proteíne tau (*Buée a kol., 2000*). Aj stupeň fosforylácie tau je regulovaný vývinom. Tau z fetálneho mozgu je vysokofosforylovaný na viacerých miestach a stupeň fosforylácie šiestich izoformiem klesá s vekom v dôsledku aktivácie fosfatáz (*Kanamaru a kol., 1992; Mawal-Dewan a kol., 1994*).

Tau v AD mozgu je fosforylovaný na viacerých miestach. Je substrátom pre mnohé Ser/Thr proteínové kinázy ako glykogén syntáza kináza 3 (GSK-3), cyklín dependentná kináza 2 (cdk2), cyklín dependentná kináza 5 (cdk5), cAMP dependentná kináza, Ca^{2+} /kaldmodulín dependentná kináza, proteín kináza A (PKA), kináza regulujúca afinitu mikrotubulov (MARK) a mitogén aktivujúca kináza (MAPK) (*Baudier a kol., 1987; Bauman a kol., 1993; Drechsel a kol., 1992; Drewes a kol., 1997; Hanger a kol., 1992*). Taktiež sú popísané stresom aktivované proteín kinázy, ktoré fosforylujú tau na mnohých miestach (*Reynolds a kol., 1997a, b*).

Fosforylácia tau reguluje väzbu na mikrotubuly nepriamo úmerne k stupňu tejto posttranslačnej modifikácie (*Drechsel a kol., 1992; Biernat a kol., 1993*). Predpokladá sa, že fosforylácia tau na špecifických Ser/Thr miestach a nie celková miera fosforylácie má vplyv na väzbu mikrotubulov. Fosforylácia na Ser 262 mieste, ktoré leží v MT viažucej doméne má významnú úlohu v redukcii väzby tau na mikrotubuly (*Biernat a kol., 1993*). Podobný vplyv má aj fosforylácia na Ser 396, ktoré sa nachádza v blízkosti 4. MT viažucej domény (*Bramblett a kol., 1993*). Obidve tieto miesta sú však fosforylované na fetálnom tau a hyperfosforylované na všetkých 6 izoformách tau v dospelom mozgu, ktoré sú súčasťou neurofibrilárnych spleť (*Seubert a kol., 1995*).

Ako dve hlavné kinázy zahrnuté vo fosforylácii tau in vivo sa popisujú GSK-3 a cdk5. GSK-3 je Ser/Thr kináza nachádzajúca sa v mozgu (*Mandelkow a kol., 1992*). Kotransfekcia neneurónnych buniek s ľudským tau a GSK-3 indukovala hyperfosforyláciu tau a stratu schopnosti viazať mikrotubuly (*Lovestone a kol., 1996*). Priama inhibícia GSK-3 lítiovými soľami redukuje fosforyláciu tau (*Hong a kol., 1997*). Cdk 5 je kináza bohato zastúpená v neurónoch. Pred-

pokladá sa, že fosforylácia sprostredkovaná cdk5 indukuje fosforyláciu tau prostredníctvom GSK-3 (Sengupta a kol., 1997).

Vplyv kináz je v rovnováhe s účinkom fosfatáz, ktoré defosforylujú tau. Patria sem PP1, PP2A, PP2B (kalcineurín) a PP2C. Všetky defosforylujú tau *in vitro*, ale ich presný vplyv *in vivo* nie je objasnený (Buée a kol., 2000). PP2A a PP2B sú prítomné v ľudskom mozgovom tkanive a defosforylujú tau na špecifických miestach aj v mieste Ser396 (Matsuo a kol., 1994). PP1 a PP2A sa viažu na tau a táto interakcia sprostredkuje interakciu s mikrotubulami. PP2A sa viaže aj priamo na mikrotubuly (Sontag a kol., 1995, 1999). *In vitro* inhibícia fosfatáz v kultivovaných nervových bunkách vedie k zvýšeniu tau fosforylácie, k zníženiu väzby tau k mikrotubulom, destabilizácii mikrotubulov a degenerácii axónov (Merrick a kol., 1997). Hyperfosforylovaný agregovaný tau je nerozpustný a vysoko rezistentný k degradácii proteázami a enzýmami.

Vo všeobecnosti sa dá zhodnotiť, že defosforylovaný tau umožňuje polymerizáciu mikrotubulov zatiaľ, čo zvyšujúci sa stupeň fosforylácie tau znižuje túto schopnosť a vedie k destabilizácii mikrotubulov a zhľukovaniu hyperfosforylovaného tau do neurofibrilárnych spleť (Spillantini a Goedert, 1998).

V mnohých štúdiách sa popisuje, že inkubácia tau so sulfatovanými glykozaminoglykánmi ako sú heparín alebo heparán sulfát vedie k zhľukovaniu tau do filamentov aké sú pozorované u AD. Sulfatované glykozaminoglykány stimulujú fosforyláciu tau rôznymi proteín kinázami. Patologická prítomnosť heparán sulfátu v cytoplazme niektorých nervových buniek vedie najskôr k jeho hyperfosforylácii, k destabilizácii mikrotubulov a následne k tvorbe neurofibrilárnych spleť. Heparán sulfát bol identifikovaný v nervových bunkách v skorých štádiách neurofibrilárnej degenerácie.

2.5.3 Tvorba a morfológia neurofibrilárnych spleť

Hromadením hyperfosforylovaného tau nastáva jeho zhľukovanie za tvorby neurofibrilárnych spleť (NFS). Hlavným komponentom NFS sú párové špirálové vlákna, ktoré tvoria asi 95% tau filamentov a zvyšok je tvorený z rovných vlákien. Párové špirálové vlákno je zložené z dvoch okolo seba sa ovíjajúcich vlákien, ktoré tvoria závitý každých 80 nm a majú šírku od 8 do 20 nm (Crowther a Wischik, 1985; Probst a kol., 1991). Rovné vlákna netvoria helixy. Aj párové špirálové vlákna aj rovné vlákna sú zložené hlavne z abnormálne fosforylovaného tau (Crowther, 1991; Kondo a kol., 1988; Lee a kol., 1991).

Analýzou párových špirálových vlákien SDS polyakrylamidovou elektroforézou sa zistilo, že sú zložené z troch hlavných foriem 60, 64, 68 kDa a štvtej menej zastúpenej 72 kDa formy. Po defosforylácii sa zobrazilo 6 foriem korešpondujúcich so šiestimi izoformami tau z dospelého mozgu (Greenberg a Davis, 1990; Lee a kol., 1991). Mnohé štúdie sa zamerali na identifikáciu, ktoré izoformy tau tvoria jednotlivé formy párových špirálových vlákien. Zistilo sa, že 60 kDa forma je zložená z najkratšej izoformy (352) hyperfosforylovaného tau a 72 kDa forma z najdlhšej izoformy tau (441). Forma 64 kDa sa skladá z 3R tau s 381 aminokyselinami a 4R tau s 383 aminokyselinami. 68 kDa forma je zložená z 3R tau so 410 aminokyselinami a 4R tau so 412 aminokyselinami. Chemickými analýzami sa zistilo, že jadro

špirálových vlákien tvoria izoformy tau s 3 tandemovými opakovaniami (Goedert a kol., 1995; Morishima-Kawashima a kol., 1995).

Mutácie v tau sú charakteristické pre autozómovo dominantnú frontotemporálnu demenciu. Predpokladá sa, že mutácie v exóne 9, 10, 11 znižujú stabilitu tau a redukovávajú jeho schopnosť viazať mikrotubuly.

2.6 Apolipoproteín E

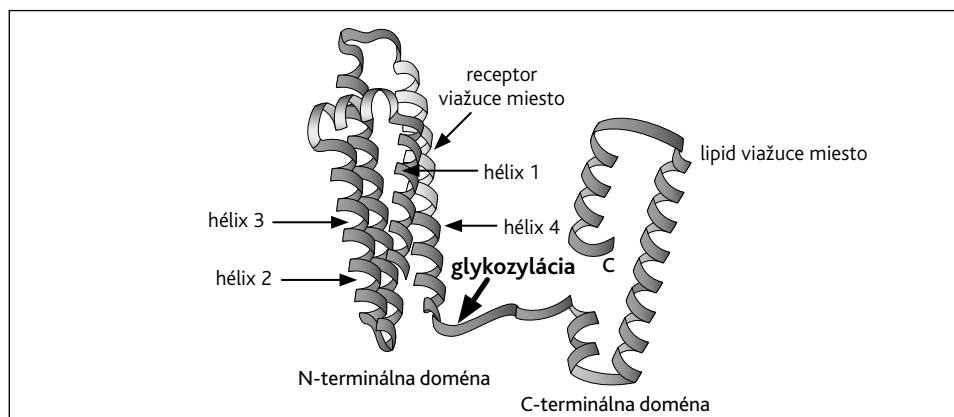
Genetickou väzbovou analýzou v rodinách so sporadickou alebo familiárnou AD s neskorým nástupom bol identifikovaný hlavný kandidátny gén pre apolipoproteín E na lokuse na chromozóme 19 (Pericak-Vance a kol., 1991).

2.6.1 Štruktúra a expresia ApoE

Gén pre apoE je lokalizovaný na chromozóme 19q13. Obsahuje 3,7 kb genómovej DNA a je zložený zo 4 exónov. Kóduje plazmatický glykoproteín s 299 aminokyselinami a molekulovou hmotnosťou 34 kDa (Mahley, 1988). Proteín je zložený z dvoch štruktúrnych domén. Aminoterminálna doména (1-191amk) je stabilná globulárna štruktúra, a obsahuje miesto viažuce sa na LDL receptor (136-150). Karboxyterminálna doména (216-299) je menej stabilná a obsahuje miesto viažuce lipidy (240-270). Sekundárna štruktúra je tvorená prevažne z α -hélixov (62%), z β -skladaného listu a β -otáčok (Mahley, 1988; Wiesgraber, 1994; Wiesgraber a kol., 1994) (obrázok 11).

ApoE je exprimovaný v mnohých typoch buniek v rôznych tkanivách. Väčšina apoE je syntetizovaná v pečeni. Taktiež je syntetizovaná bunkami nervového systému. V periférnom nervovom systéme sa tvorí v gliálnych bunkách, ktoré obklopujú senzorické a motorické neuróny, v nemyelizovaných Schwanových bunkách a v makrofágoch. V CNS je produkovaný hlavne v astrocytoch, ale taktiež v kortikálnych a hippocampálnych neurónoch. Syntéza apoE sa identifikovala aj v pľúcach, obličkách, vaječníkoch a svaloch (Siest a kol., 1995).

Obrázok 11. Štruktúra apolipoproteínu E

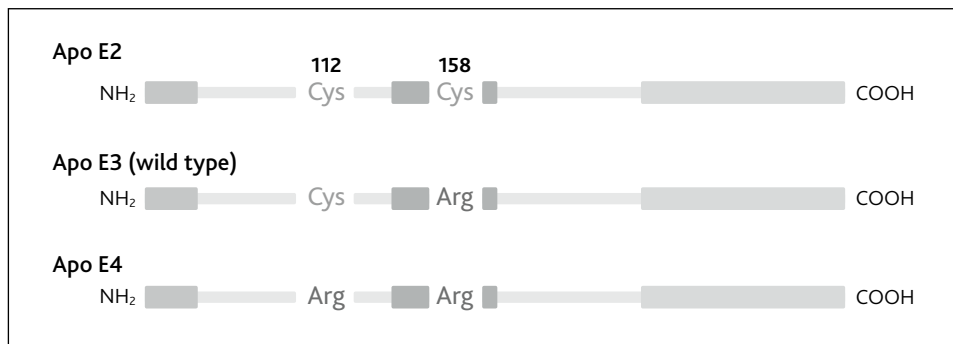


2.6.2 Polymorfizmy apoE

ApoE je polymorfný proteín vyskytujúci sa v troch rôznych izoformách E2, E3, E4 (*Poirier, 1996; Poirier a kol., 1993; Roses, 1996*). Sú exprimované z jedného lokusu s tromi alelami (e2, e3, e4) za vzniku troch homozygotných fenotypov (E2/E2, E4/E4, E3/E3) a troch heterozygotných fenotypov (E3/E2, E4/E2, E4/E3). Isoformy sa odlišujú v aminokyselinovej sekvencii na dvoch miestach. Najčastejšia varianta E3 s prítomnosťou cysteínu v kodóne 112 a arginínu v kodóne 158 sa vyskytuje približne u 75% kaukazoidnej populácie. Druhá varianta E4 má v pozícii 112 a 158 arginín a je zastúpená u 15% Kaukazoidnej populácie. Tretia varianta E2 má v pozícii 112 a 158 cysteín a je zastúpená u 10% Kaukazoidnej populácie (obrázok 12) (*Poirier a kol., 1993*). Analýzou alelovej distribúcie apoE v rôznych populáciách sa zistilo, že alela e3 je celkovo najfrekventovanejšia.

Asociácia medzi e4 alelou a AD bola potvrdená v mnohých štúdiách. Analýzou polymorfizmov v kontrolnej populácii a u pacientov s AD, sa u pacientov s AD zistila zvýšená frekvencia e4 alely a znížená frekvencia e2 alely (*Corder a kol., 1994; Saunders a kol., 1993*). Predpokladá sa, že prítomnosť jednej e4 alely zvyšuje riziko na AD trojnásobne a prítomnosť oboch alel až pätnásťnásobne v porovnaní s kontrolou (*Farrer a kol., 1997*).

Obrázok 12. Isoformy ApoE



2.6.3 Funkcia apoE

Apolipoproteín E je súčasťou metabolismu lipidov. Viaže sa s lipidmi a tvorí lipoproteíny. Syntetizovaný v pečeni sa stáva súčasťou VLDL a má úlohu v transporte triglyceridov do pečene. Taktiež je inkorporovaný do HDL a má význam v distribúcii cholesterolu. Napomáha odstraňovať cholesterol z plazmy a cerebrálnemu moku. Ak je súčasťou chylomikrónov transportuje triacylglyceroly a cholesterol. Sprostredkuje väzbu apoE lipoproteínov k LDL receptorom, čím zabezpečí príjem lipidov do bunky. Podieľa sa aj na transporte fosfolipidov a cholesteryl esterov (*Beffert a kol., 1998; Mahley a kol., 1988*).

ApoE má významnú funkciu aj v CNS. Podieľa sa na mobilizácii a redistribúcii cholesterolu počas rastu nervov, oprave, myelinizácii, prestavbe membrány, axonálnej regenerácii počas

vývinu a po poranení. Taktiež má úlohu v synaptickej plasticite, imunoregulácii a aktivácii lipolických enzýmov (Beffert a kol., 1998; Blennow a kol., 1994; Poirier, 1994, 1996).

Veľké množstvo lipidov sa uvoľní v prípade poškodenia alebo degenerácie membrány alebo myelínu v nervových bunkách. Astrocyty v CNS a makrofágy v PNS slúžia na syntézu a uvoľnenie apoE, ktorý vychytá cholesterol a fosfolipidy. Časť cholesterolu vytvoreného počas tohto procesu je uskladnená v astrocytoch a makrofágoch vo forme cholesterylesterov, ktoré sa využijú v prípade ďalšej regenerácie. V neurónoch sa zvyšuje expresia LDL receptorov. ApoE v komplexe s cholesterolom sa viaže na LDL receptor. Komplex je degradovaný a cholesterol sa uvoľní a využije sa v oprave a vývine dendritov a pri proliferácii synapsí (Beffert a kol., 1998; Blennow a kol., 1994; Ignatius a kol., 1986; Poirier, 1994, 1996).

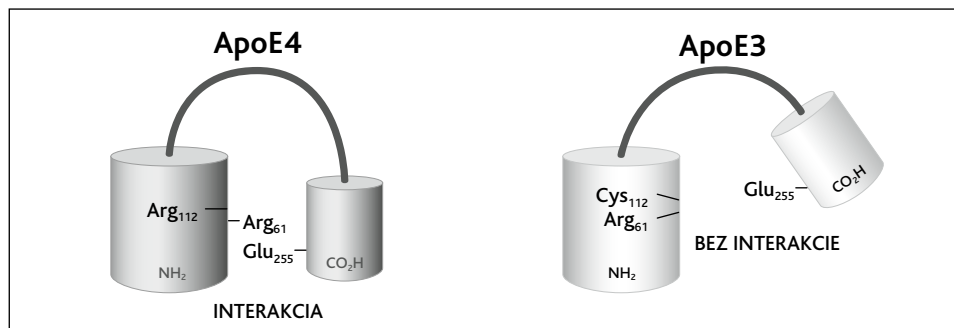
2.6.4 Neuropatológia apoE

Úloha ApoE v neuropatológii Alzheimerovej choroby sa zistila zo štúdií na transgénnych myšiach, ktoré exprimovali ľudské apoE4 a APP. Myši mali výrazne fosforylovaný tau, disrupciu cytoskeletu v neuróne, stratu synapto-dendritických konexíí, senilné plaky, poruchu učenia a pamäte (Holtzman a kol., 2000; Tesseur a kol., 2000a, b). Výrazne narušená regenerácia nervov a synapto-dendritických spojov a neuritické plaky sa našli aj v mozgu AD pacientov (Huang a kol., 2004). Porušenie v oprave a regenerácii nervov u AD pacientov súvisí s tým, že apoE4 je menej efektívnejší v regenerácii nervov po poranení a taktiež menej stimuluje rast nervov v porovnaní s apoE3 a apoE2.

Odlíšnosti medzi apoE3 a apoE4 vyplývajú z odlišnej štruktúry. V apoE4 je interakcia medzi aminoterminálnou a karboxyterminálnou doménou (obrázok 13). Interakcia nastáva medzi Arg-61 v aminoterminálnej doméne a Glu-255 v karboxyterminálnej doméne (Dong a Weisgraber, 1996; Dong a kol., 1994). Predpokladá sa, že v dôsledku prítomnosti arginínu v polohe 112 u apoE4 je Arg-61 orientovaný smerom od helixu, čím sa umožní jeho interakcia s Glu-255. Táto interakcia nenastáva u apoE3 a apoE2. Daná interakcia medzi doménami výrazne znižuje stabilitu apoE4. Je to najmenej stabilná izoforma (apoE4>apoE3>apoE2). Doménová interakcia sa podieľa na mnohých patologických procesoch apoE4 (Mahley a Huang, 2006).

Obrázok 13. Interakcia medzi Arg 61 a Glu 255 v apoE4

Táto interakcia nie je u apoE3 (Mahley a kol., 2006)



ApoE4 izoforma sa viaže na A β peptid s výrazne vyššou afinitou ako E3 a E2. Interakciou apoE4 s A β sa zníži degradácia a zvýši akumulácia a ukladanie A β , čím následne nastáva tvorba amyloidových plakov. Je niekoľko dôkazov, ktoré nasvedčujú vplyv E4 izoformy na produkciu a štiepenie A β . Pacienti s AD s genotypom E4/E4 mali viac amyloidových plakov v porovnaní s heterozygotmi E4, ktorí mali viac plakov v porovnaní s jedincami bez e4 alely. Transgénne myši s expresiou *APP* a bez *apoE* génu mali výrazne redukované amyloidové plaky v porovnaní s myšami s *apoE* génom (Catano a kol., 1995; Sanana a kol., 1994; Wisniewski a kol., 1993). Zistilo sa, že schopnosť viazať A β súvisí so štruktúrou E4 izoformy. Po porušení doménovej interakcie sa inhibovala väzba apoE4 na A β (Ye a kol., 2005).

ApoE4 spolu s A β indukuje uvoľnenie obsahu lyzozómov a následnú apoptózu neurónov. Nestabilný apoE4 tvorí rôzne reaktívne intermediáty s kyslým pH, čo vedie k destabilizácii membrány lyzozómov (Ji a kol., 2002).

ApoE syntetizovaný v neurónoch je štiepený na fragmenty špecifickou serín proteázou. ApoE4 je najviac náchylný na proteolýzu. Narušením interakcie domén sa naruší aj proteolýza. Štiepený apoE nie je schopný plniť svoju funkciu v regenerácii nervov po poškodení a niektoré fragmenty majú aj neurotoxický účinok. V mozgu AD pacientov a transgénnych myší, ktoré exprimovali apoE4 sa našli 29-30 kDa fragment (1-272), ktorému chýbalo 27 amk z C-terminálnej domény a 15-20 kDa fragment (127-272) (Brecht a kol., 2004; Harris a kol., 2003; Huang a kol., 2001). Tieto fragmenty sú neurotoxické a vedú k neurodegeneratívnym zmenám v neurónoch v hippokampe a kortikálnych oblastiach. Sú schopné translokácie, mitochondriálnej lokalizácie, väzby na fosforylovaný tau a na A β . Fragmenty apoE4 interagujú s cytoskeletom a vedú k jeho rozkladu.

Mitochondriálna dysfunkcia je popísaná u mnohých AD pacientov s apoE4 (Brecht a kol., 2004; Chang a kol., 2005). Oblasť viažuca sa na mitochondrie sa nachádza v regióne viažucom lipid. Porušenie elektropotenciálu mitochondrie v dôsledku apoE4 fragmentov v kultivovaných neurónoch má vplyv na funkciu neurónov, pretože mitochondria má významnú úlohu v synaptogenéze a apoE4 expresia vedie k strate synapto-dendritických konexií (Buttini a kol., 1999; Chang a kol., 2005). ApoE4 fragmenty vyvolávajú aj mitochondriálnu apoptózu, zatiaľ čo apoE3 chráni bunku pred apoptózou a má antioxidantný účinok (Ji a kol., 2002). ApoE4 fragmenty narušajú aj mitochondriálnu reguláciu energie a glukózy v neurónoch. Zistila sa redukovaná utilizácia glukózy v neurónoch u pacientov s AD a E4 izoformou (Reiman a kol., 2004; Small a kol., 2000).

ApoE má vplyv aj na fosforyláciu a agregáciu tau. ApoE3 sa viaže na nefosforylovaný tau, chráni ho pred fosforyláciou a tvorbou neurofibrilárnych spleťí. ApoE4 sa neviaže na nefosforylovaný tau. Ale apoE4 fragmenty výrazne stimulujú tau fosforyláciu, tvorbu spleťí a disrupciu cytoskeletu (Strittmatter a kol., 1994).

Hlavnými neuropatologickými mechanizmy apoE4 sú interakcia s A β , čím sa zníži degradácia a zvýši ukladanie A β a tvorba plakov, narušená reparácia a rast neurónov, neurodegenerácia, apoptóza, apoE4 fragmenty majú neurotoxický vplyv na mitochondrie, cytoskelet a indukciu fosforylácie tau (Mahley a kol., 2006).

Zatiaľ čo e4 alela zvyšuje riziko na AD, predpokladá sa, že e2 alela je protektívna. Má však nízku afinitu k LDL receptorom, čo je spojené so zvýšeným rizikom na hyperlipoproteinémiu III (Rebeck a kol., 2002; Sullivan a kol., 1998).

2.7 Patogenéza Alzheimerovej choroby

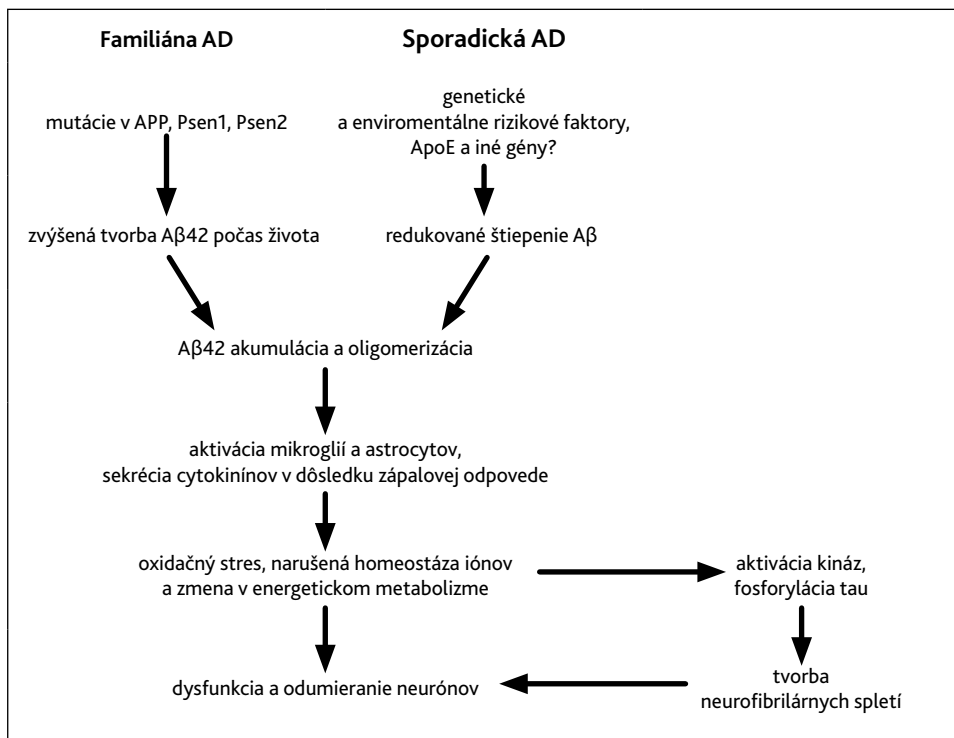
Medzi základné neuropatologické črty AD patria extracelulárne amyloidové plaky, ktorých jadro tvorí amyloidový β peptid o dĺžke 39–43 amk obklopený dystrofickými axónmi, dendritmi, reaktívnymi astrocytmi a aktivovanými mikrogliami. Taktiež významnou črtou sú párové špirálové vlákna a neurofibrilárne splete tvorené hyperfosforylovaným proteínom tau (Glennier a kol., 1984; Grundke-Iqbal a kol., 1988; Hardy a Allsop, 1991; Masters a Beyreuther, 2005; Selkoe, 1989; Selkoe 2001b).

2.7.1 β Amyloidová teória

Mnoho teórií bolo počas rokov sformulovaných na vysvetlenie molekulárnych mechanizmov vedúcich k patogenéze AD. A β kaskádová teória je v súčasnosti najpravdepodobnejšia, pretože najlepšie vysvetľuje bunkové, molekulárne a funkčné procesy charakteristické pre AD (Hardy a Selkoe, 2002).

Iniciálnou udalosťou v A β teórii je nevyváženosť medzi tvorbou a štiepením A β . Kedy v prípade familiárnej formy je zvýšená produkcia A β a v sporadickej forme znížené štiepenie A β . Za zvýšenú tvorbu A β 42 pri familiárnej forme sú zodpovedné mutácie v *APP*, *psen1* a *psen2*. Kritickou udalosťou v patogenéze je zhlukovanie A β . Solubilný A β sa zhlukuje do rozpustných oligomérov, následne do protofibríl až sa tvoria nerozpustné fibrily a plaky. A β 42 sa pokladá za najviac neurotoxický a náchylnejší k tvorbe fibríl ako iné A β . Predpokladá sa, že A β peptid začína svoj neurotoxický efekt už vo forme solubilných oligomérov a nie vo forme nerozpustných fibríl (Walsh a kol., 2002). Následne sa spúšťa kaskáda procesov, ktoré zahŕňajú aktiváciu astrocytov a mikroglií, sekréciu cytokínínov v dôsledku zápalovej odpovede, narušenie homeostázy iónov, tvorbu voľných radikálov, oxidačný stres a ním aktivované kinázy a akumulácia vápnika v bunke. Procesy vedú k zníženiu fluidity membrán, synaptickej a neurónovej dysfunkcii a k smrti neurónom, čo sa klinicky manifestuje stratou kognitívnych funkcií (obrázok 14). Okrem samotných A β oligomérov, cytotoxický efekt sa zistil aj účinkom CT fragmentov APP (Butterfield a Boyd-Kimball, 2004; Hardy a Selkoe, 2002; Masters a Beyreuther, 2005; Selkoe 2001b). Amyloidová patológia začína v izokortexe a s progresiou ochorenia sa šíri do archikortexu a hippocampálnej formácie.

Obrázok 14. Amyloidová kaskádová hypotéza (Hardy a Selkoe, 2002)



2.7.1.1 Oxidačný stres

Oxidačný stres v mozgu v dôsledku tvorby voľných radikálov vedie k oxidatívnejmu poškodeniu tkanív. Vznikajú vysokoreaktívne kyslíkové substráty ako superoxid, peroxid, hydrogén peroxid, aldehydy, ketóny, alkoholy a cholesterol oxidy, ktoré poškadzujú DNA a génovú expresiu. Zvyšujú sa oxidatívne modifikácie proteínov, ako glykácia produktov a zvýšená peroxidácia membránových lipidov. Radikály sú pre bunku toxické, v dôsledku straty membránovej integrity a peroxidácie membrán. Nastáva inhibícia neurónovej glukózy, glutamátových transportérov, Na-K ATPázy, aktivácia kináz, dysregulácia homeostázy vápnika, nastáva intracelulárne hromadenie vápnika, porucha signalizácie, aktivujú sa mnohé transkripčné faktory a indukuje sa apoptóza. Dané procesy vedú k smrti neurónov v dôsledku bunkovej dysfunkcie (Barnham a kol., 2004; Butterfield a Boyd-Kimball, 2004; Butterfield a kol., 2001; Good a kol., 1996; Mark a kol., 1996; Schippling a kol., 2000; Smith a kol., 1998). Taktiež vznikajú reaktívne dusíkové substráty. NO interaguje so superoxid aniónom za vzniku peroxynitritu a indukuje oxidačný stres, vedie k peroxidácii membrán a k apoptóze bunky (Law a kol., 2001).

2.7.1.2 Zápalová odpoveď

Reaktívne astrocyty a aktivované mikroglie obklopujúce neuropatické plaky sú typické pre mozog AD pacientov a sú výsledkom zápalovej odpovede. Astrocyty a mikroglie sú aktivované A β oligomérmi a fibrilárnymi a inými komponentami. Aktivované mikroglie produkujú rôzne chemotaktické faktory, ktoré aktivujú vedľajšie signálne proteíny a dráhy s cytotoxickým účinkom (Meda a kol., 1995; Rogers a kol., 1992). Vznikajúce proteíny sa stávajú súčasťou A β fibríl. Počas zápalovej odpovede sa produkujú interleukín 1b, interleukín 6 a TNF- α (Griffin a kol., 1989). Cytokiníny sprostredkujú expresiu NO syntázy a NADPH oxidázy, čo vedie k tvorbe NO a následnej tvorbe peroxynitritu. Taktiež sa popisuje aj aktivácia MAP kinázy.

2.7.1.3 Porucha energetického metabolizmu

V dôsledku oxidatívneho poškodenia lipidov a proteínov membrán, ktoré sa stávajú súčasťou amyloidových agregátov, je neurón priamo vystavený A β plakom a oxidatívne účinku. Výrazne sa zníži aktivita komplexu IV, cytochróm c oxidázového komplexu, čím opäť vznikajú vysokoreaktívne kyslíkové substráty a vplývajú na tvorbu A β agregátov. Nastáva depolarizácia mitochondriálnej membrány a kolaps membránového potenciálu, čím sa uvoľní cytochróm c a spúšťa sa apoptotická dráha aktiváciou kaspázy 3. Mitochondriálna membrána a DNA sú poškodené (Cadenas a Davies, 2000; Brown a Bal-Price, 2003; Byrne, 2002; Kruman a Mattson, 1999).

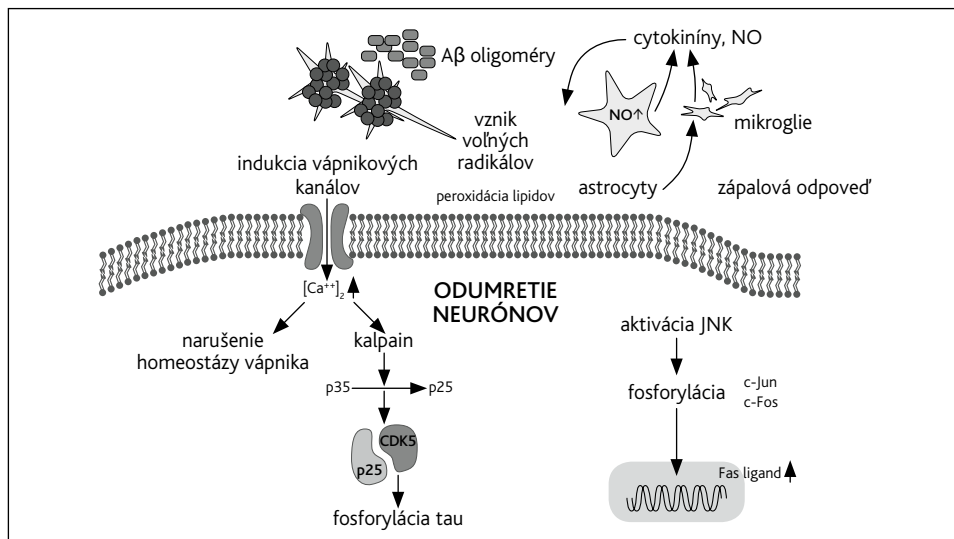
2.7.1.4 Narušená homeostáza vápnika a kovov

Vápnik je esenciálny pre vývin neurónov, synaptickú plasticitu a transmisiu a reguláciu mnohých procesov. Porucha homeostázy vápnika nastáva v dôsledku indukcie tvorby vápnikových a iónových kanálov. Výrazne sa zvýši vstup vápnika do bunky, čím sa spúšťajú cytotoxické procesy (MacManus a kol., 2000; Mattson a Chan, 2001).

Tvorba vysokoreaktívnych kyslíkových substrátov vyžaduje reakciu s kovmi ako meď alebo železo. A β je metaloproteín s vysokou afinitou k Cu, Fe a Zn. Keď interaguje s danými kovmi dochádza ku rôznym chemickým reakciám. Zvýšené koncentrácie Cu, Fe a Zn sa zistili v mozgu AD pacientov. Kovы indukujú zhľukovanie (Bush, 2003; Bush a kol., 2003).

2.7.1.5 Aktivácia signálnych dráh

A β fibrily aktivujú MAP kinázu, ktorá participuje v mnohých procesoch ako aj vo fosforylácii tau. Taktiež sa v dôsledku vstupu vápnika aktivuje kalpain kináza, ktorá aktivuje cdk5 kinázu, čo opäť vedie k hyperfosforylácii tau. V neurónoch sa aktivuje JNK, ktorá fosforyluje a aktivuje transkripčný faktor c-Jun, ktorý stimuluje transkripciu mnohých cieľových génov ako aj induktoru apoptózy Fas ligandu, ktorý sa viaže na svoj receptor a indukuje kaskádu vedúcu k aktivácii kaspázy (Lee a kol., 2000; Morishima a kol., 2001).

Obrázok 15. Neurotoxický efekt A β (Suh a Checler, 2002)

2.7.2 Tau proteínová teória

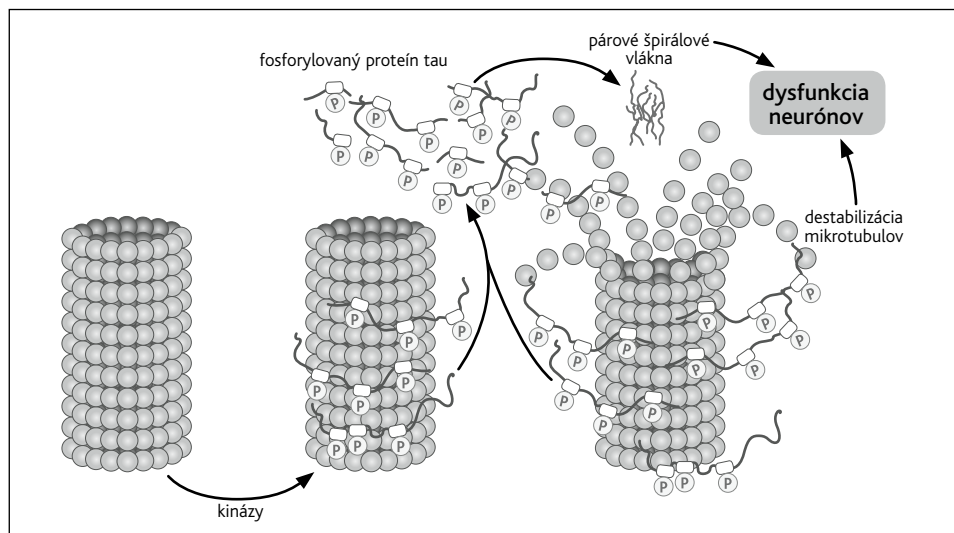
Tau je fosfoproteín, ktorého de/fosforylácia je regulovaná fosfatázami a kinázami. Abnormálna fosforylácia tau vedie k jeho disociácii z mikrotubulov, čím nastáva ich rozpad. Hyperfosforylovaný tau nie je schopný plniť svoju funkciu a začína jeho zhľukovanie do párových špirálových vlákien a následne do neurofibrilárnych spleť. Nefungujúci cytoskelet a mikrotubulárna sieť vedie k poruche axonálneho transportu. Nahromadený hyperfosforylovaný tau je nedegradovateľný enzýmami a je toxický pre neurón. Jednotlivé procesy vedú k odumretiu neurónu a ku klinickým prejavom kognitívneho deficitu (obrázok 16) (Iqbal a kol., 2005; Spillantini a Goedert, 1998).

K masívnej fosforylácii dochádza v dôsledku aktivácie kináz, ktoré sú aktivované oxidačným prostredím (MAPK, GSK-3, PKA, Cdk5) (Buée a kol., 2000; Lee a kol., 2000). Cdk5 kináza je v komplexe s p35 neurón špecifickým aktivátorom. Proteolytickým štiepením p35 kalpainom vzniká p25. Cdk5/p25 výrazne fosforyluje tau. Predpokladá sa, že fosforylácia na Ser/Thr-Pro motívoch redukuje schopnosť tau viazať mikrotubuly (Baudier a kol., 1987; Bauman a kol., 1993; Drechsel a kol., 1992; Drewes a kol., 1997; Hanger a kol., 1992). Významné miesta fosforylácie tau, čo vedie k redukcii väzby na mikrotubuly a k zhľukovaniu tau sú Ser 262, Ser 293, Ser 324, Ser 356 (Drechsel a kol., 1992; Biernat a kol., 1993). V dôsledku vysokoreaktívnych kyslíkových substrátov dochádza aj k glykozylácii tau, čím sa tiež redukuje väzba na mikrotubuly (Mandelkow a kol., 1995).

Popisuje sa niekoľko štádií ako sa začína a šíri formácia neurofibrilárnych spleť v neuróne. Prvé lézie sa objavujú v transentoriálnom kortexe, čo sa definuje ako štádium I. V štádiu II sa NFS nachádzajú aj v entorinálnom kortexe. Počas prvých dvoch štádií nedochádza ku klinickej

manifestácii. V štádiu III a IV sa lézie rozširujú do hippocampu. V daných štádiách sa popisuje mierny kognitívny deficit. V štádiách V a VI sa lézie rozširujú aj do izokortikálnych oblastí, najskôr sú postihnuté asociačné arey, neskôr motorické a najneskôr primárne senzorické. Tieto štádiá sú asociované s dementným syndrómom (*Braak a Braak, 1991; Price a kol., 1991*).

Obrázok 16. Tau proteínová teória



2.8 Diagnostika

- Anamnéza
- Klinické vyšetrenie
- Neurologické vyšetrenie
- Psychologické vyšetrenie
- Zobrazovacie metódy
- Genetické vyšetrenie

Pacient s podozrením na AD by mal byť odporučný k špecialistovi – neurológovi alebo psychiatrovi. Diagnostická škála by mala zahŕňať podrobnú anamnézu – pokiaľ je možné odoberanú od pacienta a doplnenú údajmi od príbuzných. V anamnéze je dôležité sa zamerať na začiatok prvých príznakov (náhly alebo postupný), priebeh (pozvoľný alebo skokovitý), progresiu príznakov (v úvode poruchy izolované na novopamäť s postupnou progresiou na ostatné zložky pamäte alebo celková oploštenosť psychiky). Ďalej sa treba zamerať na neuropsychiatrické sprievodné príznaky (halucinácie, bludy, apatia, depresia, úzkosť, podráždenosť, agresivita, zmena stravovacích návykov, zmena rytmu spánku a bdenia) a v neposlednom rade na aktivity denného života. V neurologickom vyšetrení sa zameriava na posúdenie orientá-

cie (MMSE test) a neurologické rutinné vyšetrenie. Vhodné je doplnenie psychologického vyšetrenia so zameraním sa na posúdenie organického úbytku kognitívnych funkcií psychológom. Zobrazovacie metódy sú výrazným prínosom v diagnostike neurodegeneratívnych ochorení. Realizuje sa CT a MR mozgu. CT mozgu má pri AD len orientačný význam. Slúži na vylúčenie iných ložiskových zmien, posúdenie atrofie a drobných ischemických ložísk. Detailnejšiu informáciu o stave mozgového parenchýmu poskytuje MR vyšetrenie. Pre čistú Alzheimerovu chorobu sú charakteristické minimálne hyperintenzitné zmeny, dominuje atrofia mozgu s temporálnou a hlavne hippocampálnou predilekciou. Na potvrdenie diagnózy AD v počiatočných štádiách neexistuje žiadne jednoznačné kritérium v MR obraze. Väčšiu hodnotu ako MR vyšetrenie má pri potvrdzovaní AD posúdenie úbytku mozgovej hmoty v čase na základe volumetrických štúdií MR. Daná metóda umožní percentuálne vyčíslenie úbytku mozgovej hmoty v čase. Realizuje sa prostredníctvom dvoch vyšetrení s odstupom 12 mesiacov a posudzuje sa ročný úbytok mozgového tkaniva. Používa sa buď štandardná volumetria alebo presnejšia metóda volumetria na podklade VBM (Voxel Based Morphometry). U pacientov s AD je priemerný ročný úbytok 2,37%, u pacientov s miernym kognitívnym deficitom je to 1,37% a u kontrol je to 0,41% (Fox a Schott, 2004). Na diagnostiku AD sa používajú diagnostické kritériá podľa DSM-IV a NINCDS-ADRDA.

Významný prínos v diagnostike AD majú genetické testy. Pri sporadických formách, teda u pacientov s neskorým nástupom ochorenia sa vykonáva genotypizácia apolipoproteínu E. U pacientov so skorým nástupom ochorenia (pred 60 rokom) sa vykonáva molekulárno-genetická analýza kandidátnych génov, ktorá je veľmi významná nielen pri diagnostike postihnutých jedincov, ale zahŕňa aj identifikáciu patologickej mutácie, určenie nositeľov mutantnej alely, segregáciu alely z rodičov na potomstvo a následné zostavenie rodokmeňa. Napriek náročným diagnostickým metódam, diagnostika AD *in vivo* nie je spoľahlivo vypracovaná s výnimkou familiárnych foriem. Až post mortem histopatologické vyšetrenie s detekciou neurofibrilárnych spleťí a senilných plakov môže definitívne potvrdiť diagnózu AD a vylúčiť iný typ demencie.

2.8.1 Identifikácia apoE izoforiem pomocou polymorfizmu dĺžky restriktčných fragmentov (PCR-RFLP)

Jednotlivé apoE izoformy sa identifikujú pomocou restriktčnej analýzy (PCR-RFLP) využitím restriktčnej endonukleázy *HhaI*. PCR – RFLP sa stala štandardnou metódou pri vyšetrovaní genotypu apoE. Restriktčné endonukleázy (restriktázy) majú významné postavenie v DNA diagnostike mnohých dedičných ochorení. Restriktázy sú v bakteriálnych bunkách súčasťou restriktčno – modifikačného systému, ktorý chráni bunku pred vstupom cudzorodej DNA, najčastejšie vírusového pôvodu. Restriktázy štiepia DNA v špecifických miestach. Rozpoznávacie miesta restriktáz pozostávajú zo štyroch až ôsmich nukleotidov. Každá restriktáza má svoj kód, ktorý je určený na základe dohodnutej nomenklatúry zohľadňujúcej rodový a druhový názov organizmu, kmeň mikroorganizmu a taktiež R-M systém v prípade ak existuje viacero systémov v bunke. *HhaI* je restriktáza produkovaná baktériou *Haemophilus haemolyticus*, kmeň a a predstavuje R-M I systém. Prítomnosť špecifických restriktčných miest možno využiť na rýchlu, veľmi jednoduchú a presnú identifikáciu izoforiem apoE. Varianty apoE sa

odlišujú v aminokyselinovej sekvencii na dvoch miestach. Varianta E3 má cysteín v kodóne 112 a arginín v kodóne 158. Varianta E4 má v pozícii 112 a 158 arginín. Varianta E2 má v pozícii 112 a 158 cysteín. V dôsledku odlišného aminokyselinového zloženia, sa varianty líšia aj v štiepných miestach, ktoré rozpoznáva restriktáza *HhaI* (rozpoznáva arginín) a preto po poštiepení vznikajú odlišné veľkosti fragmentov u jednotlivých izoforiem apoE (obrázok 17).

Polymorfizmy v ApoE:

E2: NH₂-----Cys₁₁₂-----Cys₁₅₈-----COOH

E3: NH₂-----Cys₁₁₂-----Arg₁₅₈-----COOH

E4: NH₂-----Arg₁₁₂-----Arg₁₅₈-----COOH

2.8.2 Molekulárno-genetická analýza kandidátnych génov

Molekulárna analýza je zameraná na detekciu mutácií v kandidátnych génoch pomocou sekvenačnej analýzy. Sekvenovanie je v súčasnosti rýchlym a spoľahlivým spôsobom na presnú identifikáciu mutácií. Sekvenačná analýza zahŕňa analýzu exónov 16 a 17 pri géne *APP*, 10 exónov *psen1* génu, 10 exónov *psen2* génu a exónov 9, 10, 11 pri géne *tau*. Samotnej sekvenačnej analýze predchádza PCR (polymerase chain reaction). PCR je metóda umožňujúca efektívne namnoženie špecifických úsekov DNA ohraničených dvomi nukleotidovými primermi v podmienkach *in vitro*, využívajúca schopnosť DNA polymerázy syntetizovať komplementárne vlákno podľa jednovláknového templátu. Pod pojmom sekvenovanie DNA rozumieme určenie primárnej štruktúry, t.j. určenie poradia nukleotidov v reťazci DNA (sekvencie DNA). Sekvenačná reakcia obsahuje zložky nevyhnutné pre syntézu nového vlákna DNA: templát (DNA, ktorú sekvenujeme), primer (krátky oligonukleotid komplementárny k DNA templátu v mieste začiatku čítania sekvencie), termostabilnú Taq DNA polymerázu, dNTP a ddNTP dideoxy-nukleotidy (2',3'-dideoxyribonukleozidtrifosfáty. Tie sa od štandardných deoxy-nukleotidov (2'-deoxyribonukleozidtrifosfátov, dNTP) odlišujú tým, že sa môžu pripojiť do novovznikajúceho vlákna DNA na základe párovania báz (pretože majú funkčný 5'-koniec), ale po ich zabudovaní do DNA sa rast reťazca zastaví (nie je prítomný funkčný 3'-koniec). Každý typ ddNTP je označený iným fluorescenčným farbivom (Dye-Terminator). Malé množstvo ddNTP spôsobí, že dochádza v prvom rade k začleňovaniu štandardných dNTP a len výnimočne ddNTP, ktorými sa zastavuje syntéza DNA reťazca. V konečnom dôsledku vznikne v skúmavke populácia rôzne veľkých DNA fragmentov zakončených konkrétnym ddNTP. Sekvenovanie prebieha v automatickom sekvenátore. Detekcia fluorescence farbičiek prebieha po ich excitácii laserovým žiarením následným zosnímaním farbičkou emitovaného žiarenia CCD kamerou a softvérovým spracovaním elektroforetogramu. Separácia fragmentov prebieha kapilárnou elektroforézou v lineárnych tekutých polyméroch.

3. CIELE

Alzheimerova choroba vzhľadom na svoju vysokú prevalenciu a nezvratný priebeh predstavuje závažný medicínsky a socio-ekonomický problém. Zvýšenie strednej dĺžky života v ekonomicky vyspelých krajinách prináša aj sprievodný jav ako je nárast pacientov s demenciou. V súčasnosti nie sú k dispozícii relevantné údaje o prevalencii Alzheimerovej choroby na Slovensku. Hoci etiopatogenéza AD, napriek intenzívnemu výskumu, nie je spoľahlivo objasnená, bežne sa akceptuje úloha genetických rizikových faktorov pri familiárnej aj sporadickej forme. Bolo identifikovaných niekoľko génov, ktorých mutácie vedú k vzniku familiárnej Alzheimerovej choroby a nimi kódované produkty sa zúčastňujú v patogenéze AD. Našla sa priama asociácia medzi FAD a mutáciami v génoch pre amyloidový prekursorový proteín, presenilín 1 a presenilín 2. Významné postavenie v patogenéze FAD má proteín tau. Pri sporadickej AD jednoznačne preukázané rizikové faktory sú vek, rodinná anamnéza a významný genetický rizikový determinant – apolipoproteín E.

Cieľom predkladanej práce je štúdium genetických rizikových faktorov, ktoré majú úlohu v patogenéze AD v SR. Určiť frekvenciu definovaného rizikového genetického determinantu apoE e4 alely v kontrolnom súbore a v súbore pacientov s AD. Uskutočniť genetickú analýzu zameranú na identifikáciu mutácií v génoch pre amyloidový prekursorový proteín, presenilín 1, presenilín 2 a tau.

Ciele:

1. Určiť frekvenciu alely e4 apolipoproteínu E na kontrolnej vzorke zdravých jedincov a v súbore pacientov so sporadickým a familiárnym výskytom Alzheimerovej choroby.
2. Štandardizácia molekulárno – genetických metód na analýzu génov *APP*, *pSEN 1*, *pSEN 2* a *tau*.

Zahrňa optimalizáciu podmienok pre polymerázovú reťazovú reakciu a sekvenačnú analýzu génov na kontrolnom súbore pacientov.

3. Identifikácia mutácií v cieľových génoch u pacientov s AD pomocou sekvenačnej analýzy.

V prípade identifikácie mutácie u pacienta s AD uskutočniť genetickú analýzu aj u rodinných príslušníkov a určiť tak nosičov patologickej mutácie v presymptomatickom štádiu, zostaviť rodokmeň a sledovať spôsob dedičnosti.

4. Zistiť zastúpenie mutácií v súbore slovenských pacientov s AD a porovnať výsledky s údajmi z iných krajín.

4. MATERIÁL A METÓDY

4.1 MATERIÁL

4.1.1 Výber vzoriek

Vyšetrovaný súbor tvorili pacienti, u ktorých bola klinicky stanovená diagnóza Alzheimerovej choroby. Vyšetrenia pacientov s AD vykonávali lekári špecializovaní na problematiku demencií z I. Neurologickej kliniky LFUK a UN Bratislava a na diagnostiku AD sa použili diagnostické kritériá podľa DSM-IV a NINCDS-ADRDA. Pacienti pochádzali zo všetkých regiónov Slovenska. Krv pacientov bola dodaná na DNA vyšetrenie Alzheimerovej choroby na Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK a UN Bratislava. Vzorky krvi na DNA analýzu boli zaslané v skúmavkách s EDTA. Genómová DNA bola izolovaná z leukocytov periférnej krvi a uskladnená pri -70°C .

Súbor pacientov tvorilo 58 pacientov s AD, z toho bolo 27 mužov a 31 žien. Pacientov sme nedelili do kategórie familiárnej a sporadickej formy AD, keďže sme nemali presné údaje o veku nástupu ochorenia a rodinnej anamnéze. U všetkých pacientov s AD sme vykonali genotypizáciu apoE a sekvenčnú analýzu kandidátnych génov. Do analyzovaného súboru sme zaradili aj zdravých jedincov, ktorí tvorili kontrolný súbor na určenie frekvencie apoE genotypov. Kontrolný súbor tvorilo 200 jedincov (100 žien a 100 mužov), ktorí absolvovali preventívne lekárske vyšetrenie.

4.1.2 Chemikálie a roztoky

- agaróza (Merck)
- MetPhor agaróza (Lonza)
- Hi-Di Formamid (APPLIED BIOSYSTEM)
- DMSO-dimetylsulfoxid: Polysciences INC., USA
- Chlorid sodný (NaCl): Merck
- Elektroforetický TBE tlmivý roztok: 5x
54,0 g Tris-HCl, pH 8
27,5g H_3BO_3
20,0 ml 0,5 mmol/l EDTA
v 1000 ml destilovanej vody
- Elektroforetický TBE tlmivý roztok: 10x
50 ml 5x koncentrovaného elektroforetického TBE tlmivého roztoku
450 ml destilovanej vody
- Elektroforetický TAE tlmivý roztok: 40x
145,37 g Tris (hydroxymethyl) aminomethane
11,16 g $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ v 700 ml vody
34,4 ml Acetic Acid (glacial)
destilovaná voda do 1 l

- **Roztok na riedenie primerov:**
 - 10 mmol/l Tris HCl
 - 1 mmol/l EDTA
- **Zásobný PCR tlmivý roztok pre DNA polymerázu DyNAzyme (FINNZYMES):**
 - 100 mmol/l Tris-HCl, pH 8,8 pri 25°
 - 15 mmol/l MgCl₂
 - 500 mmol/l KCl
 - 1% Triton X-100
- **Zásobný PCR tlmivý roztok pre DNA polymerázu Thermo Start (ABgene)**
 - 100 mmol.l⁻¹ KCl
 - 20 mmol.l⁻¹ Tris-HCl, pH 9.2 pri 25°C
 - 0,1 mmol.l⁻¹ EDTA
 - 1 mmol.l⁻¹ DTT
 - 0,5% Tween® 20
 - 0,5% Nonidet® P40
 - 50% (v/v) Glycerol
- **Zásobný reakčný tlmivý roztok pre FastAP termosenzitívnu alkalickú fosfatázu: 10x (FERMENTAS)**
 - 100 mmol.l⁻¹ Tris-HCl pH 8.0 pri 37°C
 - 50 mmol.l⁻¹ MgCl₂
 - 1 mol.l⁻¹ KCl
 - 0.2% Triton X-100
 - 1 mg/ml BSA
- **Zásobný reakčný tlmivý roztok pre Exonukleázu I (Fermentas)**
 - 670 mmol.l⁻¹ glycine-KOH pH 9.5 pri 25°C
 - 67 mmol.l⁻¹ MgCl₂
 - 10 mmol.l⁻¹ DTT
- **Nanášacia zmes ORANGE G (FERMENTAS):**
 - 10 mmol/l Tris-HCl, pH 7,6
 - 0,15% oranžová G
 - 60% glycerol
 - 60 mmol/l EDTA
- **Nanášacia zmes Mass Ruler (FERMENTAS):**
 - 10 mmol/l Tris-HCl, pH 7,6
 - 0,15% oranžová G
 - 60% glycerol
 - 60 mmol/l EDTA

- **Roztok dNTPs:** 2,5 mmol/l (FERMENTAS)
- **Roztok $MgCl_2$:** 25 mmol/l (FERMENTAS)
- **Vizualizačný roztok Goldview** (BEIJING SBS GENETECH CO)
- **Vizualizačný roztok GelRed Nucleic Acid Gel Stain 10000x:** Biotum
- **Roztok BSA** 1 mg.ml⁻¹ (BioLabs)
- **DNA Marker molekulovej hmotnosti** (100 bp, 50 bp, Mass Ruler) (FERMENTAS)
- **AmpliTaq Gold PCR Master Mix 5 ml (250U)** (Applied Biosystem)
- **DNA polymeráza DyNAzyme 2U/ μ l** (FINNZYMES)
- **DNA polymeráza Thermo Start 5U/ μ l** (ABgene)
- **Restričná endonukleáza *Hha* I:** 20 000 U/ml (New England BioLabs)
- **Tlmivý roztok pre *Hha* I** (New England BioLabs)
- **FastAP termosenzitívna alkalická fosfatáza:** 1U/ μ l (FERMENTAS)
- **Exonukleáza I., *E. coli*:** 20U/ μ l (FERMENTAS)
- **PCR primery** (Merck)
- **Spreadex gel EL 300 mini:** ElchromScientific, Švajčiarsko
- **2% agarózový gél**
 - 1,2 g agarózy Merck
 - 60 ml 0,5 x koncentrovaného TBE tlmivého roztoku
 - 5 μ l roztoku Gold view
- **3,5% MetaPhor agarózový gél**
- **2,1 g Metaphor agarózy**
 - 60 ml 0,5 x koncentrovaného TBE tlmivého roztoku
 - 6 μ l GelRed Nucleic Acid Gel Stain
- **Použité kity:**
 - NucleoSpin Blood QuickPure (MACHEREY-NAGEL).
 - VariantSEQr Resequencing System (APPLIED BIOSYSTEMS)
 - ExTerminator (A&A BIOTECHNOLGY)
 - ABI PRISM Big Dye Terminator v3,0 sequencing Ready reaction kit (APPLIED BIOSYSTEM)

4.2 METÓDY

4.2.1 Izolácia DNA

- z leukocytov periférnej krvi pomocou NucleoSpin Blood QuickPure (MACHEREY-NAGEL).

Izolácia DNA použitím MN NucleoSpin Blood- Mini kitu je určená na rýchlu izoláciu celkovej genómovej DNA z ľudských vzoriek krvi. Môžeme použiť čerstvú, ale aj zmrazenú krv odobranú do skúmavky s obsahom citrátu, heparínu alebo EDTA. Princíp izolácie DNA je založený na zachytení DNA na kolónkach obsahujúcich silikagély. Tieto kolóny viažu DNA pri nízkom pH a vysokej koncentrácii soli. Uvoľnenie DNA sa naopak dosiahne pri nízkej koncentrácii solí

a vyššom pH. Lýza je dosiahnutá inkubáciou krvi v roztoku obsahujúcom veľké množstvá chelátotropných iónov v prítomnosti proteínázy K. Odstránenie kontaminujúcich zložiek sa dosiahne premývaním kolónky tlmivým roztokom s etanolom. Purifikovaná genómová DNA je na konci eluovaná slabou alkalickým elučným roztokom. Pred samotnou izoláciou je nutné rozmraziť a vytemperovať vzorku krvi na izbovej teplote a elučný roztok BE zahriať na 70°C. Do 1,5 ml eppendorf skúmavky sme napipetovali 25 µl proteínázy K, 200 µl premiešanej krvi a 200 µl lyzačného roztoku B3. Vzorky sme zvortexovali a inkubovali 15 min. pri 70°C. Počas inkubácie sme vzorky občas premiešali a na záver centrifugovali 1 min. pri 15 000 xg. Do každej skúmavky sme pridali 210 µl 96% etanolu, premiešali pomocou vortexu a sцентриfugovali. Obsah skúmaviek sme preliali do MN NucleoSpin Blood- Mini kolóniek a centrifugovali 1 min. pri 15 000 xg. Pokiaľ časť vzorky nepretiekla kolónkou, centrifugáciu sme zopakovali 3 min. pri 15 000 xg. V ďalšom kroku sme preniesli kolónky do nových NucleoSpin skúmaviek, napipetovali sme 500 µl BW roztoku a opäť centrifugovali 1 min. pri 15 000 xg. Tento krok sme zopakovali s tým rozdielom, že do nových NucleoSpin skúmaviek sme napipetovali 600 µl B5 roztoku. Po centrifugácii sme vyliali obsah skúmavky, priložením skúmavky na papierovú vatú sme odstránili zvyšky tekutiny a kolónku sme vložili späť do skúmavky. Sцентриfugovali sme 1 min. pri 15 000 xg. Kolónky sme umiestnili do pripravených sterilných skúmaviek bez vrchnáku a napipetovali sme 200 µl zahriateho BE roztoku. Inkubovali sme pri izbovej teplote 20 minút a po následnej centrifugácii (1 min. pri 15 000 xg) sme obsah prepipetovali do označenej závitovej eppendorf skúmavky. Koncentráciu vyizolovanej genómovej DNA sme merali na nanofotometri (Implen). Priemerný výťažok z jednej izolácie je 4-6 µg genómovej DNA na 0,2 ml vzorky.

4.2.2 Určenie genotypov ApoE pomocou restrikčnej analýzy (PCR-RFLP)

Pri PCR sa amplifikuje exón 4 apoE génu s dĺžkou 227 bp, ktorý sa štiepi restrikčnou endonukleázou *HhaI*, v závislosti od genotypu apoE, na tieto špecifické fragmenty:

E2/E2 – 91 bp, 82 bp

E2/E3 – 91 bp, 82 bp, 48 bp, 34 bp

E3/E3 – 91 bp, 48 bp, 34 bp

E3/E4 – 91 bp, 72 bp, 48 bp, 34 bp, 19 bp

E4/E4 – 72 bp, 48 bp, 34 bp, 19 bp

E2/E4 – 91 bp, 82bp, 72 bp, 48 bp, 34 bp, 19 bp

HhaI štiepi sekvenciu: 5'... GCG▼C 3'
3'... C▲GCG...5'

PCR:

25 µl reakčná zmes obsahovala Thermo Start PCR tlmivý roztok, 200 µmol/l dNTPs, 0,3 µmol/l primerov, 1 U DNA Thermo Start polymerázy (ABgene), 2 mmol/l MgCl₂, 2,5 µl DMSO, 100 ng DNA a sterilnú vodu do výsledného objemu. Amplifikácia prebiehala v 0,2 ml tenkostenných eppendorfových skúmavkách v termálnom cykléri Eppendorf za podmienok:

iniciálna denaturácia 95°C – 15 min., 35 cyklov (denaturácia 95°C – 30s, hybridizácia primerov 69°C – 20s, syntéza DNA 72°C – 20s), dosyntetizovanie 72°C – 10 min., chladenie 4°C.

Primery PCR (navrhnuté u nás v laboratóriu):

Forward 5' TCC AAG GAG CTG CAG GCG GCG CA 3'

Reverse 5' ACA GAA TTC GCC CCG GCC TGG TAC ACT GCCA 3'

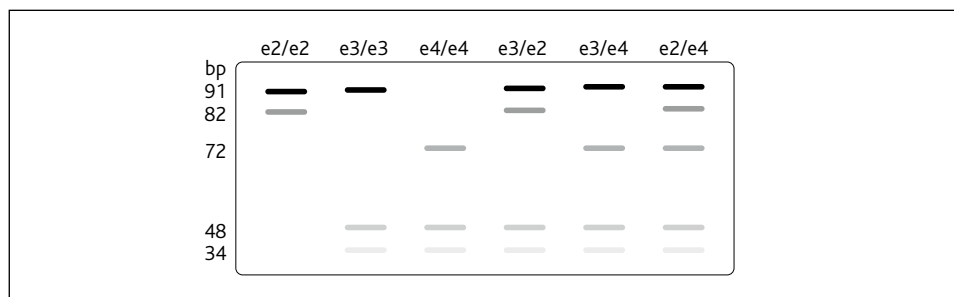
Polymorfizmus dĺžky restričných fragmentov (RFLP):

Reakčná zmes, v ktorej prebiehalo štiepenie obsahovala 20 µl PCR produktu, 2,5 µl tlmiaceho roztoku NEB 4, 2 jednotky *HhaI* restriktívnej endonukleázy, 0,25 µl BSA a sterilnú vodu do objemu 25 µl. Restriktívne štiepenie prebiehalo v 0,5 ml tenkostenných eppendorfových skúmavkách v termostate pri 37°C po dobu 16 hodín.

ELFO – elektroforetická separácia restričných fragmentov:

- Restriktívne fragmenty sme separovali v 3,5% MetaPhor agarózovom géli. Elektroforéza prebiehala pri 100 V po dobu 40 minút. 20 µl vzorky sme zmiešali so 4 µl nanášacej zmesi ORANGE G. Fragmenty DNA sme vizualizovali ožiarením pomocou UV transluminátora. Veľkosť fragmentov sme porovnávali pomocou markera obsahujúceho fragmenty s rôznym počtom básových párov.
- Pre lepšie rozlíšenie sme restriktívne fragmenty separovali v komerčne vyrábaných géloch Spreadex gel EL 300 mini v elektroforéze ORIGINS od firmy Elchrom Scientific. Gél sme najskôr nechali stáť 30 minút pri izbovej teplote. Naliali sme 1,9 l 30 mM TAE pufru do elektroforézy a teplotu sme nastavili na 20°C. Vzorku o objeme 10 µl sme zmiešali s nanášacou zmesou a naniesli do gélu. Gél sme zafixovali katamaranom, aby sa nehýbal. Zdroj sme nastavili na konštantný prúd 350 mA, zapli ELFO a pumpu a nechali sme bežať po dobu 120 minút pri napätí 120V. Konštantná teplota, konštantný prúd, pumpa zabezpečujúca cirkuláciu pufru a komerčne vyrábaný gél umožnia oddelenie fragmentov, ktoré sa líšia v malom počte nukleotidov (2-3 nt). Po skončení ELFO sme vybrali gél pomocou ihly a pinzety, odstránili z gélu fóliu a farbili sme ho 30 minút v 150 ml roztoku interkalačného činidla GelRed Nucleic Acid Gel Stain (45 µl činidla a 0,88 g NaCl, destilovaná voda do objemu 150 ml). Po farbení sme jednotlivé fragmenty vizualizovali pomocou UV transluminátora.

Obrázok 17. Jednotlivé genotypy ApoE. Fragmenty vzniknuté štiepením *HhaI*



4.2.3 Optimalizácia podmienok pre analýzu APP génu

- **Amplifikácia 16. a 17. exónu APP génu pomocou PCR (Polymerase chain reaction).**

50 µl reakčná zmes obsahovala PCR tlmivý roztok pre DNA polymerázu DyNAzyme (FINN-ZYMES), 200 µmol/l dNTPs, 0,3 µmol/l primerov, 1 U DNA polymerázy DyNAzyme (FINN-ZYMES), 100 ng DNA a sterilnú vodu do výsledného objemu. Pri amplifikácii exónu 17 sme pridali aj 1 mmol/l MgCl₂. Amplifikácia templátu prebiehala v 0,2 ml tenkostenných eppendorfových skúmavkách v termálnom cykléri Eppendorf za podmienok uvedených v tabuľke 2. Pri navrhovaní primerov sme vychádzali z primerov publikovaných v práci Wakutani a kol. (2004).

- **PRIMERY APP**

primer	sekvencia primeru (5'→3')	dĺžka produktu (bp)
16-1	TAG AAA GAA GTT TTG GGT AAG CTT T	260
16-2	AGA GTT AAT AGG TCA TTT GGC AAG ACA	
17-1	CCT CAT CCA AAT GTC CCC TGC ATT	319
17-2	GCC TAA TTC TCT CAT AGT CTT AAT TCC C	

Tabuľka 2. Podmienky PCR

POČET CYKLOV	KROK	TEPLOTA	ČAS
1	denaturácia	95°C	4 min
35	denaturácia	95°C	30 s
	hybridizácia primerov	55°C(16e)/65°C (17e)	30 s
	syntéza DNA	72°C	30 s
1	dosyntetizovanie nekompletných PCR produktov	72°C	10 min
1	schladenie	4°C	hold

4.2.4 Optimalizácia podmienok pre analýzu *psen1* génu

- **Amplifikácia 10 exónov *psen 1* (3-12) génu pomocou PCR.**

50 µl reakčná zmes obsahovala PCR tlmivý roztok pre DNA polymerázu DyNAzyme (FINN-ZYMES), 200 µmol/l dNTPs, 0,3 µmol/l primerov, 1 U DNA polymerázy DyNAzyme (FINN-ZYMES), 2 mmol/l MgCl₂, 150 ng DNA a sterilnú vodu do výsledného objemu. Amplifikácia templátu prebiehala v 0,2 ml tenkostenných eppendorfových skúmavkách v termálnom cykléri Eppendorf za podmienok uvedených v tabuľke 4. Pri navrhovaní sekvencií oligonukleotidových primerov sme vychádzali zo sekvencií primerov publikovaných v prácach Cruts a kol., 1998 (tabuľka 3). Primery sme nariedili do zásobnej koncentrácie 15 µmol/l.

Tabulka 3. Príklady na amplifikáciu exónov *psen 1*

Exón	primer (5'→3')	Dĺžka PCR produktu (bp)
3	F AGAACCTCAAGAGGCTTTGT R ACACTGTACCTGGCTACGTA	151
4	F TAACCGTTACCTTGATTCTG R CCACACTGGCTTTGAGAATA	356
5	F GTGGTAATGTGGTTGGTGAT R CCCAACCATAAGAAGAACAG	260
6	F TCTGTACTTTTAAAGGGTTGT R ACTTCAGAGTAATTCATCANCA	229
7	F GGAGCCATCACATTATTCTA R GAGATGAGGAAAGAAAACAC	369
8	F CACCCATTTACAAGTTTAGC R GATGAGAACAAGTNCNTGAA	262
9	F TGGCTTGTTGTTGTCTATGC R AAGACGATAAAAACATTGCT	238
10	F CTGTAACCTCCACTTTCTCTTG R CTAAAGGAATCCATGACTTTG	242
11	F AAGAGTGACCAACTTTTAAAT R GTGTGGCCAGGGTAGAGAACT	332
12	F GTGATTGAGTTTTGCCTGAA R TAGTCAAAGAAGAAACATCC	270

Tabulka 4. Podmienky PCR

POČET CYKLOV	KROK	TEPLOTA	ČAS
1	denaturácia	95°C	4 min
30	denaturácia	95°C	30 s
	hybridizácia primerov	60°C	30 s
	syntéza DNA	72°C	30 s
1	dosyntetizovanie nekompletných PCR produktov	72°C	10 min
1	schladenie	4°C	hold

4.2.5 Optimalizácia podmienok pre analýzu psen 2 a tau

- amplifikácia 10 exónov *psen2* a exónov 9, 10, 11 génu *tau* pomocou PCR využitím VariantSeqR Resequencing System Protocol (tabuľka 5, 6).

Tabuľka 5. Zloženie PCR reakcie

Zložka	Množstvo v μl
AmpliTaQ Gold PCR Master Mix (2x)	5
Sterilná voda	0,4
50% glycerol	1,6
RSA primer mix	2
DNA (5-10 ng/ μl)	1
SPOLU	10

Tabuľka 6. Podmienky PCR

POČET CYKLOV	KROK	TEPLOTA	ČAS
1	denaturácia	96°C	5 min
40	denaturácia	94°C	30 s
	hybridizácia primerov	60°C	45 s
	syntéza DNA	72°C	45 s
1	dosyntetizovanie nekompletných PCR produktov	72°C	10 min
1	schladenie	4°C	hold

4.2.6 Purifikácia PCR produktov pomocou enzýmov

Na odstránenie nespotrebovaných dNTP a primerov z PCR produktu sme použili 2 enzýmy alkalickú fosfatázu a exonukleázu I. K 20 μl PCR produktu sme pridali 2 μl reakčného tlmivého roztoku pre alkalickú fosfatázu a 2 μl reakčného tlmivého roztoku pre exonukleázu I., 1 U alkalickej fosfatázy a 2 U exonukleázy I. Nechali sme v cykléri inkubovať pri teplote 37°C 30 minút a následne sme enzýmy inaktivovali zvýšením teploty na 80°C na 15 min.

4.2.7 Sekvenačná reakcia

Časť prečistených PCR produktov (5 μl) sme kvantifikovali v 2% agarózovom géli pomocou markera molekulovej hmotnosti Mass Ruler. Elektroforéza prebehla pri napätí 100V po dobu 30 minút. Fragmenty DNA sme vizualizovali pomocou UV transluminátora. Kvantitu DNA fragmentu porovnáme s tabuľkou 7, na základe intenzity určíme množstvo DNA v bande a následne odhadneme výsledné množstvo PCR produktu (podľa tabuľky 8), ktoré dáme do sekvenačnej reakcie.

Tabuľka 7. Množstvo DNA v bande

Fragment (bp)	Množstvo DNA (ng) v 5 µl PCR produktu
1031	50
900	45
800	40
700	35
600	30
500	50
400	20
300	15
200	10
100	5
80	4

Tabuľka 8. Množstvo PCR produktu použitého v sekvenačnej reakcii

Množstvo	PCR produkt
1-3 ng	100-200 bp
3-10 ng	200-500 bp
5-20 ng	500-1000 bp
10-40 ng	1000-2000 bp
40-100 ng	>2000 bp

Sekvenačnú reakčnú zmes sme si pripravili pomocou ABI PRISM Big Dye Terminator v3,0 sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems). Reakčná zmes obsahovala 1 µl *Ready reaction mix* s DNA polymerázou a fluorescenčne značenými ddNTPs, 1,5 µl sekvenačného tlmivého roztoku, 0,08 µmol/l primeru, PCR produkt a sterilnú vodu do výsledného objemu 10 µl. Sekvenačná reakcia prebiehala v 0,2 ml tenkostenných eppendorfových skúmavkách v termálnom cykléri Eppendorf za podmienok uvedených v tabuľke 9.

Tabuľka 9. Časovo-teplotný profil sekvenačnej reakcie

POČET CYKLOV	KROK	TEPLOTA	ČAS
25	denaturácia	96°C	10 s
	hybridizácia primerov	50°C	5 s
	syntéza DNA	60°C	4 min
1	zastavenie reakcie schladením	10°C	hold

4.2.8 Prečistenie produktov pred sekvenovaním pomocou ExTerminator Kit

K 10 µl produktu po sekvenačnej reakcii sme pridali 5 µl Mix Blue a 100 µl bind/wash roztoku. Pomocou pipety sme vzorky premiešali. Celý obsah sme prepipetovali na kolónku, ktorá je uložená v skúmavke a centrifugovali 30 sekúnd pri 2800g. Počas krátkej centrifugácie zostanú sekvenčné produkty naviazané na kolónkovej membráne, zatiaľ čo nezaradené produkty a sekvenčné primery prejdú cez membránu. Modré zafarbenie kolónky je signálom úspešnej precipitácie sekvenčných produktov. Po centrifugácii sme pridali 400 µl bind/wash roztoku a centrifugovali 2 minúty pri 14000g. Tento premývací krok slúži na odstránenie zvyšných solí a nečistôt. Kolónku sme preniesli do novej 1,5 ml skúmavky a pridali 25 µl formamidu. Nechali sme inkubovať 2 minúty pri izbovej teplote a následne centrifugovali 1 minútu 14000g. Vzorky sme denaturovali v termobloku pri 95°C 5 minút a po denaturácii vložili do ľadu.

4.2.9 Sekvenovanie

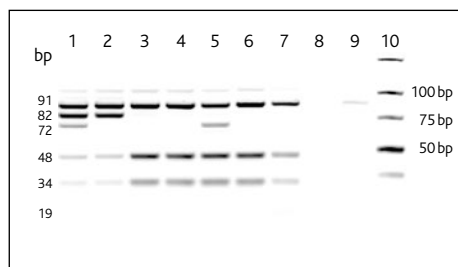
Prečistené produkty sme dali sekvenovať. Sekvenovanie sa uskutočnilo na ABI PRISM 310 Genetic Analyzer využitím 61 cm elektroforetickej kapiláry s priemerom 50 µm a polyméru POP6. Teplota kapiláry bola 50°C a doba elektroforézy bola 90 minút. Sekvenčný chromatogram sme analyzovali manuálne vyžitím Chromas 2.2 (*Technelysium Pty Ltd., Australia*) a Vector NTI 9 (Informax).

5. VÝSLEDKY

5.1 GENOTYPIZÁCIA APOE

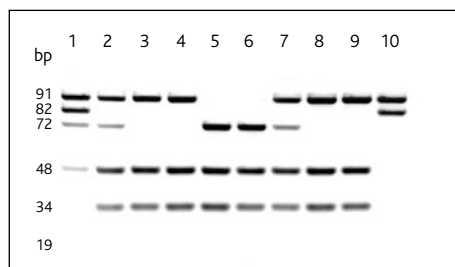
Po PCR amplifikácii polymorfnej oblasti apoE génu (exón 4 o dĺžke 227 bp) sa následne opracoval PCR produkt restriktčnou endonukleázou *HhaI* za vzniku špecifických restriktčných fragmentov.

Obrázok 18a. Genotypy apoE vzniknuté restriktčnou analýzou pomocou *HhaI*. Restriktčné fragmenty sme separovali na Spreadex gel EL 300 mini v elektroforéze ORIGINS by Elchrom Scientific.



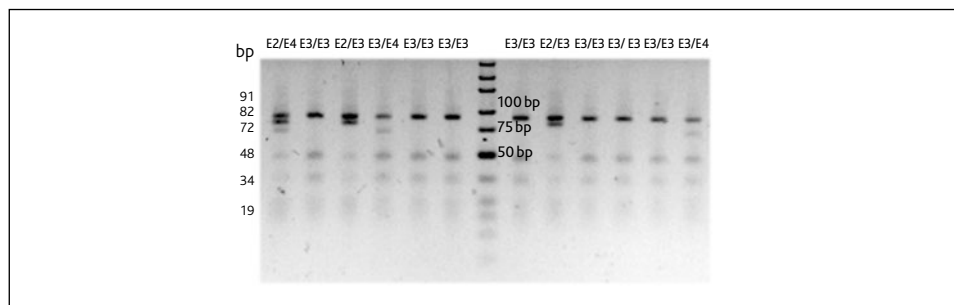
Dráha 1: genotyp E2/E4, dráha 2: E2/E3, dráha 3: E3/E3, dráha 4: E3/E3, dráha 5: E3/E4, dráhy 6, 7: E3/E3, dráhy 8, 9: negatívna kontrola, dráha 10: marker molekulovej hmotnosti.

Obrázok 18b. Restriktčné fragmenty sme separovali na Spreadex gel EL 300 mini v elektroforéze ORIGINS by Elchrom Scientific.



Dráha 1: genotyp E2/E4, dráha 2: E3/E4, dráhy 3, 4: E3/E3, dráhy 5, 6: E4/E4, dráha 7: E3/E4, dráhy 8, 9: E3/E3, dráha 10: E2/E2.

Obrázok 19. Genotypy apoE vzniknuté restriktčnou analýzou pomocou *HhaI*
Restriktčné fragmenty sme separovali na 3,5 % metaphor agarózovom géli



Genotypizáciu apoE sme uskutočnili v kontrolnom súbore a v súbore pacientov s AD. Kontrolný súbor tvorilo 100 žien (200 aliel) a 100 mužov (200 aliel) bez podozrenia na AD. Súbor pacientov s AD tvorilo 58 pacientov dodaných I. Neurologickou klinikou LF UK a UNB. Pri

percentuálnom a štatistickom hodnotení zastúpenia jednotlivých izoform apoE sme vylúčili dvoch pacientov, u ktorých sa našli mutácie v kandidátnych génoch, aby sa neskreslil pomer jednotlivých izoform. Takže sme percentuálne spracovali zastúpenie apoE variant u 56 pacientov s AD, 25 mužov a 31 žien (112 aliel). Počty a percentuálne zastúpenie apoE izoform je v tabuľke 10a, 10b. Počty a percentuálne zastúpenie apoE genotypov je v tabuľke 11.

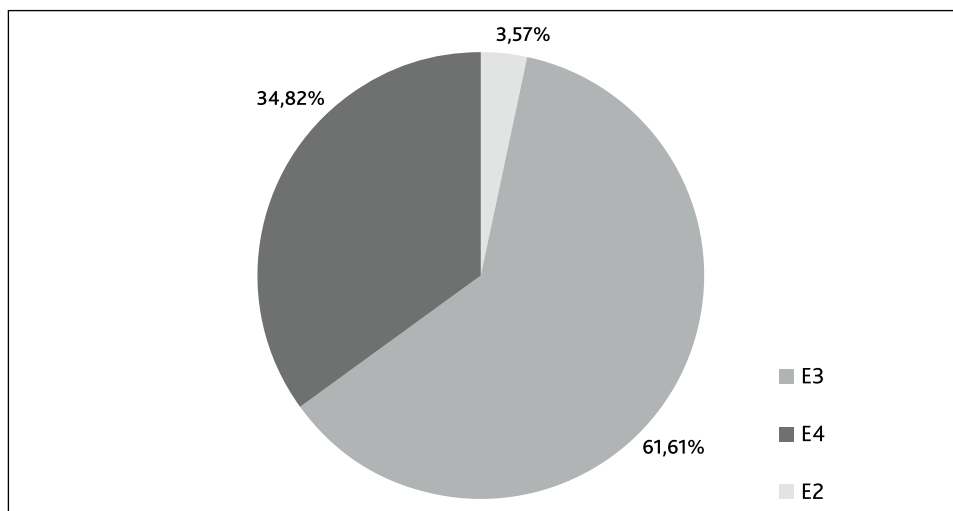
Tabuľka 10a. Zastúpenie izoform apoE v kontrolnom súbore

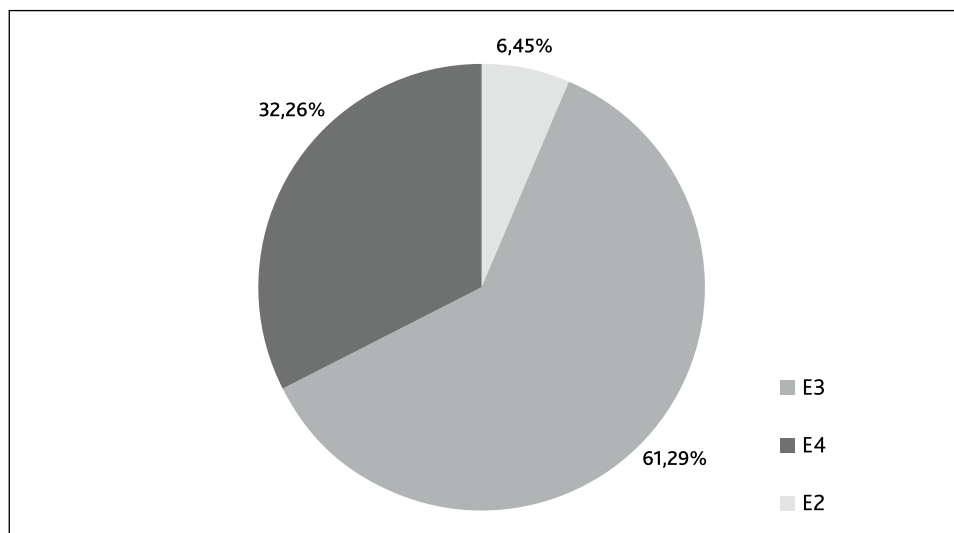
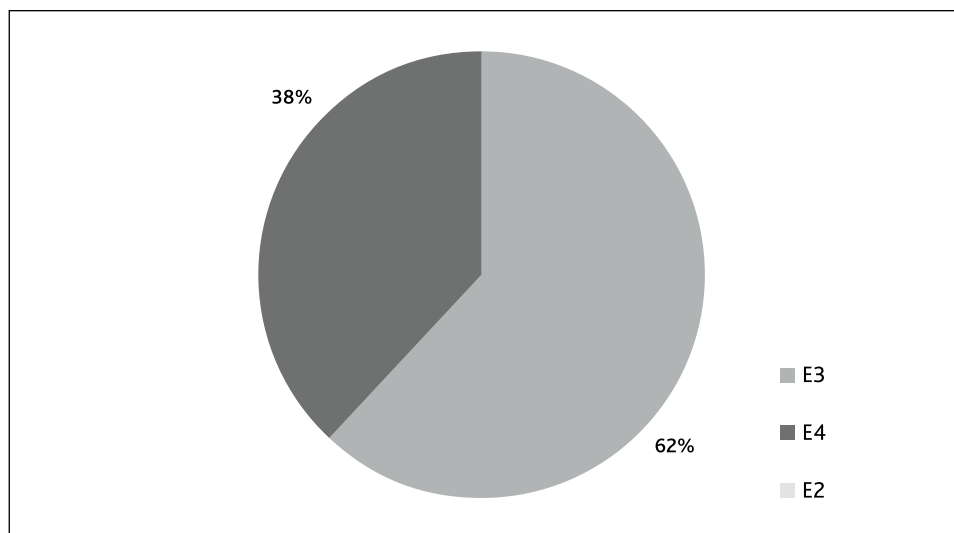
Izoforma ApoE	Kontrolný súbor (spolu, muži a ženy) 400 aliel	Kontrolný súbor (ženy) 200 aliel	Kontrolný súbor (muži) 200 aliel
E3	333 – 83,25%	171 – 85,5%	162 – 81%
E4	39 – 9,75%	16 – 8%	23 – 11,5%
E2	28 – 7,0%	13 – 6,5%	15 – 7,5%

Tabuľka 10b. Zastúpenie izoform apoE v súbore pacientov s AD

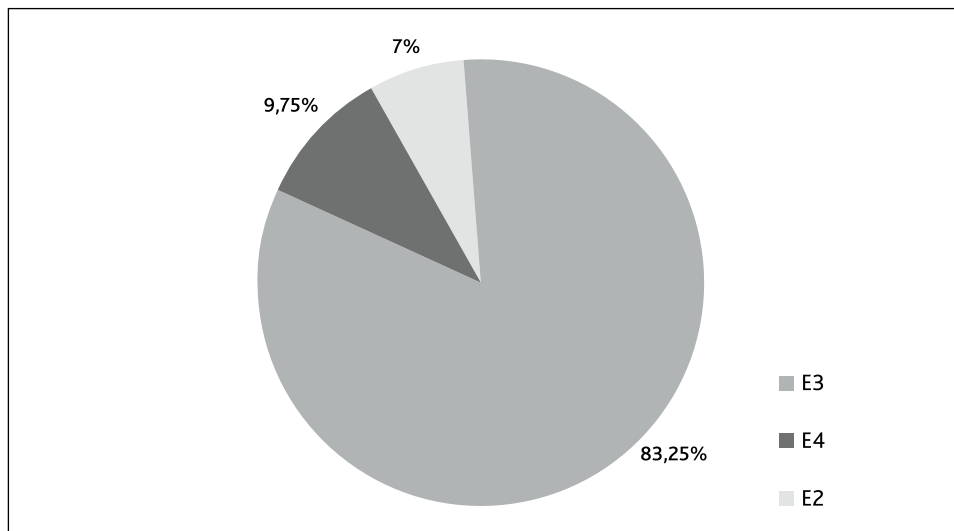
Izoforma ApoE	AD pacienti 112 aliel	AD ženy 62 aliel	AD muži 50 aliel
E3	69 – 61,61%	38 – 61,29%	31 – 62%
E4	39 – 34,82%	20 – 32,26%	19 – 38%
E2	4 – 3,57%	4 – 6,45%	0 – 0%

Graf 1. Percentuálne zastúpenie apoE aliel (112 aliel) u pacientov s AD

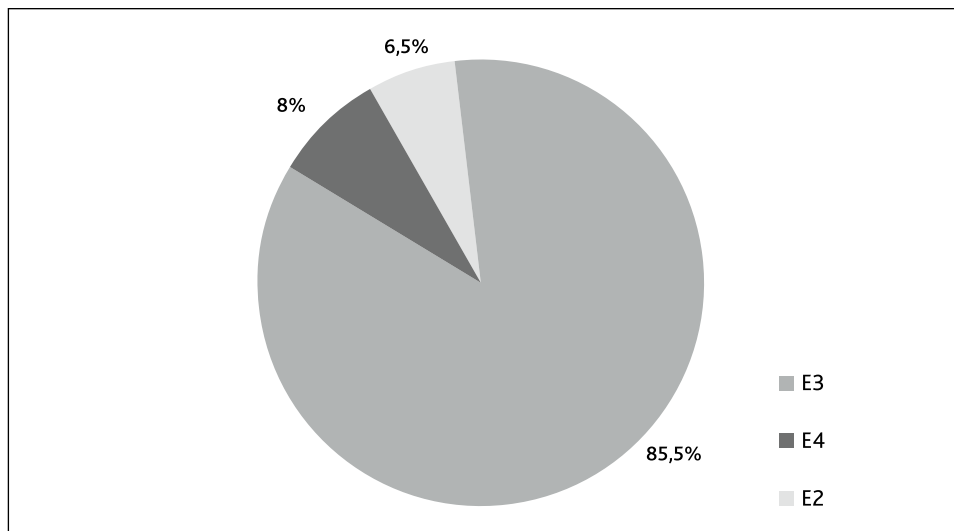


Graf 2. Percentuálne zastúpenie apoE aliel (62 aliel) v súbore žien s AD**Graf 3. Percentuálne zastúpenie apoE aliel (50 aliel) v súbore mužov s AD**

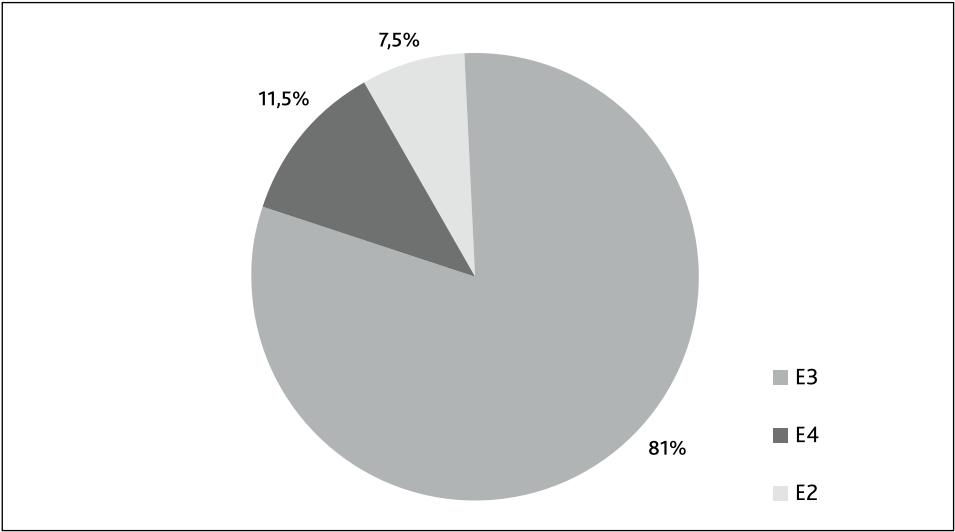
Graf 4. Percentuálne zastúpenie apoE aliel v kontrolnom súbore (100 žien a 100 mužov)



Graf 5. Percentuálne zastúpenie apoE aliel v kontrolnom súbore (100 žien, 200 aliel)



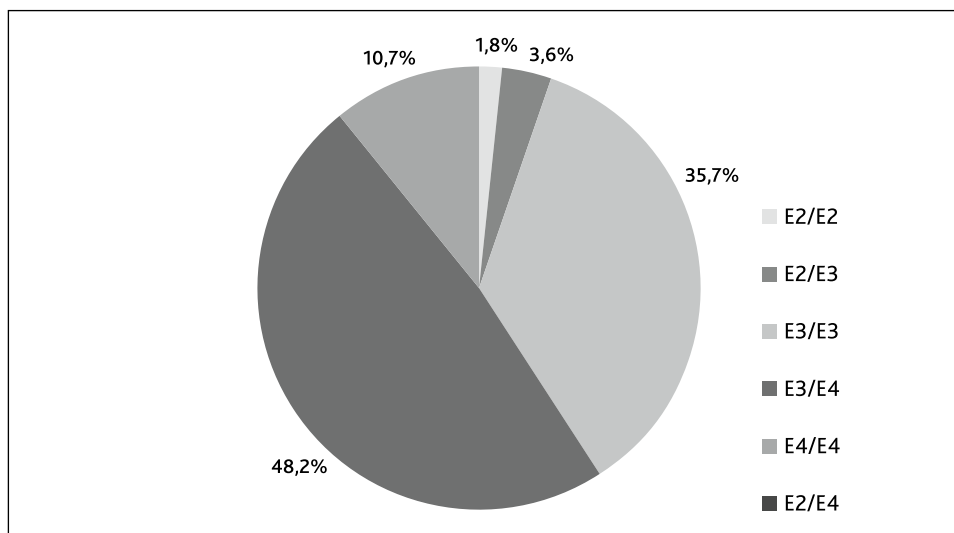
Graf 6. Percentuálne zastúpenie apoE aliel v kontrolnom súbore (100 mužov, 200 aliel)



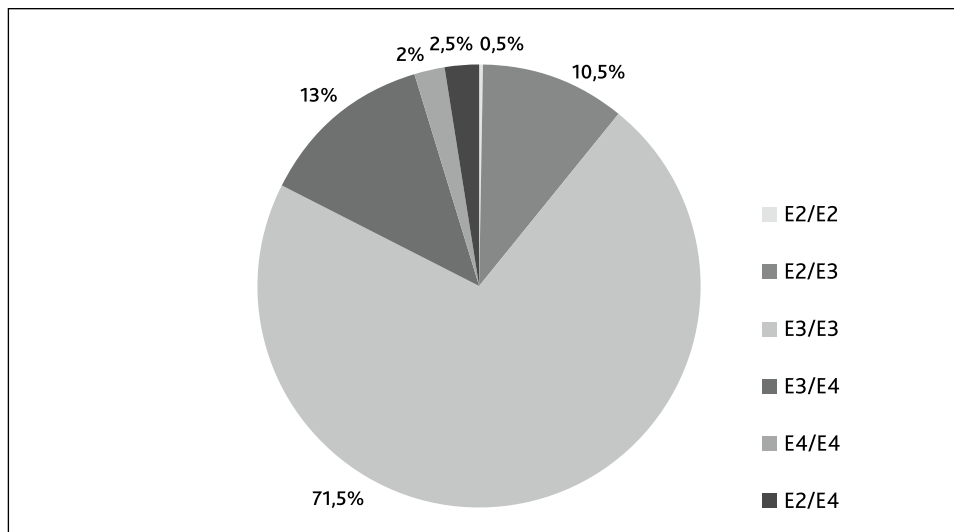
Tabuľka 11: Zastúpenie genotypov apoE v súbore pacientov s AD a v kontrolnom súbore (100 žien a 100 mužov)

Genotypy apoE	AD pacienti (56 pacientov)	Kontrolný súbor (100 mužov a 100 žien)
E3/E3	20 – 35,7%	143 – 71,5%
E3/E4	27 – 48,2%	26 – 13%
E2/E3	2 – 3,6%	21 – 10,5%
E2/E4	0 – 0%	5 – 2,5%
E4/E4	6 – 10,7%	4 – 2%
E2/E2	1 – 1,8%	1 – 0,5%

Graf 7. Zastúpenia genotypov apoE u pacientov s podozrením na AD



Graf 8. Zastúpenia genotypov apoE v kontrolnom súbore



5.1.1 Štatistické vyhodnotenie zastúpenia apoE

Na analýzu rozdielov v rozložení premenných medzi dvoma porovnávanými skupinami sme použili kontingenčnú tabuľku a Fisherov exaktný test. Skúmame rozdiely podľa riadkov alebo stĺpcov kontingenčnej tabuľky. Ak P-hodnota testu je menšia ako 0,05 (ako štatisticky

významná bola hodnotená hladina významnosti $p < 0,05$), tak sú skúmané znaky štatisticky signifikantne odlišné, čo značí, že sa aj signifikantne líšia riadkové a taktiež stĺpcové percentá.

- Sledujeme rozdiely v zastúpení apoE izoforiem (E3, E4, E2) medzi súborom pacientov s AD a kontrolným súborom KS (100 žien + 100 mužov).

Podľa Fisherovho exaktného testu sú rozdiely v zastúpení jednotlivých izoforiem apoE medzi súborom pacientov s AD a kontrolným súborom štatisticky signifikantne významné ($P=0,000$).

Tabuľka 12: Kontingenčná tabuľka na porovnanie, či sa vyskytujú signifikantné rozdiely v zastúpení apoE izoforiem medzi súborom pacientov s AD a kontrolným súborom KS

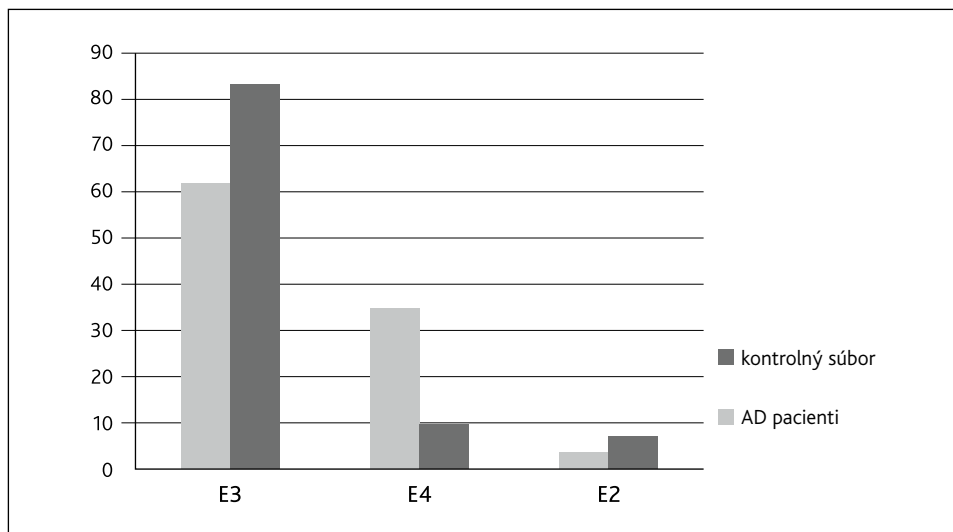
			AD_KS		Total
			1 AD	2 KS	
APOE	1 E3	Count	69	333	402
		% within APOE	17,2%	82,8%	100,0%
		% within AD_KS	61,6%	83,3%	78,5%
	2 E4	Count	39	39	78
		% within APOE	50,0%	50,0%	100,0%
		% within AD_KS	34,8%	9,8%	15,2%
	3 E2	Count	4	28	32
		% within APOE	12,5%	87,5%	100,0%
		% within AD_KS	3,6%	7,0%	6,3%
Total	Count		112	400	512
	% within APOE		21,9%	78,1%	100,0%
	% within AD_KS		100,0%	100,0%	100,0%

P=0,000

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)	Point Probability
Pearson Chi-Square	42,969(a)	2	,000	,000		
Likelihood Ratio	37,067	2	,000	,000		
Fisher's Exact Test	36,867			,000		
Linear-by-Linear Association	8,903(b)	1	,003	,004	,003	,001
N of Valid Cases	512					

Graf 9. Znáznornenie rozdielov v percentuálnom zastúpení izoforiem apoE medzi súborom pacientov s AD a kontrolným súborom



- Chceme zistiť, či podiel E4 varianty sa v súbore pacientov s AD a v kontrolnom súbore signifikantne líši.

Použijeme Fisherov exaktný test. Pri aplikácii Exaktného Fisherovho testu overujeme nulovú hypotézu: H_0 : podiel E4 v AD a KS je rovnaký – keď je P-hodnota menšia ako 0,05, tak hypotézu zamietame a rozdiel považujeme za signifikantne odlišný.

Podľa Fisherovho exaktného testu je podiel E4 v AD a KS vysoko signifikantne odlišný ($P=0,000$).

Tabulka 13: Kontingenčná tabuľka na porovnanie, či sa signifikantne líši podiel E4 varianty medzi súborom pacientov s AD a kontrolným súborom KS

			AD_KS		Total
			1 AD	2 KS	
APOE	1 E4	Count	39	39	78
		% within APOE	50,0%	50,0%	100,0%
		% within AD_KS	9,8%	34,8%	15,2%
	2 zvyšok	Count	361	73	434
		% within APOE	83,2%	16,8%	100,0%
		% within AD_KS	90,3%	65,2%	84,8%
Total	Count		400	112	512
	% within APOE		78,1%	21,9%	100,0%
	% within AD_KS		100,0%	100,0%	100,0%

P=0,000

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)	Point Probability
Pearson Chi-Square	42,591(b)	1	,000	,000	,000	
Continuity Correction(a)	40,672	1	,000			
Likelihood Ratio	36,572	1	,000	,000	,000	
Fisher's Exact Test				,000	,000	
Linear-by-Linear Association	42,508(c)	1	,000	,000	,000	,000
N of Valid Cases	512					

- Sledujeme rozdiely v zastúpení apoE izoforiem (E3, E4, E2) medzi pohlaviami v kontrolnom súbore. Kontrolný súbor 100 mužov a kontrolný súbor 100 žien.
Podľa Fisherovho exaktného testu nie sú rozdiely v zastúpení jednotlivých izoforiem apoE medzi pohlaviami v kontrolnom súbore štatisticky signifikantne významné (P=0,434).

Tabuľka 14: Kontingenčná tabuľka na porovnanie, či sa vyskytujú signifikantné rozdiely v zastúpení apoE izoforiem medzi pohlaviami v kontrolnom súbore

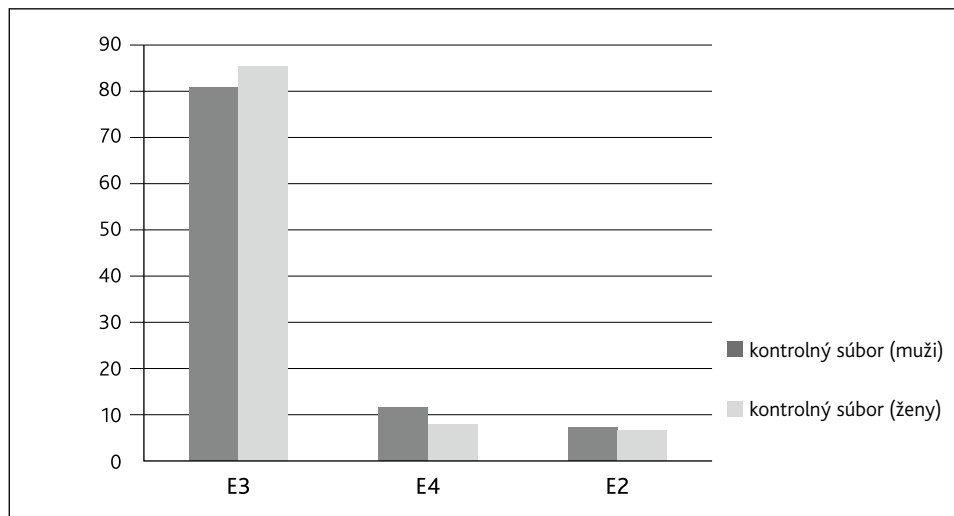
			pohl		Total
			1 muži	2 ženy	
APOE	1 E3	Count	162	171	333
		% within APOE	48,6%	51,4%	100,0%
		% within pohl	81,0%	85,5%	83,3%
	2 E4	Count	23	16	39
		% within APOE	59,0%	41,0%	100,0%
		% within pohl	11,5%	8,0%	9,8%
	3 E2	Count	15	13	28
		% within APOE	53,6%	46,4%	100,0%
		% within pohl	7,5%	6,5%	7,0%
Total	Count	200	200	400	
	% within APOE	50,0%	50,0%	100,0%	
	% within AD_KS	100,0%	100,0%	100,0%	

$P=0,434$

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)	Point Probability
Pearson Chi-Square	1,643(a)	2	,440	,434		
Likelihood Ratio	1,649	2	,438	,434		
Fisher's Exact Test	1,643			,434		
Linear-by-Linear Association	,940(b)	1	,332	,379	,190	,044
N of Valid Cases	400					

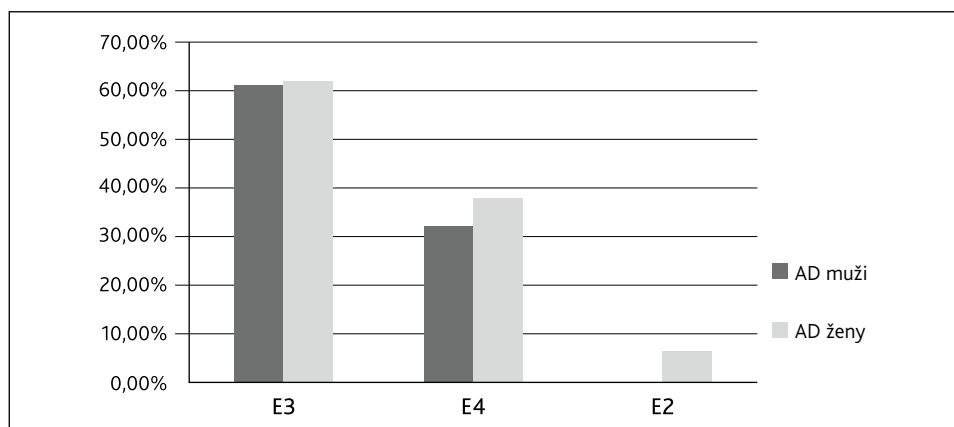
Graf 10. Znázornenie percentuálneho zastúpenia apoE izoforiem medzi pohlaviami v kontrolnom súbore. Kontrolný súbor 100 mužov a kontrolný súbor 100 žien



- Sledujeme rozdiely v zastúpení apoE izoforiem (E3, E4, E2) medzi pohlaviami v súbore pacientov s AD.

Podľa Fisherovho exaktného testu nie sú rozdiely v zastúpení jednotlivých izoforiem apoE medzi pohlaviami v súbore pacientov s AD štatisticky významné ($P=0,216$). I keď sa E2 nachádza iba u žien, ale početnosť výskytu je malá.

Graf 11. Znázornenie percentuálneho zastúpenia apoE izoforiem medzi pohlaviami v súbore pacientov s AD



Tabuľka 15: Kontingenčná tabuľka na porovnanie, či sa vyskytujú signifikantné rozdiely v zastúpení apoE izoforiem medzi pohlaviami v súbore pacientov s AD

			pohl		Total
			1 muži	2 ženy	
APOE	1 E3	Count	31	38	69
		% within APOE	44,9%	55,1%	100,0%
		% within pohl	62,0%	61,3%	61,6%
	2 E4	Count	19	20	39
		% within APOE	48,7%	51,3%	100,0%
		% within pohl	38,0%	32,3%	34,8%
	3 E2	Count	0	4	4
		% within APOE	,0%	100,0%	100,0%
		% within pohl	,0%	6,5%	3,6%
Total	Count		50	62	112
	% within APOE		44,6%	55,4%	100,0%
	% within pohl		100,0%	100,0%	100,0%

$P=0,216$

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)	Point Probability
Pearson Chi-Square	3,490(a)	2	,175	,203		
Likelihood Ratio	4,994	2	,082	,150		
Fisher's Exact Test	3,195			,216		
Linear-by-Linear Association	,447(b)	1	,504	,614	,310	,108
N of Valid Cases	112					

- Sledujeme rozdiely v zastúpení genotypov apoE (E3/E3 E3/E4 E2/E3 E2/E4 E4/E4 E2/E2) medzi súborom pacientov s AD a kontrolným súborom KS (100 žien + 100 mužov).

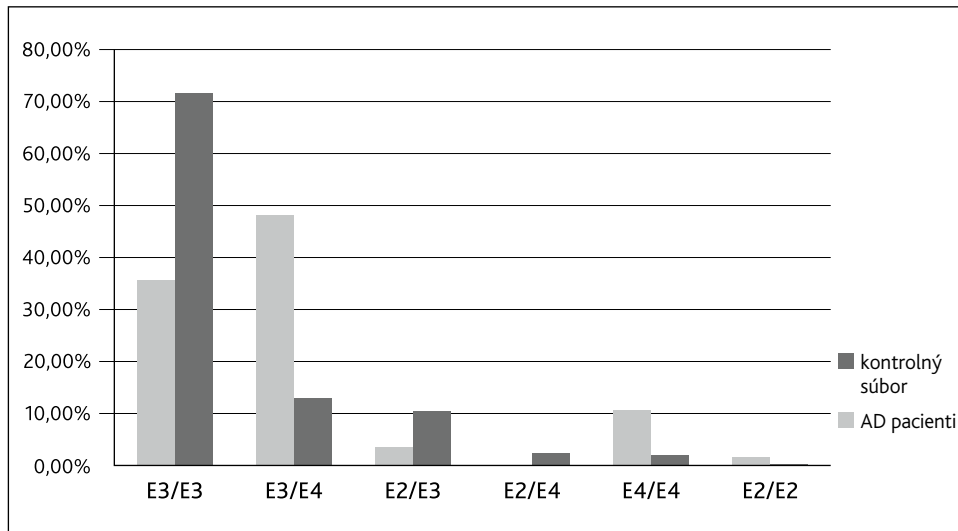
Podľa Fisherovho exaktného testu sú rozdiely v zastúpení jednotlivých genotypov apoE medzi súborom pacientov s AD a kontrolným súborom štatisticky signifikantne významné ($P=0,000$).

Tabuľka 16: Kontingenčná tabuľka na porovnanie, či sa vyskytujú signifikantné rozdiely v zastúpení apoE genotypov medzi súborom pacientov s AD a kontrolným súborom KS

			AD_KS		Total
			1 AD	2 KS	1 AD
genotyp	1 E3/E3	Count	20	143	163
		% within genotyp	12,3%	87,7%	100,0%
		% within AD_KS	35,7%	71,5%	63,7%
	2 E3/E4	Count	27	26	53
		% within genotyp	50,9%	49,1%	100,0%
		% within AD_KS	48,2%	13,0%	20,7%
	3 E2/E3	Count	2	21	23
		% within genotyp	8,7%	91,3%	100,0%
		% within AD_KS	3,6%	10,5%	9,0%
	4 E2/E4	Count	0	5	5
		% within genotyp	,0%	100,0%	100,0%
		% within AD_KS	,0%	2,5%	2,0%
	5 E4/E4	Count	6	4	10
		% within genotyp	60,0%	40,0%	100,0%
		% within AD_KS	10,7%	2,0%	3,9%
	6 E2/E2	Count	1	1	2
		% within genotyp	50,0%	50,0%	100,0%
		% within AD_KS	1,8%	,5%	,8%
Total	Count		56	200	256
	% within genotyp		21,9%	78,1%	100,0%
	% within AD_KS		100,0%	100,0%	100,0%

P=0,000

Graf 12. Znázornenie rozdielov v percentuálnom zastúpení genotypov apoE medzi súborom pacientov s AD a kontrolným súborom



5.2 MOLEKULÁRNO-GENETICKÁ ANALÝZA GÉNOV

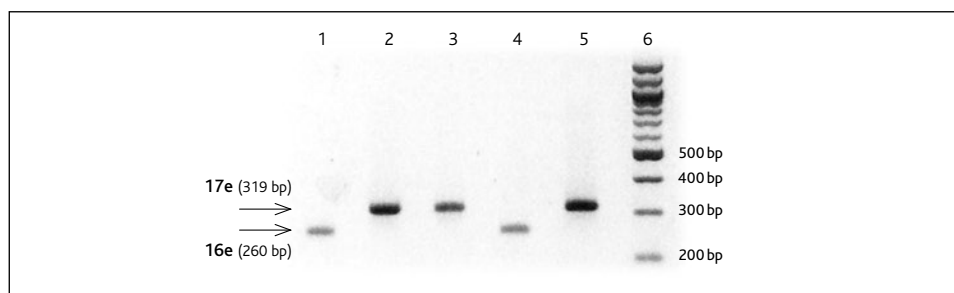
APP, PSEN1, PSEN2, TAU

V druhej etape našej práce sme sa zamerali na zavedenie molekulárno-genetických metód na detekciu mutácií v génoch *APP*, *psen 1*, *psen2* a *tau*. Zamerali sme sa na optimalizáciu a štandardizovanie podmienok PCR reakcie a následnej sekvenačnej reakcie, čo predchádzalo samotnému sekvenovaniu jednotlivých exónov génov. Na optimalizáciu PCR reakčných podmienok sme použili náhodne vybrané vzorky DNA. Časovo-teplotný profil a koncentrácie zložiek PCR reakcie sme si stanovili v našom laboratóriu.

5.2.1 Amplifikácia exónov 16 a 17 *APP* génu

PCR reakcia prebehla za podmienok uvedených v tabuľke 2. Zaviedli sme vhodnú metódu na amplifikáciu exónov *APP* génu.

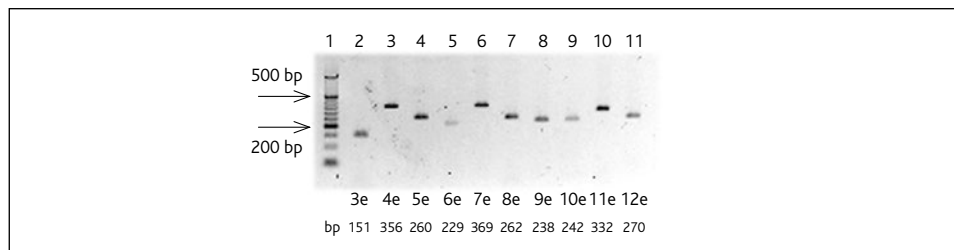
Obrázok 20. Amplifikácia 16. a 17. exónu *APP* génu Dráhy 1, 4: exón 16 (260 bp), dráhy 2, 3, 5: exón 17 (319 bp), dráha 6: marker molekulovej hmotnosti.



5.2.2 Amplifikácia exónov *psen1* a *psen2* génov

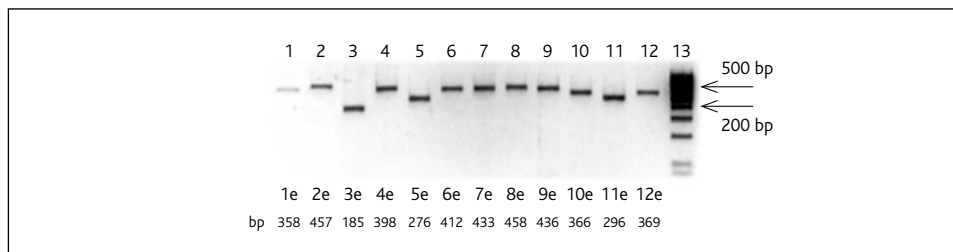
Zaviedli sme vhodnú metódu na amplifikáciu exónov *psen1* a *psen2* génov.

Obrázok 21. Amplifikácia exónov 3-12 *psen1* génu Dráha 1: Marker molekulovej hmotnosti, dráha 2: exón 3 (151 bp), dráha 3: exón 4 (356bp), dráha 4: exón 5 (260bp), dráha 5: exón 6 (229 bp), dráha 6: exón 7 (369 bp), dráha 7: exón 8 (262 bp), dráha 8: exón 9 (238 bp), dráha 9: exón 10 (242 bp), dráha 10: exón 11 (332 bp), dráha 11: exón 12 (270 bp).



Obrázok 22. Amplifikácia exónov 1-12 *psen2* génu

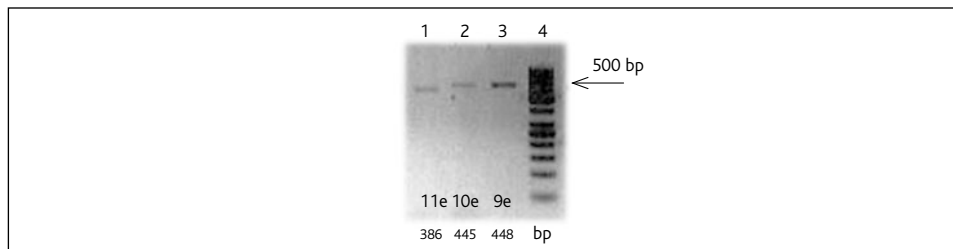
Dráha 1: exón 1 (358 bp), dráha 2: exón 2 (457 bp), dráha 3: exón 3 (185bp), dráha 4: exón 4 (398 bp), dráha 5: exón 5 (276 bp), dráha 6: exón 6 (412 bp), dráha 7: exón 7 (433bp), dráha 8: exón 8 (458 bp), dráha 9: exón 9 (436 bp), dráha 10: exón 10 (366 bp), dráha 11: exón 11 (296bp), dráha 12: exón 12 (369 bp), dráha 13: marker molekulovej hmotnosti.



5.2.3 Amplifikácia exónov génu *tau*

Zaviedli sme vhodnú metódu na amplifikáciu exónov 9, 10, 11 génu *tau*.

Obrázok 23. Amplifikácia exónov 9, 10, 11 génu *tau*. Dráha 1: exón 11 (386 bp), dráha 2: exón 10 (445 bp), dráha 3: exón 9 (448bp), dráha 4: marker molekulovej hmotnosti



5.2.4 Sekvenčné analýzy

U všetkých 58 pacientov s AD sme uskutočnili sekvenčné analýzy *APP* génu (exón 16, 17), *psen1* génu (exóny 3-12), *psen2* génu (3-12) a génu *tau* (exóny 9-11) s cieľom identifikovať kauzálne mutácie u pacientov s AD.

V *APP* géne sme identifikovali mutáciu Val717Phe (GTC→TTC) (275341 G>T) v 17. exóne. V exóne 5 *psen1* génu sme identifikovali mutáciu Thr116Asn (ACC→AAC) (25500 C>A). Taktiež sme v génoch identifikovali niekoľko tichých polymorfizmov, ktoré nevedú k zámene aminokyseliny: polymorfizmus v intróne 9 (T/G) v *psen1* géne, polymorfizmy Asn43 a His87 v *psen2* géne a polymorfizmy Ala227, Asn255, Pro270 v *tau* géne.

Tabuľka 17: Popis identifikovaných mutácií

Mutácia	Gén	Exón	Nt substitúcia	Aa zámena	Typ mutácie
Val717Phe (GTC→TTC)	APP	17	275341 G>T	valín→fenylalanín	missense
Thr116Asn (ACC→AAC)	psen1	5	25500 C>A	treonín→asparagín	missense

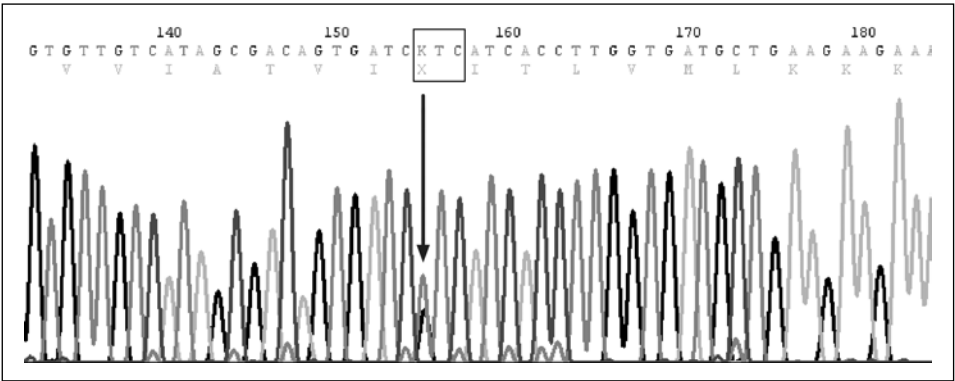
Tabuľka 18: Popis identifikovaných polymorfizmov

Polymorfizmus	Gén	Exón	Nt substitúcia
Intrón 9	psen 1		T/G
Asn43	psen2	3	AAC→AAT
His87	psen2	4	CAC→CAT
Ala227	tau	9	GCA→GCG
Asn255	tau	9	AAT→AAC
Pro270	tau	9	CCG→CCA

Sekvenčná analýza APP génu

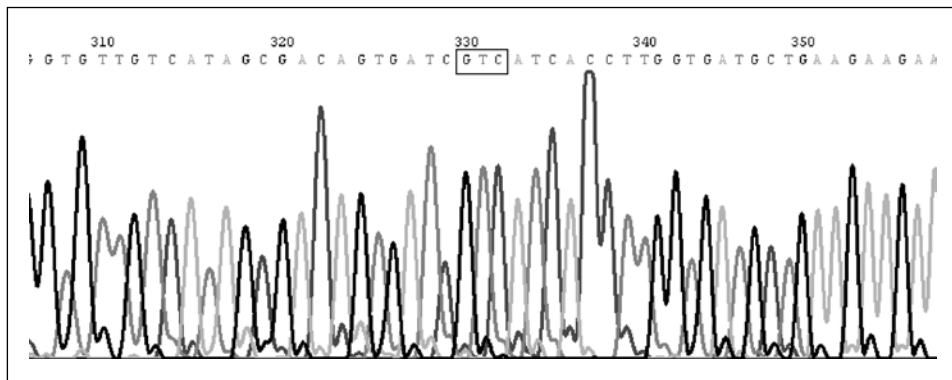
- Mutácia Val717Phe

Obrázok 24a. Na obrázku je znázornená nukleotidová sekvencia 17. exónu APP génu. U pacienta sa identifikovala mutácia v 17. exóne v géne pre amyloidový precursorový proteín: Val717Phe (GTC→TTC) (275341 G>T). Pacient je heterozygot pre mutáciu Val717Phe. Mutácia je patologická a má vplyv na fenotyp pacienta. Pacient má apoE genotyp E3/E3.



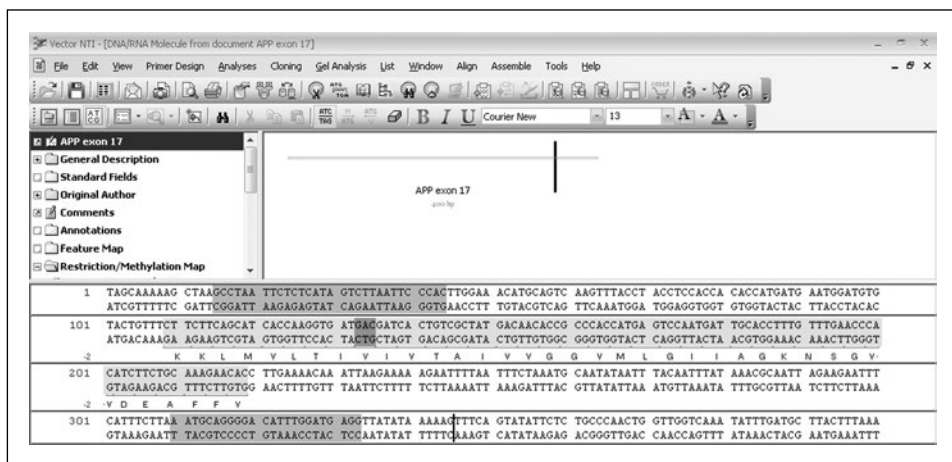
Symbol K znamená súčasnú prítomnosť G a T v tej istej polohe v analyzovanej nukleotidovej sekvencii. Poloha mutácie v sekvencii je znázornená šípkou nad nukleotidom, ktorý podlieha substitúcii.

Obrázok 24b. Na obrázku je znázornená nukleotidová sekvencia 17. exónu *APP* génu. Homozygot pre štandardnú alelu



Obrázok 25. Vyhodnotenie sekvenčnej analýzy exónu 17 *APP* génu v programe Vector NTI

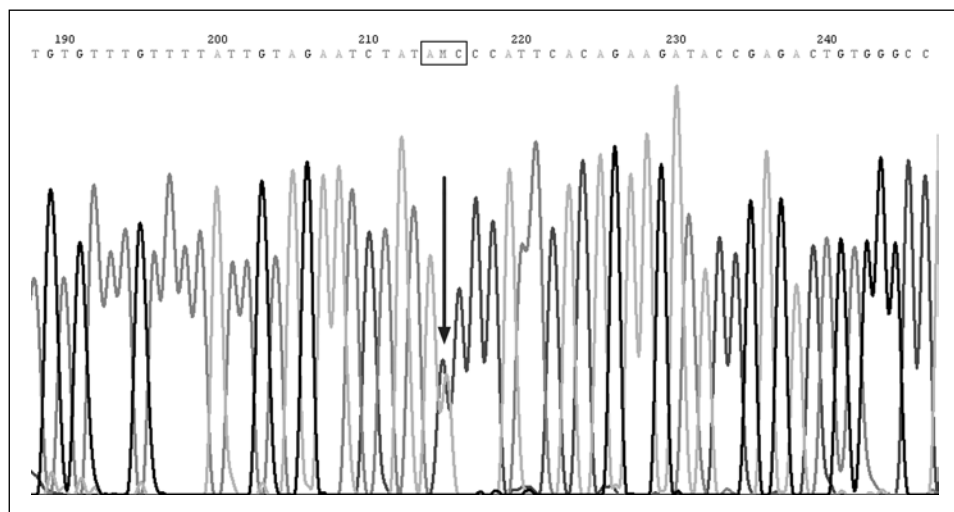
Na obrázku je znázornená referenčná kódujúca nukleotidová sekvencia 17. exónu *APP* génu, ohraničená sekvenciou v intrónoch, kde nasadajú primery použité v PCR. Kodón, v ktorom sa identifikovala mutácia Val717Phe (GTC→TTC).



Sekvenčná analýza *psen1* génu

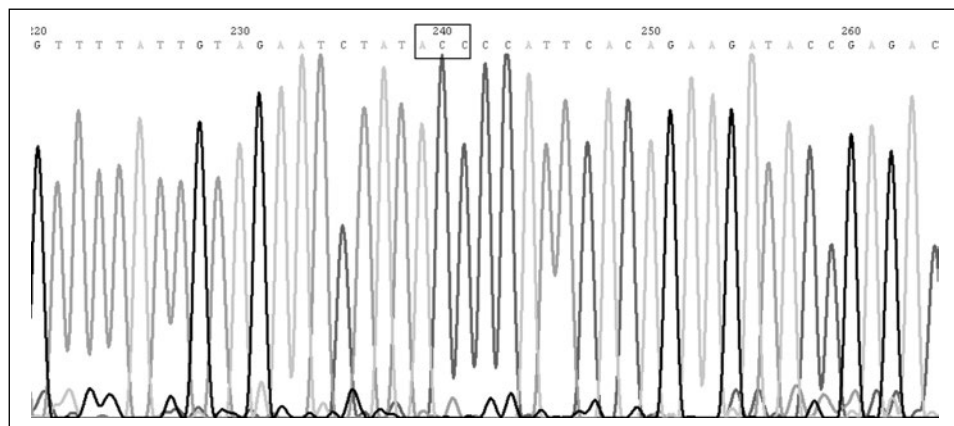
- Mutácia Thr116Asn

Obrázok 26a. Na obrázku je znázornená nukleotidová sekvencia exónu 5 génu *psen1*. U pacienta sa identifikovala mutácia v exóne 5 v géne *psen1*: Thr116Asn (ACC→AAC) (25500 C>A). Pacient je heterozygot pre mutáciu Thr116Asn. Mutácia je patologická a má vplyv na fenotyp pacienta. Pacient má apoE genotyp E3/E3



Symbol M znamená súčasnú prítomnosť C a A v tej istej polohe v analyzovanej nukleotidovej sekvencii. Poloha mutácie v sekvencii je znázornená šípkou nad nukleotidom, ktorý podlieha substitúcií.

Obrázok 26b. Na obrázku je znázornená nukleotidová sekvencia exónu 5 génu *psen1*. Homozygot pre štandardnú alelu



Obrázok 27. Vyhodnotenie sekvenčnej analýzy exónu 5 *psen1* génu v programe Vector NTI.

Na obrázku je znázornená referenčná kódujúca nukleotidová sekvencia 5. exónu *psen1* génu, ohraničená sekvenciou v intrónoch, kde nasadajú primery použité v PCR. Kodón, v ktorom sa identifikovala mutácia Thr116Asn (ACC→AAC).

Vector NTI - [DNA/RNA Molecule from document PS1 EXONS]

File Edit View Primer Design Analyses Cloning Gel Analysis List Window Align Assemble Tools Help

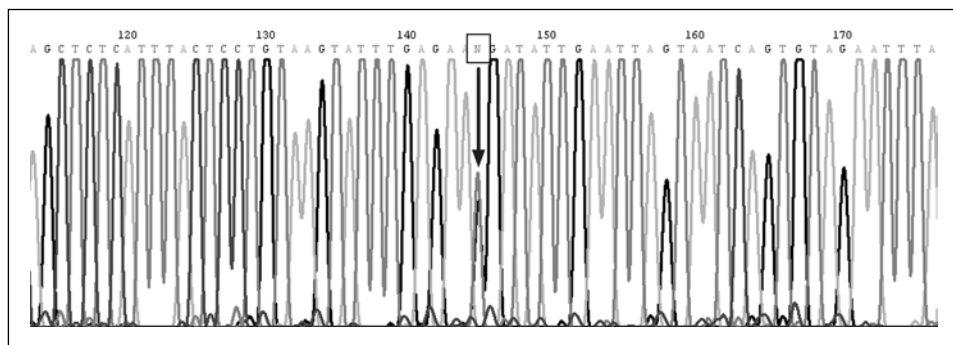
PS1 EXONS

General Description
Standard Fields
Original Author
Comments
Annotations
Feature Map
Restriction/Methylation Map

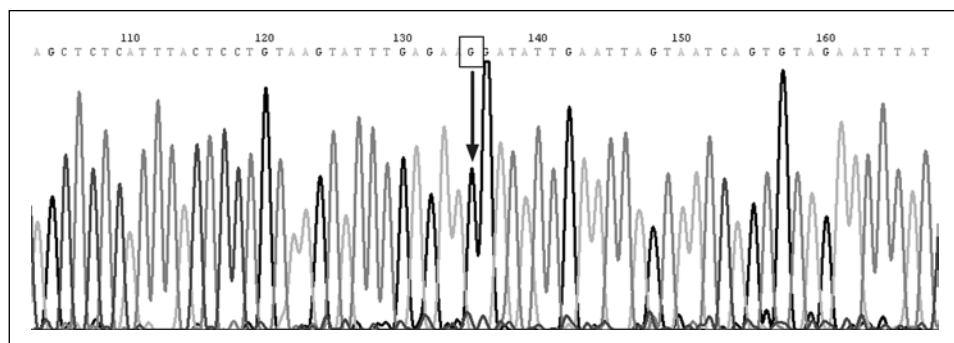
1	AATTGTGATG GGTATTATAA TTATTTCAAT ATAAAGCACC CACTAGATGG AGCCAGTGTC TGCCTTCACAT GTTAAAGTCCT TCTTTCCATA TGTTAGACAT
101	TTTCTTTGAA GCAATTTTAG AGTGTAGCTG TTTTCTCTAG GTTAAAAAAT CTTAGCTAGA TTGGTGAGTT GGGGAAAAGT GACTTATAAG ATACGAATTG
	AAAGAACTT CTTTAAATC TCACATCGAC AAAAAGAGTC CAATTTTAA GAATCGATCT AACCACTCAA CCCCCTTTTCA CTGAATATTC TATGCTTAAAC
	Be Typ
101 bp	AATTAAGAAA AAGAAAATTC TGTGTTGGAG GTGGTAATGT GGTGGTGTAT CTCCATTAAC ACTGACCTAG GGCCTTTTGT TTTGTTTTAT TOTAGAATCT
	TTAATCTTTT TCTTTTAAAG ACACAACCTC CACCATTACA CCAACGACTA GAGGTAATTG TGACTGGATC CCGAAAACAC AAACAAAATA ACATCTTAGA
	Trp Thr Pro Phe Thr Glu Asp Thr Glu Thr Val Gly Gln Arg Ala Leu His Ser Be Leu Asn Ala Ala Be Met Be Ser Val Be Val Val Met Thr Be
301	ATACCCCATC CACAGAAGAT ACCGAGACTG TGGGCCAGAG AGCCCTGCAC TCAATCTGTA ATGCTGCCAT CATGATCAGT GTCATTGTTG TCATGACTAT
	TATGGGGTAA GTGTCTTCTA TGGTCTCGAC ACCCGGCTCT TCGGAGCTGT AGTTAAGACT TACGACGGTA GTACTAGTCA CAGTAACAC AGTACTGATA
	Be Leu Leu Val Val Leu Tyr Lys Tyr Arg Cys Tyr Lys
401	CCTCCTGGTG GTTCTGTATA AATACAGGTG CTATAAGGTG AGCATGAGAC ACAGATCTTT GCTTTCACC CTGTTCTCTT TATGGTTGGG TATTCTTGTC
	GGAGGACCAC CAAGACATAT TTATGTCCAC GATATTCCAC TGCTACTCTG TGCTAGAAA CGAAGGTGG GACAAGAAGA ATACCAACCC ATAAGAACAG
501	ACAGTAACCT AACTGATCTA GGAAGAAGAA AATGTTTTGT CTCTAGAGA TAAGTTAATT TTATGTTTTT TTCTCTCTCA CTGTGGAAAC TTCAAAAAAT
	TGTCATTGAA TTGACTAGAT CCTTCTTTT TTACAAAAAC GAAGATCTCT ATTCAATTAA AAATCAAAG AAGGAGGAGT GACACCTTGT AAGTTTTTTA

- Polymorfizmus v intróne 9 (T/G).

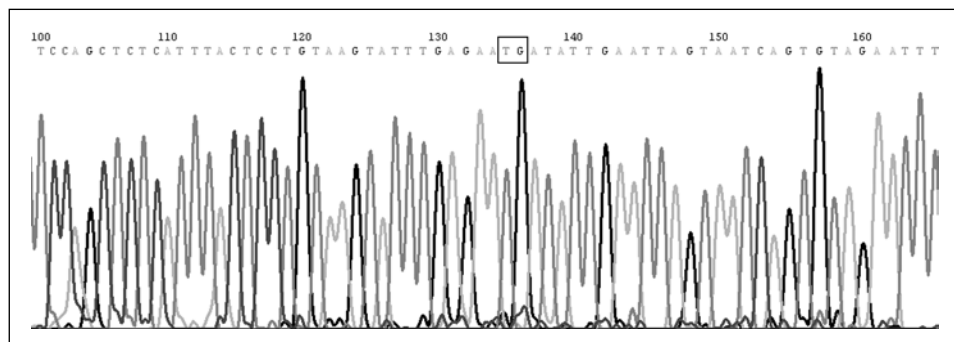
Obrázok 28a. U pacienta sa identifikoval polymorfizmus v intróne 9 (T/G) v géne pre presenilín1. Daný polymorfizmus v nekódujúcej oblasti nie je patologický a nemá vplyv na fenotyp pacienta. Pacient je heterozygot pre daný polymorfizmus. Poloha polymorfizmu v sekvencii je znázornená šípkou nad nukleotidom, ktorý podlieha substitúcií



Obrázok 28b. U pacienta sa identifikoval polymorfizmus v intróne 9 (T/G) v géne pre presenilín1. Pacient je homozygot pre daný polymorfizmus. Poloha polymorfizmu v sekvencii je znázornená šípkou nad nukleotidom, ktorý podlieha substitúcii



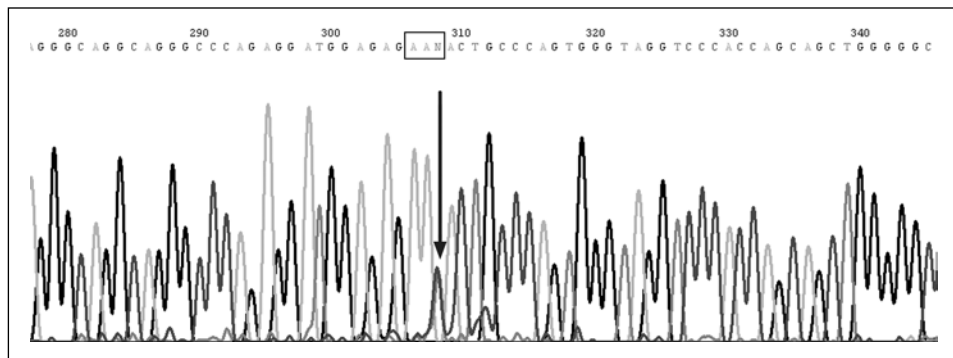
Obrázok 28c. Homozygot pre štandardnú alelu



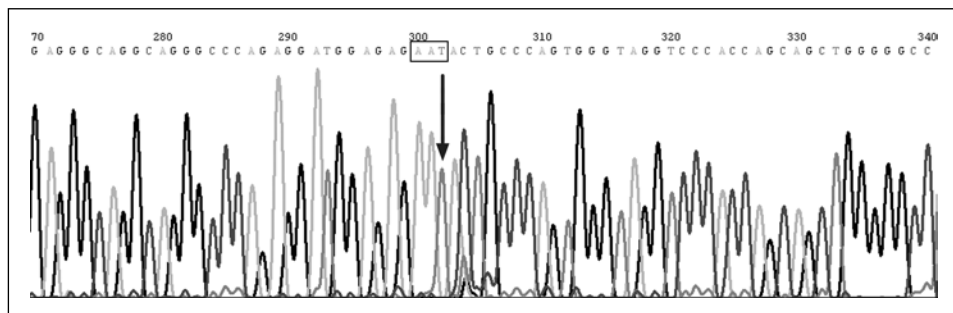
Sekvenčná analýza *psen2* génu

- Polymorfizmus Asn 43

Obrázok 29a. U pacienta sa identifikoval polymorfizmus v exóne 3 v géne pre presenilín2 Asn 43 (AAC→AAT). Daný polymorfizmus je tichý, nie je patologický a nemá vplyv na fenotyp pacienta. Pacient je heterozygot pre daný polymorfizmus. Poloha polymorfizmu v sekvencii je znázornená šípkou nad nukleotidom, ktorý podlieha substitúcii

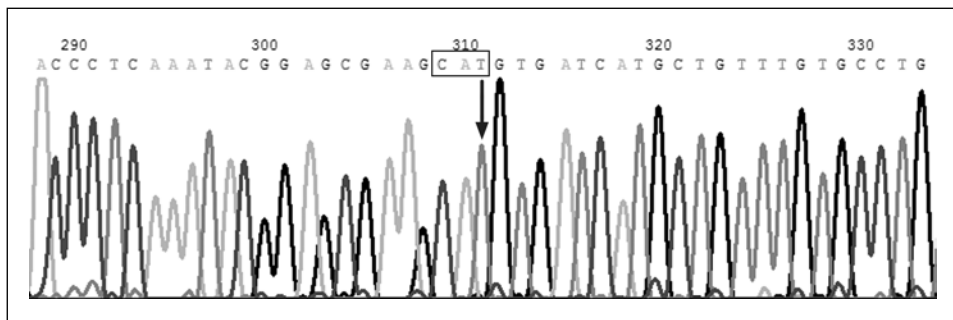


Obrázok 29b. U pacienta sa identifikoval polymorfizmus v exóne 3 v géne pre presenilín2 Asn 43 (AAC→AAT). Pacient je homozygot pre daný polymorfizmus. Poloha polymorfizmu v sekvencii je znázornená šípkou nad nukleotidom, ktorý podlieha substitúcii

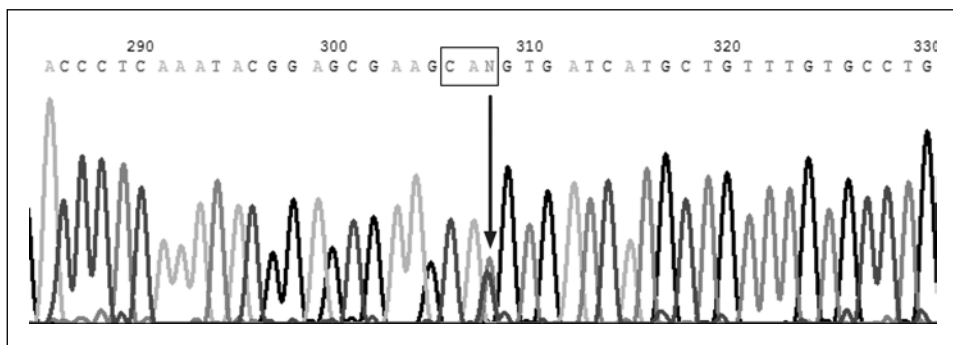


- Polymorfizmus His87

Obrázok 30a. U pacienta sa identifikoval polymorfizmus v exóne 4 v géne pre presenilín2 His87 (CAC→CAT). Daný polymorfizmus je tichý, nie je patologický a nemá vplyv na fenotyp pacienta. Pacient je homozygot pre daný polymorfizmus. Poloha polymorfizmu v sekvencii je znázornená šípkou nad nukleotidom, ktorý podlieha substitúcii



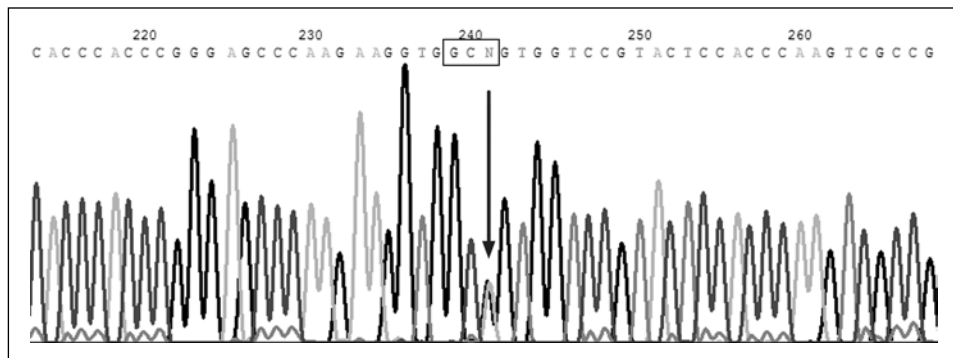
Obrázok 30b. Pacient je heterozygot pre polymorfizmus His87 (CAC→CAT) v exóne 4. Poloha polymorfizmu v sekvencii je znázornená šípkou nad nukleotidom, ktorý podlieha substitúcii



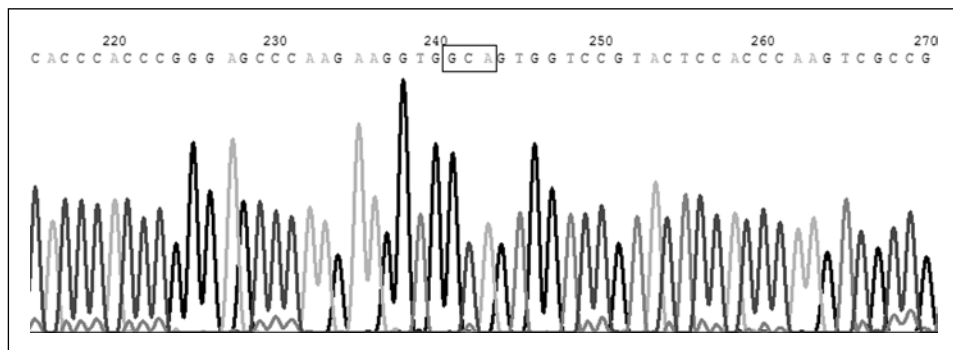
Sekvenčná analýza tau génu

- Polymorfizmus Ala227

Obrázok 31a. U pacienta sa identifikoval polymorfizmus Ala227 (GCA→GCG) v exóne 9 v géne pre tau. Daný polymorfizmus je tichý, nie je patologický a nemá vplyv na fenotyp pacienta. Pacient je heterozygot pre daný polymorfizmus. Poloha polymorfizmu v sekvencii je znázornená šípkou nad nukleotidom, ktorý podlieha substitúcii

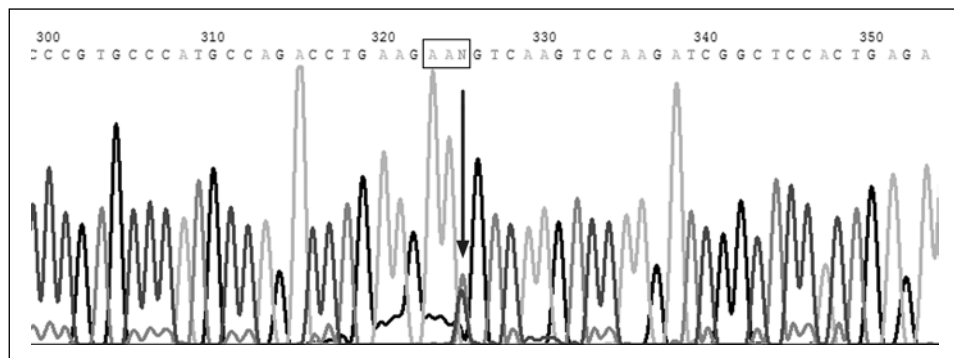


Obrázok 31b. Homozygot pre štandardnú alelu

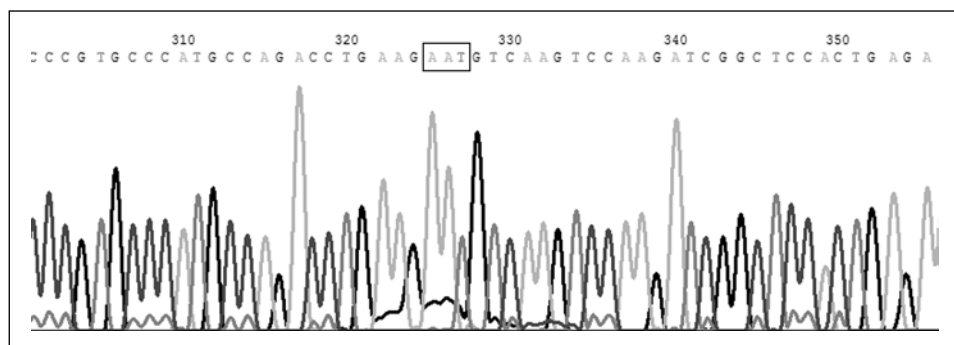


- Polymorfizmus Asn255

Obrázok 32a. U pacienta sa identifikoval polymorfizmus Asn255 (AAT→AAC) v exóne 9 v géne pre tau. Pacient je heterozygot pre daný polymorfizmus. Daný polymorfizmus je tichý, nie je patologický a nemá vplyv na fenotyp pacienta. Poloha polymorfizmu v sekvencii je znázornená šípkou nad nukleotidom, ktorý podlieha substitúcii

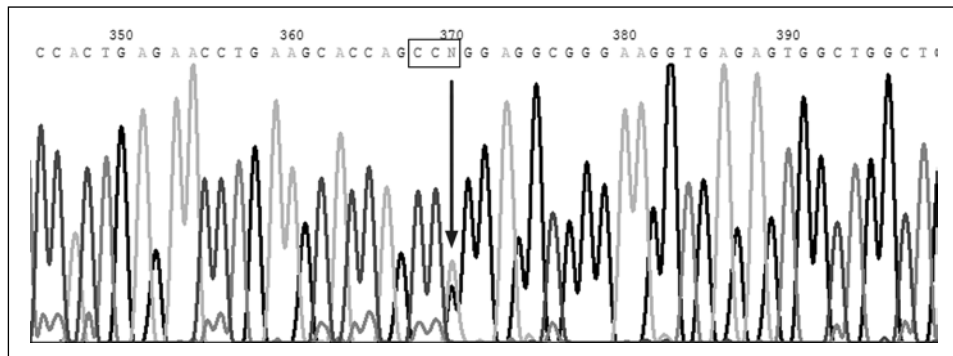


Obrázok 32b. Homozygot pre štandardnú alelu

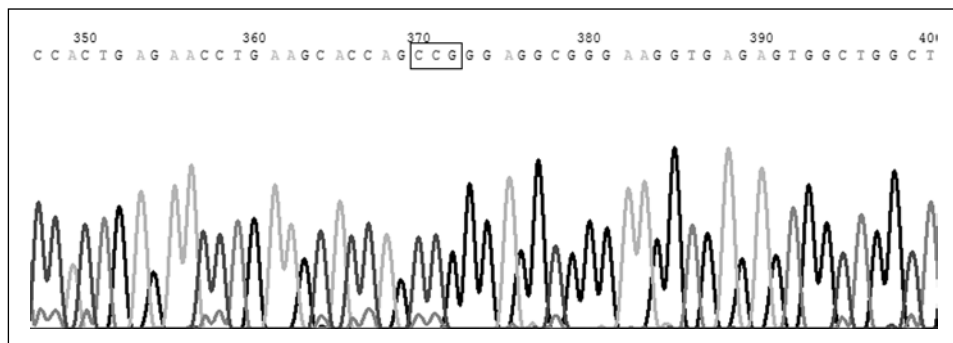


- Polymorfizmus Pro270

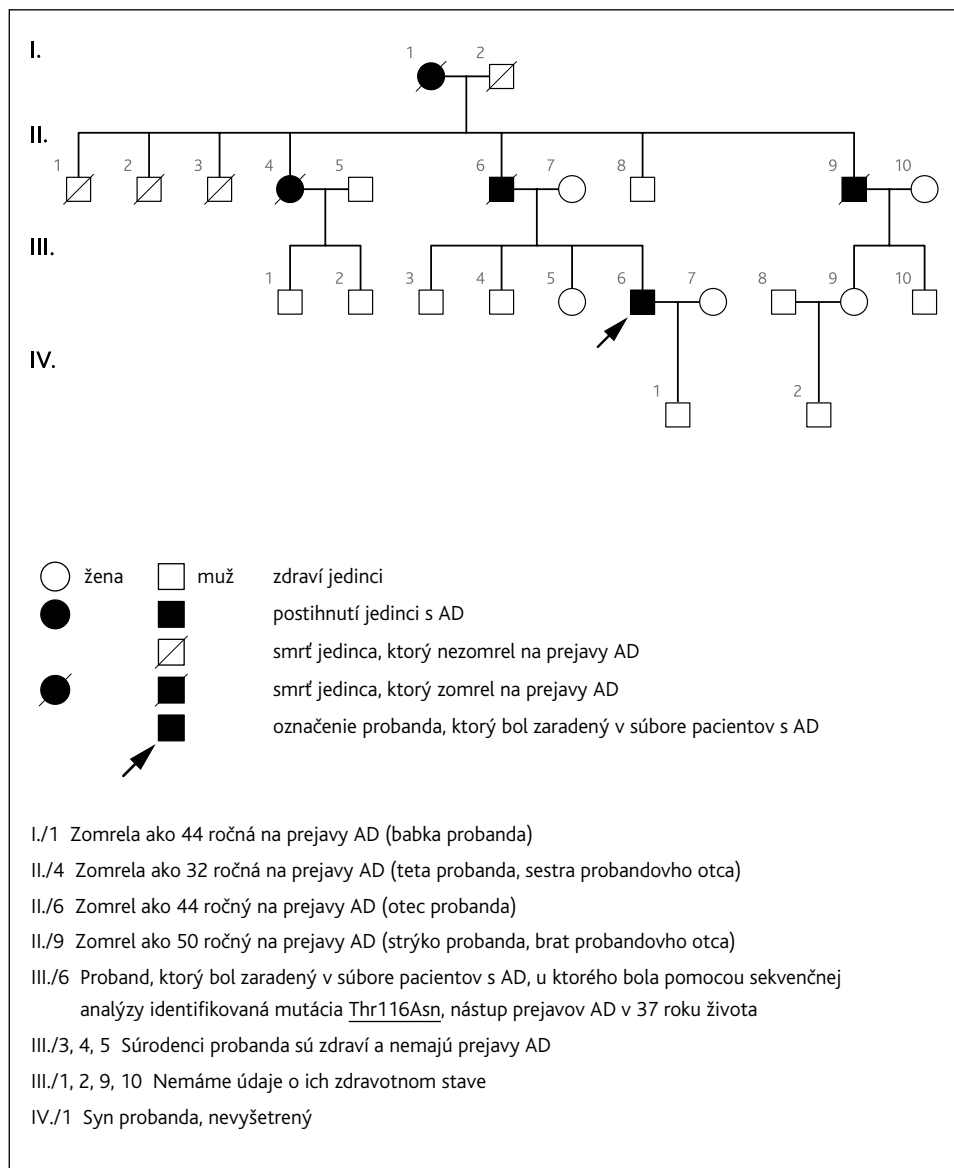
Obrázok 33a. U pacienta sa identifikoval polymorfizmus Pro270 (CCG→CCA) v exóne 9 v géne pre tau. Pacient je heterozygot pre daný polymorfizmus. Daný polymorfizmus je tichý, nie je patologický a nemá vplyv na fenotyp pacienta. Poloha polymorfizmu v sekvencii je znázornená šípkou nad nukleotidom, ktorý podlieha substitúcii



Obrázok 33b. Homozygot pre štandardnú alelu



Obrázok 34. Rodokmeň rodiny s familiárnou formou Alzheimerovej choroby. V rodine bola identifikovaná mutácia Thr116Asn v exóne 5 v géne *psen1*. Rodokmeň typický pre ochorenie s autozómovo dominantnou dedičnosťou, kde vidíme postihnutých jedincov v každej generácii. Postihnutí sú aj muži aj ženy. Proband je heterozygot pre mutáciu Thr116Asn. V rodokmeni vidíme segregáciu mutovanej alely medzi generáciami



6. DISKUSIA

Alzheimerova choroba (AD) je neurodegeneratívne ochorenie s charakteristickou neuropatológiou, ktorá zahŕňa prítomnosť intraneuronálnych neurofibrilárných spletí a prítomnosť amyloidových a senilných plakov v extracelulárnom priestore. Predstavuje najčastejšiu formu progresívnej demencie. V dôsledku vysokej prevalencie a ireverzibilného priebehu ochorenia predstavuje závažný medicínsky a socio-ekonomický problém. Zvýšenie strednej dĺžky života v ekonomicky vyspelých krajinách prináša aj sprievodný jav ako je nárast pacientov s demenciou a preto sa nám orientácia na túto problematiku zdá byť vysoko aktuálna a prínosná. AD postihuje asi 1,4 % osôb v rozvinutých krajinách. Prevalencia AD je okolo 1% u jedincov vo veku 60-64, okolo 4% u jedincov vo veku 65-74 rokov a narastá exponenciálne s vekom. (*Campion a kol., 1999; Kukull a kol., 2002; Rocca, 1991*).

Alzheimerova choroba so skorým nástupom ochorenia a familiárnym výskytom (FAD) zodpovedá za 10% všetkých AD prípadov. 13% FAD so skorým nástupom predstavuje familiárna forma s autozómovo dominantnou dedičnosťou (ADFAD) (*Campion a kol., 1999*). Doposiaľ boli identifikované tri kauzálne gény (*APP, psen1, psen2*), ktorých mutácie vedú k ADFAD so skorým nástupom. Mutácie v daných génoch vysvetľujú 70 % prípadov ADFAD a teda zodpovedajú za menej ako 1 % všetkých prípadov AD. AD s neskorým nástupom, či už s familiárnym (okolo 15% AD prípadov) alebo sporadickým výskytom (okolo 75% AD prípadov), je podmienená multifaktoriálne, predpokladá sa súhra genetických a environmentálnych rizikových faktorov (*Lautenschlager a kol., 1996; Rocca a kol., 1991*). Alela *e4* apolipoproteínu E sa považuje za hlavný rizikový faktor v prípade sporadickej aj familiárnej formy s neskorým nástupom.

V našej práci sme sa sústredili na určenie genetických rizikových faktorov, ktoré majú úlohu v patogenéze AD v súbore slovenských pacientov. Analyzovaný súbor tvorilo 58 pacientov, u ktorých bola klinicky stanovená Alzheimerova choroba podľa diagnostických kritérií DSM-IV a NINCDS-ADRDA na I. Neurologickej klinike LF UK a UNB. Pacientov s AD sme nerozdelili do kategórie familiárnej a sporadickej formy AD, keďže sme nemali presné údaje o veku nástupu ochorenia a rodinnej anamnéze.

V prvej etape našej práce sme sa zamerali na určenie frekvencie definovaného rizikového genetického determinantu apoE4 izoformy. Genotypizáciu apoE sme uskutočnili v kontrolnom súbore a v súbore pacientov s AD. Kontrolný súbor tvorilo 100 žien (200 aliel) a 100 mužov (200 aliel) bez podozrenia na AD. Genotypy apoE sme percentuálne vyhodnotili u 56 pacientov s AD. Pri percentuálnom hodnotení podielu jednotlivých apoE variant sme zo súboru pacientov s AD vynechali dvoch pacientov, nakoľko sme následne u pacientov identifikovali kauzálne mutácie v iných génoch. Keďže sme u nich našli mutácie v iných génoch, tak sme usúdili, že ide o familiárnu formu AD. Pacienti mali apoE genotyp E3/E3 a preto mohli výrazne skresliť pomer medzi jednotlivými apoE variantami. Podiel izoformami apoE v súbore pacientov s AD bol E3: 61,61%, E4: 34,82%, E2: 3,57%. Zastúpenie izoformami apoE v kontrolnom súbore (muži+ženy, 400 aliel) bolo E3: 83,25, E4: 9,75%, E2: 7,0%. Na analýzu rozdielov v rozložení premenných medzi dvoma štatistickými skupinami sme použili Fisherov exaktný test. Ako štatisticky významná bola hodnotená hladina významnosti $P < 0,05$, čo značí, že sú skúmané

znaky štatisticky signifikantne odlišné. Podľa Fisherovho exaktného testu sú rozdiely v zastúpení jednotlivých izoforiem apoE medzi súborom pacientov s AD a kontrolným súborom štatisticky signifikantne významné (hodnota P sa blíži 0, $P=0,000$). Teda môžeme zhodnotiť, že sa výrazne líšil podiel jednotlivých apoE variant medzi súbormi.

V prípade zastúpenia apoE variant v kontrolnom súbore (E3: 83,25, E4: 9,75%, E2: 7,0%) sú naše údaje podobné ako je popísané v literatúre. Analýzou alelovej distribúcie apoE v rôznych populáciách sa zistilo, že alela e3 je celkovo najfrekventovanejšia. Najčastejšia varianta apoE3 sa vyskytuje približne u 75% kaukazoidnej populácie. Druhá varianta E4 je zastúpená u 15%, varianta E2 je zastúpená u 10% kaukazoidnej populácie (*Poirier a kol., 1993*). Alelové frekvencie sa v jednotlivých populáciách líšia. Číňania a Japonci majú najvyššiu frekvenciu e3 (0,81-0,91) a najnižšiu e4 (0,07-0,09). Afroameričania a Afričania mali najnižšiu frekvenciu e3 (0,49-0,71) a najvyššiu e4 (0,21-0,40). Frekvencia e4 alely je vyššia v severnej Európe v porovnaní s južnou (*Gerdas a kol., 1992; Hallman a kol., 1991; Hendrie a kol., 1995; Kamboh a kol., 1989*).

V súbore pacientov s AD sa nachádzalo 31 žien a 25 mužov. V zastúpení apoE izoforiem (E3, E4, E2) medzi pohlaviami v súbore pacientov s AD nie sú rozdiely štatisticky signifikantne významné ($P=0,216$). Zastúpenie jednotlivých variant bolo medzi pohlaviami veľmi podobné. V niektorých prácach sa zistila vyššia frekvencia alely e4 u žien s AD, hlavne vo veku 60-70 rokov. Takmer 100% žien vo veku 85 s aspoň jednou e4 alelou malo AD na rozdiel od mužov, kde to bolo 50% (*Corder a kol., 1995*). Taktiež v zastúpení apoE izoforiem (E3, E4, E2) medzi pohlaviami v kontrolnom súbore nie sú rozdiely štatisticky signifikantne významné ($P=0,434$).

V súbore pacientov s AD sa alela e4 vyskytovala vo výrazne vyššej frekvencii (34,82%) v porovnaní s kontrolným súborom (9,75%). Podľa Fisherovho exaktného testu je podiel E4 u pacientov s AD a v kontrolnom súbore vysoko signifikantne odlišný ($P=0,000$). Nami zistené údaje sa zhodujú s údajmi v literatúre, kde sa popisuje zvýšená frekvencia apoE e4 alely u pacientov s AD a uznáva sa e4 ako rizikový faktor pre AD. Pericak-Vance a kol., (1991) genetickým mapovaním určili apoE gén na chromozóme 19 ako kandidátny lokus pre Alzheimerovu chorobu s neskorým nástupom ochorenia. Ďalšia skupina sledovala lipidy v mozgu u pacientov s AD a s použitím protilátok k apoE, zistili, že apoE je spojený s amyloidom v senilných plakoch (*Namba a kol., 1991; Wisniewski a Frangione, 1992*). Následne sa začala sledovať genetická a biologická asociácia apoE s AD s neskorým nástupom. Dokonca prvá asociácia medzi apoE4 a demenciou bola zaznamenaná v roku 1989 (*Shimano a kol.*), kde sa u pacientov trpiacich demenciou zistila výrazne zvýšená frekvencia alely e4 v porovnaní s kontrolami. Vzťah apoE4 medzi sporadickou AD a familiárnou AD s neskorým nástupom ochorenia bol dokázaný v mnohých štúdiách (*Bertram a kol., 2007; Corder a kol., 1993; Farrer a kol., 1997; Strittmatter a kol., 1993*). Analýzou polymorfizmov v kontrolnej populácii a u pacientov s AD, sa u pacientov s AD zistila zvýšená frekvencia e4 alely (40-50%) a znížená frekvencia e2 alely (2%) (*Corder a kol., 1994; Saunders a kol., 1993*). Nezávislé štúdie (*Arend a kol., 1997; Corder a kol., 1993*) zistili, že apoE zvyšuje riziko na AD od dávky závislým spôsobom. Jedinci, ktorí majú dve e4 alely majú vyššie riziko na AD a rýchlejší nástup ochorenia ako jedinci s jednou alelou e4. V štúdiu Corder a kol. (1995), kde sledovali 42 rodín s AD s neskorým nástupom

ochorenia, našli riziko na AD o 2,8 krát vyššie u nositeľov jednej alely e4 a o 8 krát vyššie u jedincov s dvomi e4 alelami v porovnaní s kontrolami. Aj v ďalších štúdiách sa zistilo, že prítomnosť jednej e4 alely zvyšuje riziko na AD dva až trojnásobne a prítomnosť oboch alel dvanásť až pätnásťnásobne v porovnaní s kontrolou (Bertram a kol., 2009; Farrer a kol., 1997). V populačnej štúdii na kaukazoidnej populácii (Myers a kol., 1996) zistili, že celková incidencia AD sa zvyšuje od dávky závislým spôsobom, kde sa u 55% s genotypom apoE E4/E4 vyvinula AD vo veku 80 rokov, v porovnaní so skupinou E3/E4 kde sa u 27% vyvinula AD vo veku 85 a u 9% E3/E3 sa vyvinula AD vo veku 85 rokov.

Najjasnejším dôkazom vplyvu apoE e4 alely, je vplyv na vek nástupu klinických príznakov AD. Zistil sa vzťah medzi počtom alel e4 a vekom nástupu AD. Homozygoti E4/E4 majú skorší nástup ochorenia (priemerný vek < 70) v porovnaní s heterozygotmi. Každá kópia alely e4 znižuje vek nástupu o 10 rokov. Heterozygoti E2/E3 mali priemerný vek nástupu viac ako 85 rokov. Priemerný vek nástupu u jedincov bez e4 alely bol 84,3, u heterozygotov e4 bol 75,5 a homozygotov e4 bol 68,8 (Corder a kol., 1993). Taktiež sa dokázalo, že alela e2 je protektívna voči AD (Corder a kol., 1994).

Farrer a kol. (1997) v populačnej štúdii na 4858 jedincov sledovali vplyv apoE e4 na pohlavie, vek a etnicitu. Zistili zvýšené riziko na AD v prítomnosti apoE e4 alely u skupiny vo veku 40-90 rokov, ale riziko bolo najvyššie vo veku 60-75 rokov s poklesom po veku 70 rokov. Aj ďalšie skupiny dokázali, že riziko na AD vplyvom apoE e4 alely je vyššie vo veku okolo 60-70, s poklesom rizika vo vyššom veku. Táto veková hranica môže byť v dôsledku, že apoE e4 znižuje vek nástupu ochorenia, a vedie k agresívnej forme AD a tým aj ku kratšiemu prežitiu. Taktiež sa predpokladá vplyv ďalších genetických a negenetických faktorov, ktoré reagujú s apoE e4 od veku závislým spôsobom.

V mnohých prácach sa popisuje zvýšený rizikový vplyv apoE e4 na vývoj kognitívnych zmien v skorších klinických štádiách ochorenia a slabší v neskorších fázach ochorenia (Cosentino a kol., 2008; Juva a kol., 2000).

V štúdiách na etnických skupinách sa dokázal výrazne nižší vplyv apoE e4 alely na vývoj AD u Afroameričanov a Hispáncov v porovnaní s kaukazoidnou populáciou. Farrer a kol. (1997) v štúdii u Afroameričanov nezistil žiadne zvýšené riziko na AD v skupine apoE E4/E3 a pomerne malé riziko u skupiny E4/E4. Potvrdila sa tak heterogenita etnických skupín k apoE. Tang a kol. (1998) zistili, že aj v prítomnosti alely e4 nie je zvýšené riziko na AD v štúdii na Afroameričanoch a Hispáncoch. Dokonca v prípade absencie e4 bolo riziko na AD u Afroameričanov o 4 krát vyššie a u Hispáncov o 2 krát vyššie. Z tohto vyplýva, že musia byť prítomné aj iné genetické a negenetické rizikové faktory u týchto etnických skupín, ktoré vedú k vývinu AD v prípade ak nemajú e4 alelu. A prítomnosť faktorov, ktoré chránia vývin AD u nositeľov e4 alely.

Taktiež sa pozorovalo, že v rodinách s popísanou mutáciou v APP géne (APP717), prítomná alela e4 urýchlila nástup ochorenia. U jedincov s danou mutáciou a prítomnou alelou e2 sa zvýšil vek nástupu ochorenia (St George-Hyslop a kol., 1994). V rodinách s popísanou mutáciou v presenilínoch sa však nepozoroval vplyv alely e4 (Levy-Lahad a kol., 1995).

Význam stanovenia apoE genotypu pri diagnostike AD sledovalo množstvo klinických štúdií. V týchto štúdiách sa nepotvrdil význam samostatného stanovenia genotypu apoE pri diagnostike AD v klinickej praxi. Mayeux a kol. (1998) stanovovali presnosť samotnej klinickej diagnózy AD, samotného genotypovania apoE pri diagnóze AD a ich kombináciu na 2188 pacientov zo 26 centier. V prípade samotnej klinickej diagnózy AD bola senzitivita 93% a špecificita 55%. V prípade samotného genotypovania apoE bola senzitivita 65% a špecificita 68%. V prípade klinickej diagnózy AD, genotypovanie apoE spôsobilo pokles senzitivity na 61% a zvýšil špecificitu na 84%, teda zredukoval falošne pozitívne prípady. Ak nebola stanovená klinická diagnóza AD, genotypovanie apoE zvýšilo senzitivitu na 94% ale špecificita poklesla na 37%, čomu nasvedčovalo veľa falošne pozitívnych prípadov diagnostikovania AD u jedincov s alelou e4, ktorí však nemali patologické príznaky. Aj napriek tomu, že genotypovanie apoE zvýšilo špecificitu a teda pokles falošne pozitívnych prípadov, v prípade ak bola stanovená aj klinická diagnóza AD, stále sú prítomní jedinci bez alely e4 s patologickými príznakmi AD a ako aj sú jedinci, ktorí majú e4 alelu a nemajú patológiu AD. Preto sa v niektorých prácach hodnotí, že stanovenie genotypu apoE pri diagnóze AD má informatívny charakter a nie je samostatnou spoľahlivou metódou. Význam má len v kombinácii s klinickou diagnózou.

Podľa Fisherovho exaktného testu sú rozdiely v zastúpení jednotlivých genotypov apoE medzi súborom pacientov s AD a kontrolným súborom štatisticky signifikantne významné ($P=0,000$). V našom súbore pacientov s AD dominoval genotyp E3/E4 (48,2%), genotyp E4/E4 bol identifikovaný u 10,7%. Celkovo alela e4 bola zastúpená u 34,82%. To by mohlo naznačovať, že existuje súvis s vývojom AD u daných pacientov s prítomnou jednou alebo dvomi e4 alelami. Mohli by sme teda pripisovať význam prítomnej apoE e4 alele pri vývoji ochorenia u pacientov s klinicky diagnostikovanou AD. Pacientov s genotypom E3/E4 (27 pacientov) a E4/E4 (6 pacientov) by sme mohli klasifikovať ako pacientov so sporadickou formou AD. U 23 pacientov, u ktorých sa alela e4 neidentifikovala, môžeme predpokladať vplyv iných genetických faktorov a faktorov negenetických. Keďže sa popisuje množstvo faktorov, ktoré hrajú úlohu pri vývine AD, ako sú aj faktory životosprávy, socio-ekonomické faktory, zdravotný stav pacienta a mnoho ďalších. Alela e2 bola v súbore pacientov zastúpená len u 3,57%, čo je približne polovica v porovnaní s kontrolným súborom. Čo môže súvisieť s tým, že alela e2 je protektívna voči AD.

Populačné riziko na AD v dôsledku prítomnej apoE e4 alely sa stanovilo na približne 20-70% (Breitner a kol., 1999). Čo nasvedčuje vplyvu aj iných génov na vývin AD v prípade sporadickej AD a AD s neskorým nástupom ochorenia. Väčšina foriem AD má komplexný genetický základ daný jedným alebo viacerými nezávisle pôsobiacimi génmi s neúplnou penetranciou, mnohými interagujúcimi génmi alebo kombináciou genetických faktorov a faktorov životného prostredia. Zvýšené riziko apoE e4 alely na vývin AD sa však jednoznačne dokázalo.

V ďalšej etape našej práce sme sa zamerali na optimalizáciu podmienok pre identifikáciu mutácií v kandidátnych génoch. Bolo potrebné navrhnuť vhodné primery a podmienky PCR reakcie na amplifikáciu *APP* génu (exón 16, 17), *psen1* génu (exóny 3-12), *psen2* génu (3-12) a génu *tau* (exóny 9-11). Primery potrebné pre PCR sme si navrhovali buď sami v programe Vector NTI pričom sme čerpali z prác popisujúcich molekulárno-genetickú analýzu AD alebo

sme použili komerčne nasyntetizované primery (VariantSeqR Resequencing system). Vhodné podmienky PCR, ako sú komponenty reakcie a ich koncentrácia a teplotný profil PCR sme si navrhli sami v našom laboratóriu. Po optimalizácii PCR podmienok sme pristúpili k samotnej sekvenčnej analýze exónov.

Sekvenčnú analýzu sme uskutočnili u všetkých 58 pacientov s AD. V *APP* géne sme identifikovali bodovú mutáciu Val717Phe, v *psen1* géne sme identifikovali bodovú mutáciu Thr116Asn. Taktiež sme v génoch identifikovali niekoľko polymorfizmov: v intróne 9 (T/G) v *psen1* géne, polymorfizmy Asn43 a His87 v *psen2* géne a polymorfizmy Ala227, Asn255, Pro270 v *tau* géne.

Mutáciu v 17. exóne v géne pre amyloidový prekursorový proteín, Val717Phe (GTC→TTC) (275341 G>T) sme identifikovali u jedného pacienta. Pacient je heterozygot pre danú mutáciu a má apoE genotyp E3/E3. Pacient, u ktorého bola mutácia zistená pochádza z rodiny, kde daná mutácia bola identifikovaná po prvýkrát u jeho brata na Neuroimunologickom ústave SAV v Bratislave. Pacientovi sa prvé príznaky začali prejavovať vo veku 39 rokov. U pacienta v rodine mala danú mutáciu ešte aj jeho sestra. V našom laboratóriu sme sekvenčnú analýzu uskutočnili aj u jeho ďalšieho brata. U neho nebola mutácia prítomná. Daná mutácia segregovala v rodine a v jednej generácii boli postihnutí až traja súrodenci. Mutácia v géne *APP* je patologická a má vplyv na fenotyp pacienta. Prítomnosť mutácie sa považuje za kauzálnu ku vzniku familiárnej Alzheimerovej choroby so skorým nástupom ochorenia keďže je dedičnosť AD autozómovo dominantná a klinicky sa manifestuje už u heterozygotov. Molekulárnym podkladom mutácie Val717Phe je transverzia guanínu (G) za tymín (T) v nukleotidovej pozícii 275341 v exóne 17 *APP* génu, čo vedie k zámene aminokyseliny valín za fenylalanín v pozícii proteínu 717. V danej pozícii nastávajú aj iné zmeny (Val717Ile, Val717Leu, Val717Gly). Mutácia Val717Phe bola po prvýkrát popísaná Murell a kol. v roku 1991. Je popísaná ako Indiánska mutácia. Doposiaľ bola popísaná v troch rodinách. Priemerný vek nástupu ochorenia je 41,2 roka. Murell a kol. popisujú mutáciu v jednej rodine u 4 pacientov, kde vek nástupu varíroval od 41 do 52 rokov. Ochorenie trvalo okolo 6-8 rokov a následne pacienti zomreli (vek 48-53 rokov). Finckh a kol. (2005) popisujú 1 pacienta s danou mutáciou s vekom nástupu 38 rokov. Pacient bol z Rakúska. Taktiež popisujú v ďalšej rodine výskyt troch pacientov s danou mutáciou. Priemerný vek nástupu ochorenia varíroval od 37 do 43 rokov. Rodina pochádzala z Nemecka (kaukazoidná populácia). Mutácia je lokalizovaná v transmembránovej doméne proteínu APP v blízkosti γ -sekretázového miesta. Mutácia má vplyv na štiepenie APP a vedie k výrazne zvýšenej tvorbe A β 42 a teda je zvýšený aj pomer A β 42/ A β 40.

Ďalšiu mutáciu Thr116Asn (ACC→AAC) (25500 C>A) v 5. exóne v *psen1* géne sme identifikovali taktiež u jedného pacienta. Pacient je heterozygot pre danú mutáciu a má apoE genotyp E3/E3. Sekvenčnú analýzu sme uskutočnili aj u jeho brata, ktorý nemal danú mutáciu. Podarilo sa nám zistiť informácie o pacientovej rodine a zostaviť rodokmeň (obrázok 34). V rodokmeni môžeme sledovať ako v rodine segreguje mutácia a autozómovo dominantný spôsob dedičnosti AD. Zachytili sme až tri generácie. V prvej generácii je babka nášho probanda (I/1) postihnutá AD a nositeľkou mutácie. Zomrela ako 44 ročná na prejavy AD. Jej manžel (I/2) zomrel ako 64 ročný, nemal príznaky AD. V druhej generácii sledujeme otca

nášho probanda (II/6), ktorý pozoroval príznaky už od 36. roka života a zomrel ako 44 ročný na prejavy AD. Probandov otec mal 6 súrodencov. Jeho sestra (II/4) zomrela na AD vo veku 32 rokov. Má dvoch synov (III/1, 2), o ich zdravotnom stave však nemáme informácie. Ďalší brat probandovho otca (II/9) zomrel vo veku 50 rokov na AD, má dve deti, o ich zdravotnom stave však tiež nemáme informácie. Traja súrodenci (III/3, 4, 5) probandovho otca nemali AD a zomreli starší ako 70 rokov bez príznakov ochorenia. V druhej generácii sú teda až traja postihnutí s AD. U zdravých jedincov z rodiny ani ich potomkovia nebudú mať AD, keďže ich rodičia nie sú nositeľmi mutácie. V tretej generácii sa nachádza náš pacient-proband, u ktorého sme identifikovali kauzálnu mutáciu. Náš proband má troch súrodencov (III/3, 4, 5) vo veku 48, 50, 51 rokov bez klinických prejavov AD. Predpokladáme, že nie sú nositeľmi mutácie, pričom u jedného brata sme to aj potvrdili sekvenčnou analýzou. Náš proband má syna, ktorý je zatiaľ v asymptomatickom štádiu. Rodičia zamietli identifikáciu mutácie u syna.

Náš proband začal mať prvé príznaky AD vo veku 37 rokov. Pozoroval postupný rozvoj pamäťovej poruchy, ktorá mala progresívny charakter. Bol horšie orientovaný v čase a priestore, MMSE skóre mal 24 bodov. U pacienta sa zistili známky globálneho organického poškodenia CNS so závažnými kognitívnymi deficitmi hlavne v oblasti učenia sa, konsolidácie nových pamäťových informácií a operačnej pamäti s príznakmi topografickej dezorientácie. U pacienta sa vyvíjal progredujúci kognitívny deficit na hranici demencie.

Mutácia Thr116Asn v géne *psen1* je patologická a má vplyv na fenotyp pacienta. Prítomnosť mutácie sa považuje za kauzálnu ku vzniku FAD s autozómovo dominantnou dedičnosťou. Molekulárnym podkladom mutácie je transverzia cytozínu za adenín v nukleotidovej pozícii 25550 v exóne 5 *psen1* génu, čo vedie k zámene aminokyseliny treonín za asparagín v pozícii proteínu 116. Mutácia je lokalizovaná v 1. hydrofilnej slučke presenilínu 1 a mení vysokokonzervovanú aminokyselinu. Je asociovaná s veľmi agresívnou a rýchlo progredujúcou formou familiárnej AD. V danej pozícii nastáva aj iná zmena (Thr116Ile). Mutáciu po prvýkrát popísal Romero a kol. (1999). Priemerný vek nástupu ochorenia je okolo 37,5 a priemerný vek smrti je okolo 43,5. Romero a kol. popisuje tri generácie rodiny z Dánska (kaukazoidná populácia) so 4 pacientami s danou mutáciou. Mutácia vedie k veľmi skorému nástupu ochorenia v rozpätí 35–41 rokov s trvaním ochorenia 4–8 rokov v danej rodine. Analýzou Aβ peptidu u postihnutého v rodine sa zistila zvýšená koncentrácia Aβ42. Popisuje sa veľmi podobný vek nástupu a priebeh ochorenia u dvoch súrodencov, kde jeden mal genotyp apoE E3/E3 a druhý E4/E4. Prítomné alely apoE e4 nemali žiadny vplyv na progresiu ochorenia, čo naznačuje, že e4 alela nemá vplyv na AD asociovanú s mutáciou v *psen1* géne. Taktiež v prácach Rogaeva E.A. a kol. (2007), Guerreiro R.J. a kol. (2010) a Raux G. (2005) sú popísaní pacienti s mutáciou Thr116Asn.

V našom súbore 58 pacientov s AD sa u dvoch identifikovala kauzálna mutácia v génoch, ktoré majú úlohu v patogenéze AD. Pacienti majú familiárnu formu AD so skorým nástupom ochorenia a autozómovo dominantnou dedičnosťou. Naša záchytnosť je pomerne nízka v porovnaní s inými štúdiami popísanými v literatúre.

Sú mnohé štúdie, kde sa zisťovali mutácie v kandidátnych génoch v rodinách s AD. Champion a kol. (1999) uskutočnili sekvenčnú analýzu s cieľom identifikovať mutácie v kandidátnych

génov v 34 rodinách s AD vo Francúzsku. V 19 (56%) rodín identifikovali 16 rôznych mutácií v *psen1* géne, v 5 (15%) rodinách identifikovali 2 rôzne mutácie v *APP* géne. Počet postihnutých členov v jednotlivých rodinách sa líšil, ak sa však v rodine identifikovala kauzálna mutácia, tak sa našla u všetkých postihnutých členov rodiny. To naznačuje úplnú penetranciu mutácií. Mutácie v *psen1* a *APP* vysvetľujú až 71% prípadov. U pacientov sa taktiež stanovoval apoE genotyp, pričom sa frekvencie apoE variant nelíšili od kontrolnej populačnej vzorky. V danej štúdii boli rodiny do súboru zaradované podľa najprísnejších kritérií, kedy musel byť výskyt troch postihnutých jedincov s AD (klinická diagnóza) v troch generáciách s vekom nástupu ochorenia pod 60 rokov. Týmto sa zabezpečilo, že sa do súboru dostali rodiny s familiárnou formou AD so skorým nástupom ochorenia a zistenou autózomovo dominantnou dedičnosťou. Na túto štúdiu nadväzovala štúdia Raux a kol., (2005), ktorí sledovali mutácie v kandidátnych génoch v 31 rodinách s FAD. Taktiež vyberali rodiny podľa rovnakých kritérií ako v predošlej práci. Podarilo sa im identifikovať 17 rôznych mutácií v *psen1* géne v 24 (77,5%) rodinách a 2 rôzne mutácie v *APP* géne v 5 (16%) rodinách. 78% pacientov malo apoE E3/E3 genotyp. Priemerný vek nástupu ochorenia bol v prípade mutácií v *psen1* 41,7 rokov a v prípade mutácií v *APP* bol 51,2 rokov. Pri zosumarizovaní výsledkov týchto nadväzujúcich štúdií vyplýva, že zo 65 rodín s familiárnou formou AD, sa 66% prípadov pripisuje mutáciám v *psen1* géne, 16% prípadov mutáciám v *APP* géne a 18% prípadov zostalo bez identifikovanej mutácie. Z výsledkov vyplýva výrazne vysoká záchytnosť mutácií v rodinách. Čo súvisí práve s veľmi prísnyimi kritériami výberu rodín. Čím sa vlastne dokázalo, že mutácie v génoch *APP* a *psen1* sú zodpovedné za väčšinu prípadov FAD s autózomovo dominantnou dedičnosťou v rodine.

Sú aj ďalšie štúdie na jednotlivých populáciách, ktoré zaznamenali vysokú záchytnosť mutácií. Finckh a kol. (2005) popisujú sekvenčnú analýzu u 21 pacientov s AD, s pozitívnou rodinnou anamnézou, teda s podozrením na familiárnu formu AD. Mutácie identifikovali u 57% pacientov. Našli 5 mutácií v *psen1* géne, 3 mutácie v *APP* géne a 1 mutáciu v *psen2*. Jansen a kol. (2003) popisujú v práci 31 jedincov s AD s vekom nástupu menej ako 60 rokov z UK. 23 rodín splňalo autózomovo dominantný prenos. U 21 jedincov identifikoval mutácie v *APP* alebo *psen1* géne.

Sú aj práce s nižšou záchytnosťou mutácií v rodinách (Arango a kol., 2001; Cruts a kol., 1998; Lleo a kol., 2002; Žekanovski a kol., 2003). Žekanovski a kol. (2003) popisujú molekulárno – genetickú analýzu génov u 40 pacientov s AD z Poľska. U pacientov bola klinicky stanovená diagnóza AD a priemerný vek nástupu bol $52,8 \pm 8,2$. Identifikovali 6 mutácií v *psen1* géne, 2 mutácie v *APP* géne a 1 mutáciu v *psen2* géne. Záchytnosť bola 17%. Pomerne nízke percento identifikovaných mutácií môže súvisieť s tým, že si zvolili kritérium u pacientov, že stačil jeden príbuzný s AD v rodine, čo teda znamenalo, že nemuselo ísť o autózomovo dominantný typ FAD a preto sa neidentifikovalo viac mutácií. Frekvencia apoE e4 alely bola vyššia u pacientov, u ktorých sa mutácia neidentifikovala v porovnaní s kontrolnou populačnou vzorkou. Čo naznačuje, že AD môže byť v dôsledku prítomnej alely e4. Aj v iných štúdiách sa zaznamenal familiárny výskyt AD so skorším nástupom ochorenia v dôsledku apoE e4 alely (Lleo a kol., 2002). Lleo a kol. sledovali 60 pacientov so skorým nástupom ochorenia. U 11 rodín zaznamenali autózomovo dominantnú dedičnosť. V 6 z 11 rodín identifikovali

mutácie (v *APP*, *psen1* géne), čo je pomerne malá záchytnosť, keďže ide o tak malý súbor. Zvyšní pacienti so skorým nástupom AD bez zistenej mutácie mali zvýšenú frekvenciu ApoE e4 alely. V práci Cruts a kol. (1998) taktiež zaznamenali nízku záchytnosť mutácií v rodinách s AD so skorým nástupom (18%). Pravdepodobne mali taktiež v súbore familiárne formy ale bez autozómovo dominantnej dedičnosti. Nasvedčuje tomu aj fakt, že v danom súbore zvyšní pacienti taktiež mali zvýšenú frekvenciu apoE e4 alely ako aj v predchádzajúcich prácach. Čo naznačuje, že apoE e4 alela je rizikový faktor aj pri familiárnych AD a prítomnosť alely e4 u probanda výrazne zvyšuje incidenciu AD u potomkov prvého stupňa.

Môžeme teda uzatvoriť náš súbor pacientov, že u 33 pacientov (57%) by sme mohli príčinu vzniku AD pripisovať prítomnej apoE alele e4 a môžeme klasifikovať AD ako sporadickú formu, keďže sme mutácie v génoch nenašli a pacienti mali prítomnú jednu alebo dve alely e4. Je to však veľmi hypotetické, keďže nemáme informácie o veku nástupu pacienta a hlavne o výskyte iných postihnutých s AD v rodine našich pacientov. A teda nemôžeme ani vylúčiť familiárny výskyt AD v dôsledku apoE e4 alely. Familiárnu formu s autozómovo dominantnou dedičnosťou sme potvrdili u dvoch pacientov (3,5%). Naša malá záchytnosť môže byť spôsobená naším súborom pacientov s AD. Vo väčšine prác sa sekvenčná analýza uskutočňuje na súbore pacientov, u ktorých sa príznaky ochorenia objavili vo veku menej ako 50-60 rokov a u ktorých bola pozitívna rodinná anamnéza. Tým sa lepšie vyselektuje súbor pacientov, u ktorých môže ísť o familiárnu formu AD s autozómovo dominantnou dedičnosťou. To, že v našom súbore prevažovali pacienti zrejme s AD s neskorým nástupom, či už s familiárnym alebo sporadickým výskytom naznačuje aj fakt, že u pacientov s neidentifikovanou mutáciou bola zvýšená frekvencia apoE e4 alely. Vo všeobecnosti však mutácie v génoch *APP*, *psen1*, *psen2* zodpovedajú za menej ako 1% prípadov všetkých AD. Čo je veľmi nízke percento. Sú zodpovedné za 70% prípadov ADFAD. Asi 80% predstavujú mutácie v *psen1*, 14% v géne *APP* a 6% v *psen2*. Mutácie v *Psen 2* sú najzriedkavejšie a dokonca sa popisujú prípady s neúplnou penetranciou a neskorým nástupom ochorenia. U zvyšných 23 pacientov bez identifikovanej mutácie a bez apoE e4 alely, môžeme predpokladať vplyv iných genetických a negenetických faktorov, ktoré majú vplyv na vývoj AD. Sú mnohé práce, ktoré sledovali aj iné lokusy, ktoré by mohli byť asociované s AD (Ertekin-Taner, 2010). Polymorfizmy identifikované v našom súbore sú pomerne časté. Sú to tiché polymorfizmy, nie sú patologické a nemajú vplyv na fenotyp pacienta.

Dobrá záchytnosť závisí od správneho výberu súboru pacientov a použitých kritérií (najprísnejšie sú ako v práci Raux a kol., 2005 a Champion a kol., 1999), veľkosť súboru, od populácie a použitej metodiky. Je dôležitá podrobná rodinná anamnéza a štúdium rodokmeňa, aby sa identifikovalo, či sa jedná o autozómovo dominantný typ dedičnosti. V niektorých prácach sa popisuje, že pacient bol zaradený ako pacient so skorým nástupom AD, ale bez podozrenia na autozómovo dominantný typ a identifikovala sa u neho kauzálna mutácia, čo môže byť v dôsledku predčasnej smrti postihnutých členov a tým sa dedičnosť nezaznamená (Leo a kol., 2002). Taktiež existencia fenokópií, neúplnej penetrancie pri niektorých mutáciách a falošná paternita môžu maskovať autozómovo dominantný typ dedičnosti.

Keďže je v niektorých prácach záchytnosť vysoká, oplatí sa sekvenčná analýza daných

génov. Ako indikácia na sekvenčnú analýzu by mala byť dobre preskúmaná rodinná anamnéza, rodokmeň rodiny a vek nástupu ochorenia v rodine. Úspešnosť záchytu mutácie v kandidátnych génoch je najvyššia u AD pacientov s autozómovo dominantným spôsobom dedičnosti. Vysoká záchytnosť v niektorých prácach však môže súvisieť s tým, že ako mutácie rátať aj zatiaľ nepopísané mutácie, ktoré však nemusia byť patologické a môže sa jednať o veľmi zriedkavé polymorfizmy. A za pokles záchytnosti môže byť zodpovedná prítomnosťou pacientov v súbore, ktorí majú familiárnu formu AD ale bez autozómovo dominantnej dedičnosti, mutácie v intrónových oblastiach, ktoré sa nezachytili, alebo sa jedná o mutácie v iných génoch.

Naša práca je prvou štúdiou na diagnostiku AD na molekulárno – genetickej úrovni v slovenskej populácii. Poskytli sme informácie o genotype apoE a frekvenciách apoE variant v kontrolnej populačnej vzorke a v súbore pacientov s AD. V súčasnosti nie sú k dispozícii relevantné údaje o mutáciách vedúcich k vzniku Alzheimerovej choroby na Slovensku. Podarilo sa nám identifikovať jednu na Slovensku zatiaľ nezachytenú mutáciu u jedného pacienta (Thr116Asn) a druhú mutáciu u pacienta, ktorá bola zachytená už u jeho brata (Val717Phe). V prípade pacienta s mutáciou Thr116Asn sme určili nositeľov mutantnej alely, segregáciu alely z rodiča na potomstvo, následne sme zostavili rodokmeň a sledovali spôsob dedičnosti a vek nástupu a smrti v dôsledku AD. Keďže takéto informácie v slovenskej populácii doteraz nie sú známe, jedná sa o prioritné výsledky. V budúcnosti by sme chceli pokračovať v spolupráci s I. neurologickou klinikou LF UK a UNB v sekvenčných analýzach kandidátnych génov a zvoliť vhodnejšie kritériá pri výbere pacientov s AD a u pacientov zistiť rodinnú anamnézu.

7. ZÁVER

- Určili sme frekvenciu definovaného rizikového genetického determinantu apoE4 izoformy v kontrolnom súbore a v súbore pacientov s AD
- Podiel izoformiem apoE v súbore pacientov s AD (56, 112 aliel) bol E3: 61,6%, E4: 34,8%, E2: 3,6%
- Zastúpenie izoformiem apoE v kontrolnom súbore (muži + ženy, 400 aliel) bolo E3: 83,2%, E4: 9,8%, E2: 7,0%
- Rozdiely v zastúpení jednotlivých izoformiem apoE medzi súborom pacientov s AD a kontrolným súborom sú štatisticky signifikantne významné (hodnota P sa blíži 0, $P=0,000$). Teda môžeme zhodnotiť, že sa výrazne líšil podiel jednotlivých apoE variant medzi súbormi
- V súbore pacientov s AD sa izoforma E4 vyskytovala vo výrazne vyššej frekvencii (34,8%) v porovnaní s kontrolným súborom (9,8). Podiel E4 u pacientov s AD a v kontrolnom súbore je vysoko signifikantne odlišný ($P=0,000$). Nami zistené údaje sa zhodujú s údajmi v literatúre, kde sa popisuje zvýšená frekvencia apoE e4 alely u pacientov s AD a uznáva sa e4 ako rizikový faktor pre AD
- V súbore pacientov s AD sa nachádzalo 31 žien a 25 mužov. V zastúpení apoE izoformiem (E3, E4, E2) medzi pohlaviami v súbore pacientov s AD nie sú rozdiely **štatisticky signifikantne významné** ($P=0,216$). Taktiež v **zastúpení apoE izoformiem (E3, E4, E2) medzi pohlaviami v kontrolnom súbore nie sú rozdiely štatisticky signifikantne významné** ($P=0,434$)
- Rozdiely v zastúpení jednotlivých genotypov apoE medzi súborom pacientov s AD a kontrolným súborom sú **štatisticky signifikantne významné** ($P=0,000$). V našom súbore pacientov s AD dominoval genotyp E3/E4 (48,2%), genotyp E4/E4 bol identifikovaný u 10,7%
- Naštandardizovali sme vhodné podmienky pre PCR a sekvenčné analýzy génov, asociovaných s FAD s autozómovo dominantnou dedičnosťou: *APP* gén (exón 16, 17), *psen1* gén (exóny 3-12), *psen2* gén (3-12) a gén *tau* (exóny 9-11)
- Sekvenčnú analýzu sme uskutočnili u všetkých 58 pacientov s AD. V *APP* géne sme identifikovali bodovú mutáciu Val717Phe v exóne 17, v *psen1* géne sme identifikovali bodovú mutáciu Thr116Asn v exóne 5. Taktiež sme v génoch identifikovali niekoľko polymorfizmov: v intróne 8 (T/G) v *psen1* géne, polymorfizmy Asn43 a His87 v *psen2* géne a polymorfizmy Ala227, Asn255, Pro270 v *tau* géne
- U dvoch pacientov sa identifikovala kauzálna mutácia v génoch, ktoré majú úlohu v patogeneze AD. Prítomnosť mutácie sa považuje za kauzálnu ku vzniku familiárnej Alzheimerovej choroby so skorým nástupom ochorenia, keďže je dedičnosť AD autozómovo dominantná a klinicky sa manifestuje už u heterozygotov
- Podarilo sa nám identifikovať jednu na Slovensku zatiaľ nezachytenú mutáciu u jedného pacienta (Thr116Asn). V prípade pacienta s mutáciou Thr116Asn sme určili nositeľov mutantnej alely, segregáciu alely z rodiča na potomstvo, následne sme zostavili rodokmeň a sledovali spôsob dedičnosti a vek nástupu a smrti v dôsledku AD
- Druhá mutácia (Val717Phe) bola zachytená už u brata nášho pacienta. Vykonali sme aj sekvenčnú analýzu na identifikáciu danej mutácie u ďalšieho brata nášho pacienta

- U 33 pacientov (57%) by sme mohli príčinu vzniku AD pripisovať prítomnej apoE alele e4, keďže sme mutácie v génoch nenašli a pacienti mali prítomnú jednu alebo dve alely e4
- Familiárnu formu s autozómovo dominantnou dedičnosťou sme potvrdili u dvoch pacientov (3,5%)
- V našej práci sme potvrdili, že úspešnosť záchytu mutácie závisí od vhodne zvoleného súboru. Je dôležité poznať vek nástupu a rodinnú anamnézu. Tým, že sme nemali dané údaje o našich pacientoch, si aj vysvetľujeme našu nízku záchytnosť. Sekvenčnú analýzu má význam indikovať hlavne v prípade AD s autozómovo dominantným prenosom v rodine. To, že v našom súbore prevažovali pacienti zrejme s AD s neskorým nástupom, či už s familiárnym alebo sporadickým výskytom naznačuje aj fakt, že u pacientov s neidentifikovanou mutáciou bola zvýšená frekvencia apoE e4 alely. Potvrdili sme vplyv aj genetických aj negenetických faktorov pri patogenéze AD.

8. POUŽITÁ LITERATÚRA

- Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A., Kemler, R., 1997: β -catenin is a target for the ubiquitin-proteasome - pathway. *Embo J*, 16, 3797-3804.
- Affholter, J. A., Hsieh, C. -L., Francke, U., & Roth, R. A., 1999: Insulin-degrading enzyme: Stable expression of the human complementary DNA, characterization of its protein product, and chromosomal mapping of the human and mouse genes. *Molecular Endocrinology*, 4, 1125-1135.
- Allsop, D., Landon, M., Kidd, M., 1983: The isolation and amino acid composition of senile plaque core protein. *Brain Res.*, 259, 348-352.
- Alzheimer, A., 1907: Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg. Z. Psychiatrie Psychisch-Gerichtlich Med.* 64, 146-148.
- Andreadis, A., Brown, W.M., Kosik, K.S., 1992: Structure and novel exons of the human tau gene. *Biochemistry*, 31, 10626-10633.
- Ancolio, K., Dumanchin, C., Barelli, H., Wärter, J.M., Brice, A., Campion, D., Frebourg, T., Checler, F., 1999: Unusual phenotypic alteration of beta amyloid precursor protein (betaAPP) maturation by a new Val-715 --> Met betaAPP-770 mutation responsible for probable early-onset Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 96, 4119-4124.
- Arango, D., Cruts, M., Torres, O., Backhovens, H., Serrano, M.L., Villareal, E., Montanes, P., Matallana, D., Cano, C., Van Broeckhoven, C., Jacquier, M., 2001: Systematic genetic study of Alzheimer disease in Latin America: mutation frequencies of the amyloid beta precursor protein and presenilin genes in Colombia. *Am J Med Genet*, 103, 38-43.
- Arawaka, S., Hasegawa, H., Tandon, A., Janus, C., Chen, F., Yu, G., Kikuchi, K., Koyama, S., Kato, T., Fraser, P. E., and StGeorge-Hyslop, P., 2002: The levels of mature glycosylated nicastrin are regulated and correlate with γ -secretase processing of amyloid β -precursor protein. *J. Neurochem.*, 83, 1065-71.
- Arendt, T., Schindler, C., Brokner, M.K., Eschrich, K., Bigl, V., Zedlick, D., Marcova, L., 1997: Plastic neuronal remodeling is impaired in patients with Alzheimer's disease carrying apolipoprotein e4 allele. *J Neurosci* 17, 516-529.
- Barnham, K. J., Masters, C. L., Bush, A. I., 2004: Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 3, 205-214.
- Baudier, J., Cole, R.D., 1987: Phosphorylation of tau proteins to a state like that in Alzheimer's brain is catalyzed by a calcium/calmodulin-dependent kinase and modulated by phospholipids. *J. Biol. Chem.*, 262, 17577-17583.
- Baumann, K., Mandelkow, E.M., Biernat, J., Pivnicka-Worms, H., Mandelkow, E., 1993: Abnormal Alzheimer-like phosphorylation of tau protein by cyclin-dependent kinases cdk2 and cdk5. *FEBS Lett.*, 336, 417-424.
- Beck, J.A., Janssen, J.C., Campbell, T.A., Dickinson, A., Fox, N.C., Harvey, R.J., Houlden, H., Rossor, M.N., Collinge, J., 2002: Early onset familial Alzheimers disease: mutation frequency in 31 families. *Neurobiology of Aging*, 23 (1S), 311.
- Beffert, U., Danik, M., Krzykowski, P., Ramassamy, C., Berrada, F., Poirier, J., 1998: The neurobiology of apolipoproteins and their receptors in the CNS and Alzheimers disease. *Brain Research Reviews*, 27(2), 119-142.
- Behr, D., Hesse, L., Masters, C.L., Multhaup, G., 1996: Regulation of amyloid protein precursor (APP) binding to collagen and mapping of the binding sites on APP and collagen type I. *J Biol Chem.*, 19;271(3), 1613-20.
- Bennett, B. D., Denis, P., Haniu, M., Teplow, D. B., Kahn, S., Louis, J. C., Citron, M., & Vassar, R., 2000: A furin-like convertase mediates propeptide cleavage of BACE, the Alzheimer's beta-secretase. *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 37712-37717.
- Berezovska, O., Lleo, A., Herl, L.D., Frosch, M.P., Stern, E.A., Bacskai, B.J., Hyman, B.T., 2005: Familial Alzheimer's disease presenilin 1 mutations cause alterations in the conformation of presenilin and interactions with amyloid precursor protein. *J Neurosci*, 25, 3009-3017.
- Bertram, L., Blacker, D., Mullin, K., Keeney, D., Jones, J., Basu, S., Yhu, S., McInnis, M. G., Go, R. C., Vekrellis, K., Selkoe, D. J., Saunders, A. J., & Tanzi, R. E., 2000: Evidence for genetic linkage of Alzheimer's disease to chromosome 10q. *Science*, 290, 2302-2303.
- Bertram, L., McQueen, M.B., Mullin, K., Blacker, D., and Tanzi, R.E., 2007: Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database. *Nat. Genet.* 39, 17-23.
- Bertram, L., McQueen, M.B., Mullin, K., Blacker, D., and Tanzi, R.E., 2009: The AlzGene Database (Alzheimer Research Forum). <http://www.alzgene.org>.
- Biernat, J., Gustke, N., Drewes, G., Mandelkow, E.M., Mandelkow, E., 1993: Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding. *Neuron*, 11, 153-163.
- Binder, L.I., Frankfurt, A., Rebhun, L.I., 1985: The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J. Cell Biol.*, 101, 1371-1378.
- Black, R. A., Rauch, C. T., Kozlosky, C. J., Peschon, J. J., Slack, J. L., Wolfson, M. F., Castner, B. J., Stocking, K. L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K. A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J. N., Johnson, R. S., Paxton, R. J., March, C. J., & Cerretti, D. P., 1997: A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells. *Nature*, 385, 729-733.
- Blennow, K., Hesse, C., Fredman, P., 1994: Cerebrospinal fluid apolipoprotein E is reduced in Alzheimer's disease. *Clinical Neuroscience and Neuropathology*, 5(18):2534-2436.
- Blennow, K., de Leon, m., J., Zetterberg, H., 2006: Alzheimer's disease. *Lancet*, 368, 387-403.
- Blobel, C. P., 1997: Metalloprotease-disintegrins: Links to cell adhesion and cleavage of TNF alpha and Notch. *Cell*, 90, 589-592.
- Borchelt, D.R., Thinakaran, G., Eckman, C.B., Lee, M.K., Davenport, F., Ratovitsky, T., Prada, C.M., Kim, G., Seekins, S., Yager, D., Slunt, H.H., Wang, R., Seeger, M., Levey, A.I., Gandy, S.E., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Price, D.L., Younkin, S.G., Sisodia, S.S., 1996: Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Ab1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron*, 17, 1005-1013.
- Borg, J.P., Ooi, J., Levy, E., Margolis, B., 1996: The phosphotyrosine interaction domains of X11 and FE65 bind to distinct sites on the YENPTY motif of amyloid precursor protein. *Mol Cell Biol.*, 16(11), 6229-41.

- Boulianne, G.L., Livne-Bar, I., Humphreys, J.M., Liang, Y., Lin, C., Rogaev, E., St George-Hyslop, P., 1997: Cloning and characterization of the *Drosophila* presenilin homologue. *Neuroreport*, 8, 1025–1029.
- Braak, H. a Braak, E., 1991: Neuropathological staging of Alzheimer-However, the major protein constituent of the fibrils related changes. *Acta Neuropathol*, 82: 239–59
- Bramblett, G.T., Goedert, M., Jakes, R., Merrick, S.E., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.-Y., 1993: Abnormal tau phosphorylation at Ser396 in Alzheimer's disease recapitulates development and contributes to reduced microtubule binding. *Neuron*, 10, 1089–1099.
- Breen, K.C., Bruce, M., Anderton, B.H., 1991: Beta amyloid precursor protein mediates neuronal cell–cell and cell–surface adhesion. *J. Neurosci. Res.*, 28, 90–100.
- Breitner, J.C., Wyse, B.W., Anthony, J.C., Welsh-Bohmer, K.A., Steffens, D.C., Norton, M.C., Tschanz, J.T., Plassman, B.L., Meyer, M.R., Skoog, I., Khachaturian, A., 1999: APOE-epsilon4 count predicts age when prevalence of AD increases, then declines: the Cache County Study. *Neurology*, Jul 22;53, 321–31.
- Brecht, W.J., Harris, F.M., Chang, S., Tessier, I., Yu, G.Q., Xu, Q., Dee, Fish, J., Wyss-Coray, T., Buttini, M., Mucke, L., Mahley, R.W., Huang, Y., 2004: Neuron-specific apolipoprotein e4 proteolysis is associated with increased tau phosphorylation in brains of transgenic mice. *J. Neurosci.*, 10;24(10), 2527–34.
- Brockhaus, M., Grunberg, J., Rohrig, S., Loetscher, H., Wittenburg, N., Baumeister, R., Jacobsen, H., Haass, C., 1998: Caspase-mediated cleavage is not required for the activity of presenilins in amyloidogenesis and NOTCH signaling. *Neuroreport*, 9, 1481–1486.
- Brouillet, E., Trembleau, A., Galanaud, D., Volovitch, M., Bouillot, C., Prochiantz, C., Valenza, C., Allinquant, B., 1999: The amyloid precursor protein interacts with Go heterotrimeric protein within a cell compartment specialized in signal transduction. *J. Neurosci.*, 19, 1717–1727.
- Brown, G. C. a Bal-Price, A., 2003: Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide, glutamate, and mitochondria. *Mol Neurobiol.* 27, 325–355.
- Brugge, K.L., Nichols, S.L., Salmon, D.P., Hill, L.R., Delis, D.C., Aaron, L., Trauner, D.A., 1994: Cognitive impairment in adults with Down's syndrome: similarities to early cognitive changes in Alzheimer's disease. *Neurology*, 44, 232–8.
- Buée, L., Bussière, T., Buée-Scherrer, V., Delacourte, A., Hof, P.R., 2000: Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res. Rev.*, 33 (1–2), 95–130.
- Bush, A., I., 2003: The metallobiology of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 26, 207–214.
- Bush, A., I., Masters, C. L., Tanzi, R. E., 2003: Copper, beta-amyloid, and Alzheimer's disease: tapping a sensitive connection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100, 1193–1194.
- Butner, K.A., Kirschner, M.W., 1991: Tau protein binds to microtubules through a flexible array of distributed weak sites. *J. Cell Biol.*, 115, 717–730.
- Butterfield, D. A. a Boyd-Kimball, D., 2004: Amyloid beta-peptide (1–42) contributes to the oxidative stress and neurodegeneration found in Alzheimer disease brain. *Brain Pathol.* 14, 426–432.
- Butterfield, D. A., Drake, J., Pocernich, C., Castegna, A., 2001: Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid beta-peptide. *Trends Mol. Med.*, 7, 548–554.
- Buttini, M., Orth, M., Bellosta, S., Akeefe, H., Pitas, R.E., Wyss-Coray, T., Mucke, L., Mahley, R.W., 1999: Expression of human apolipoprotein E3 or E4 in the brains of ApoE-/- mice: isoform-specific effects on neurodegeneration. *J. Neurosci.*, 15;19(12), 4867–80.
- Buxbaum, J.D., Choi, E.K., Luo, Y.X., Lilliehook, C., Crowley, A.C., Merriam, D.E., Wasco, W., 1998: Calsenilin: a calcium-binding protein that interacts with the presenilins and regulates the levels of a presenilin fragment. *Nature Med.* 4, 1177–1181.
- Buxbaum, J. D., Liu, K. N., Luo, Y., Slack, J. L., Stocking, K. L., Peschon, J. J., Johnson, R. S., Castner, B. J., Cerretti, D. P., & Black, R. A., 1998b: Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 27765–27767.
- Byrne, E., 2002: Does mitochondrial respiratory chain dysfunction have a role in common neurodegenerative disorders? *J. Clin. Neurosci.* 9, 497–501.
- Cadenas, E. a Davies, K. J., 2000: Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic. Biol. Med.*, 29, 222–230.
- Cai, H., Wang, Y., McCarthy, D., Wen, H., Borchelt, D. R., Price, D. L., & Wong, P. C., 2001: BACE1 is the major beta-secretase for generation of Aβeta peptides by neurons. *Nature Neuroscience*, 4, 233–234.
- Campion, D., Dumanchin, C., Hannequin, D., Dubois, B., Belliard, S., Puel, M., Thomas-Anterion, C., Michon, A., Martin, C., Charbonnier, F., Raux, G., Camuzat A., Penet, C., Mesnage, V., Martinez, M., Clerget-Darpoux, F., Brice, A., Frebourg, T., 1999: Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease: prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum. *Am. J. Hum. Genet.* 65, 664–670.
- Capell, A., Grunberg, J., Pesold, B., Diehlmann, A., Citron, M., Nixon, R., Beyreuther, K., Selkoe, D.J., Haass, C., 1998: The proteolytic fragments of the Alzheimer's disease-associated presenilin-1 form heterodimers and occur as a 100–150 kDa molecular mass complex. *J. Biol. Chem.* 273, 3205–3211.
- Capell, A., Kaether, C., Edbauer, D., Shiotani, K., Merkl, S., Steiner, H., and Haass, C., 2003: Nicastrin interacts with γ-secretase complex components via the N-terminal part of its transmembrane domain. *J. Biol. Chem.*, 278, 52519–23.
- Capell, A., Steiner, H., Willem, M., Kaiser, H., Meyer, C., Walter, J., Lammich, S., Multhaup, G., & Haass, C., 2000: Maturation and pro-peptide cleavage of beta-secretase. *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 30849–30854.
- Caporaso, G.L., Takei, K., Gandy, S.E., Matteoli, M., Mundigl, O., Greengard, P., De Camilli, P., 1994: Morphologic and biochemical analysis of the intracellular trafficking of the Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein. *J. Neurosci.*, 14, 3122–3138.
- Carson, J. A., & Turner, A. J., 2002: Beta-amyloid catabolism: Roles for neprilysin (NEP) and other metalloproteinases? *Journal of Neurochemistry*, 81, 1–8.

- Carter, D.A., Desmarais, E., Bellis, M., Campion, D., Clerget-Darpoux, F., Brice, A., Agid, Y., Jaillard-Serradt, A., Mallet, J., 1992: More missense in amyloid gene. *Nature Genetics*, 2, 255-256.
- Castano, E.M., Prelli, F., Wisniewski, T., Golabek, A., Kumar, R.A., Soto, C., Frangione, B., 1995: Fibrillogenesis in Alzheimers disease of amyloid β peptides and apolipoprotein E. *Biochemistry Journal*, 306, 599-604.
- Citron, M., Oltersdorf, T., Haass, C., McConlogue, L., Hung, A.Y., Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Lieberburg, I., Selkoe, D.J., 1992: Mutation of the b-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases b-protein production. *Nature*, 360, 672-674.
- Citron, M., Vigo-Pelfrey, C., Teplow, D.B., Miller, C., Schenk, D., Johnston, J., Winblad, B., Venizelos, N., Lannfelt, L., Selkoe, D.J., 1994: Excessive production of amyloid b-protein by peripheral cells of symptomatic and presymptomatic patients carrying the Swedish familial Alzheimer's disease mutation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91, 11993-11997.
- Citron, M., Westaway, D., Xia, W., Carlson, G., Diehl, T., Levesque, G., Johnson-Wood, K., Lee, M., Seubert, P., Davis, A., Kholodenko, D., Motter, R., Sherrington, R., Perry, B., Yao, H., Strome, R., Lieberburg, I., Rommens, J., Kim, S., Schenk, D., Fraser, P., St George-Hyslop, P., Selkoe, D., 1997: Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid b-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nat. Med.*, 3, 67-72.
- Cleveland, D.W., Hwo, S.Y., Kirschner, M.W., 1977: Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. *J. Mol. Biol.*, 116, 207-225.
- Cohen, A. J., a Miller, Y. E., 1999: Neuroendocrine differentiation, neuropeptides, and neprilysin. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 21, 1-3.
- Colciaghi, F., Borroni, B., Pastorino, L., Marcello, E., Zimmermann, M., Cattabeni, F., Padovani, A., & Di Luca, M., 2002: α -Secretase ADAM10 as well as α APPs is reduced in platelets and CSF of Alzheimer disease patients. *Molecular Medicine*, 8, 67-74.
- Cosentino, S., Scarmeas, N., Helzner, E., Glymour, M.M., Brandt, J., Albert, M., Blacker, D., and Stern, Y., 2008: APOE epsilon 4 allele predicts faster cognitive decline in mild Alzheimer disease. *Neurology* 70, 1842-1849.
- Cook, D., Forman, M., Sung, J., Leight, S., Kolson, D., Iwatsubo, T., Lee, V., Doms, R., 1997: Alzheimer's Ab (1-42) is generated in the endoplasmic reticulum/intermediate compartment of NT2N cells. *Nat. Med.*, 3, 1021-1023.
- Cook, D.G., Sung, J.C., Golde, T.E., Felsenstein, K.M., Wojczyk, B.S., Tanzi, R.E., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., Doms, R.W., 1996: Expression and analysis of presenilin 1 in a human neuronal system: localization in cell bodies and dendrites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 9223-9228.
- Corder, E., Saunders, A., Risch, N., Strittmatter, W., Schmechel, D., Gaskell, P., Rimmler, J., Locke, P., Conneally, P., Schmechel, K., Small, G., Roses, A., Haines, J., Pericak-Vance, M., 1994: Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nature Genet.*, 7, 180-184.
- Corder, E.H., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Small, G.W., Roses, A.D., Haines, J.L., Pericak-Vance, M.A., 1993: Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*, 261(5123), 921-3.
- Corder, E.H., Saunders, A. M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, Jr., P.C., Roses, A.D., Pericak-Vance, M.A., Small, G.W., Haines, J.L., 1995: The apolipoprotein E allele and sex-specific risk of Alzheimer's disease. *Journal of the American Medical Association*, 273, 373-374.
- Couchie, D., Mavilia, C., Georgieff, I.S., Liem, R.K., Shelanski, M.L., Nunez, J., 1992: Primary structure of high molecular weight tau present in the peripheral nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 4378-4381.
- Coulson, E.J., Paliga, K., Beyreuther, K., Masters, C.L., 2000: What the evolution of the amyloid protein precursor supergene family tells us about its function. *Neurochem Int*, 36, 175-84.
- Crook, R., Verkoniemi, A., Perez-Tur, J., Mehta, N., Baker, M., Houlden, H., Farrer, M., Hutton, M., Lincoln, S., Hardy, J., Gwinn, K., Somer, M., Paetau, A., Kalimo, H., Ylikoski, R., Poyhonen, M., Kucera, S., Haltia, M., 1998: A variant of Alzheimer's disease with spastic paraparesis and unusual plaques due to deletion of exon 9 of presenilin 1. *Nature Medicine*: 4, 452-455.
- Crowther, R.A., 1991: Straight and paired helical filaments in Alzheimer disease have a common structural unit. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 88, 2288-2292.
- Crowther, R.A., Wischik, C.M., 1985: Image reconstruction of the Alzheimer paired helical filament. *EMBO J.*, 4, 3661-3665.
- Cruts, M., van Duijn, C.M., Backhovens, H., Van den Broeck, M., Wehnert, A., Semeels, S., Sherrington, R., Hutton, M., Hardy, J., St George-Hyslop, P.H., Hofman, A., Van Broeckhoven, C., 1998: Estimation of the genetic contribution of presenilin-1 and -2 mutations in a population-based study of presenile Alzheimer disease. *Hum Mol Genet.*, 7, 43-51.
- Culvenor, J.G., Maher, F., Evin, G., Malchiodi-Albedi, F., Cappai, R., Underwood, J.R., Davis, J.B., Karran, E.H., Roberts, G.W., Beyreuther, K., Masters, C.L., 1997: Alzheimer's disease-associated presenilin 1 in neuronal cells: evidence for localization to the endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment. *J. Neurosci. Res.*, 49, 719-731.
- Cupples, L.A., Farrer, L.A., Sadovnick, A.D., Relkin, N., Whitehouse, P., Green, R.C., 2004: Estimating risk curves for first-degree relatives of patients with Alzheimer's disease: the REVEAL study. *Genet Med*, 6, 192-6.
- Davis, J.A., Naruse, S., Chen, H., Eckman, C., Younkin, S., Price, D.L., Borchelt, D.R., Sisodia, S.S., Wong, P.C., 1998: An Alzheimer's disease-linked PS1 variant rescues the developmental abnormalities of PS1-deficient embryos. *Neuron*, 20, 603-609.
- Dawson, G.R., Seabrook, G.R., Zheng, H., Smith, D.W., Graham, S., O'Dowd, G., Bowery, B.J., Boyce, S., Trumbauer, M.E., Chen, H.Y., Van der Ploeg, L.H.T., Sirinathsingji, J.S., 1999: Age-related cognitive deficits, impaired long-term potentiation and reduction in synaptic marker density in mice lacking the beta-amyloid precursor protein. *Neuroscience*, 90, 1-13.
- De Jonghe, C., Esselens, C., Kumar-Singh, S., Craessaerts, K., Semeels, S., Clecler, F., Annaert, W., Van Broeckhoven, C., De Strooper, B., 2001: Pathogenic APP mutations near the gamma-secretase cleavage site differentially affect Abeta secretion and APP C-terminal fragment stability. *Human Molecular Genetics*, 10, 1665-1671.

- De Ronchi, D., Fratiglioni, L., Rucci, P., Paternico, A., Graziani, S., Dalmonte, E., 1998: The effect of education on dementia occurrence in an Italian population with middle to high socioeconomic status. *Neurology*, 50, 1231-8.
- De Strooper, B., Annaert, W., 2000: Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J. Cell Sci.*, 113, 1857-1870.
- De Strooper, B., Saftig, P., Craessaerts, K., Vanderstichele, H., Guhde, G., Annaert, W., Von Figura, K., Van Leuven, F., 1998: Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature*, 391:387-390.
- Dillen, K., Annaert, W., 2006: A two decade contribution of molecular cell biology to the centennial of Alzheimer's disease: are we progressing toward therapy? *Int Rev Cytol.*, 254, 215-300.
- Doan, A., Thinakaran, G., Borchelt, D.R., Slunt, H.H., Ratovitsky, T., Podlisny, M., Selkoe, D.J., Seeger, M., Gandy, S.E., Price, D.L., Sisodia, S.S., 1996: Protein topology of presenilin 1. *Neuron*, 17, 1023-1030.
- Dong, L.M., Weisgraber, K.H., 1996: Human apolipoprotein E4 domain interaction. Arginine 61 and glutamic acid 255 interact to direct the preference for very low density lipoproteins. *J Biol Chem*, 9, 271 (32), 19053-7.
- Dong, L.M., Wilson, C., Wardell, M.R., Simmons, T., Mahley, R.W., Weisgraber, K.H., Agard, D.A., 1994: Human apolipoprotein E. Role of arginine 61 in mediating the lipoprotein preferences of the E3 and E4 isoforms. *J Biol Chem*, 2, 269 (35), 22358-65.
- Donoviel, D. B., Hadjantonakis, A. K., Ikeda, M., Zheng, H., Hyslop, P. S., & Bernstein, A., 1999: Mice lacking both presenilin genes exhibit early embryonic patterning defects. *Genes & Development*, 13, 2801-2810.
- Drechsel, D.N., Hyman, A.A., Cobb, M.H., Kirschner, M.W., 1992: Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Mol. Biol. Cell*, 3, 1141-1154.
- Drewes, G., Ebner, A., Preuss, U., Mandelkow, E.M., Mandelkow, E., 1997: MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell*, 89, 297-308.
- Edbauer, D., Winkler, E., Haass, C., and Steiner, H., 2002: Presenilin and nicastrin regulate each other and determine amyloid β -peptide production via complex formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99, 8666-71.
- Edbauer, D., Willem, M., Lammich, S., Steiner, H., & Haass, C., 2002b: Insulin-degrading enzyme rapidly removes the beta-amyloid precursor protein intracellular domain (AICD). *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 13389-13393.
- Ertekin-Taner, N., 2010: Genetics of Alzheimer disease in the pre- and post-GWA era. *Alzheimer's Research & Therapy*, 2, 3
- Esler, W. P., Kimberly, W. T., Ostaszewski, B. L., Ye, W., Diehl, T. S., Selkoe, D. J., Wolfe, M. S., 2002: Activity-dependent isolation of the presenilin-1- γ -secretase complex reveals nicastrin and a substrate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99, 2720-5.
- Evin, G., Beyreuther, K., Masters, C.L., 1994: Alzheimer's disease amyloid precursor protein (A β PP): proteolytic processing, secretases and A β 4-amyloid production. *Int J Exp Clin Invest*, 1, 263-80.
- Evin, G., Wiedermann, A., 2002: Biogenesis and metabolism of Alzheimer's disease A β amyloid peptides. *Peptides*, 23 (7), 1285-97. Review
- Fabian, H., Szendrei, G.I., Mantsch, H.H., Otvos, L. Jr., 1993: Comparative analysis of human and Dutch-type Alzheimer b-amyloid peptides by infrared spectroscopy and circular dichroism. *Biochem Biophys Res Commun*, 191, 232-239.
- Fahrenholz, F., Gilbert, S., Kojro, E., Lammich, S., & Postina, R., 2000: Alpha-secretase activity of the disintegrin metalloprotease ADAM 10. Influences of domain structure. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 920, 215-222.
- Farrer, L.A., Cupples, L.A., Haines, J.L., Hyman, B., Kukull, W.A., Mayeux, R., Myers, R.H., Pericak-Vance, M.A., Risch, N., van Duijn, C.M., 1997: Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA*, 278 (16), 1349-56.
- Farrer, L.A., O'Sullivan, D.M., Cupples, L.A., Growdon, J.H., Myers, R.H., 1989: Assessment of genetic risk for Alzheimer's disease among first-degree relatives. *Ann Neurol*, 25, 485-93.
- Farzan, M., Schnitzler, C. E., Vasilieva, N., Leung, D., & Choe, H., 2000: BACE2, a beta-secretase homolog, cleaves at the beta site and within the amyloid-beta region of the amyloid-beta precursor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 9712-9717.
- Ferri, C.P., Prince, M., Brayne, C., Brodaty, H., Fratiglioni, L., Ganguli, M., Hall, K., Hasegawa, K., Hendrie, H., Huang, Y., Jorm, A., Mathers, C., Menezes, P.R., Rimmer, E., Scazufca, M., 2005: Alzheimer's Disease International: Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet*, 366, 2112-17.
- Finckh, U., Kuschel, C., Anagnostouli, M., Patsoiris, E., Pantos, G.V., Gatzonis, S., Kapaki, E., Davaki, P., Lamszus, K., Stavrou, D., Gal, A., 2005: Novel mutations and repeated findings of mutations in familial Alzheimer disease. *Neurogenetics*, 6, 85-89.
- Fleminger, S., Oliver, D.L., Lovestone, S., Rabe-Hesketh, S., Giora, A., 2003: Head injury as a risk factor for Alzheimer's disease: the evidence 10 years on, a partial replication. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 74, 857-62.
- Forman, M.S., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., 2000: New insights into genetic and molecular mechanisms of brain degeneration in tauopathies. *J Chem Neuroanat.*, 20 (3-4), 225-44. Review.
- Forster, D.P., Newens, A.J., Kay, D.W., Edwardson, J.A., 1995: Risk factors in clinically diagnosed pre senile dementia of the Alzheimer type: a case-control study in northern England. *J Epidemiol Community Health*, 49 (3), 253-8.
- Fraering, P. C., LaVoie, M. J., Ye, W., Ostaszewski, B. L., Kimberly, W. T., Selkoe, D. J., and Wolfe, M. S., 2004: Detergent-dependent dissociation of active γ -secretase reveals an interaction between Pen-2 and PS1-NTF and offers a model for subunit organization within the complex. *Biochemistry*, 43, 323-33.
- Fraser, P.E., Levesque, G., Yu, G., Mills, L.R., Thirwell, J., Frantseva, M., Gandy, S.E., Seeger, M., Carlen, P.L., St. George-Hyslop, P., 1998: Presenilin 1 is actively degraded by the 26S proteasome. *Neurobiol Aging*, 19, 19-21.

- Francis, R., McGrath, G., Zhang, J., Ruddy, D. A., Sym, M., Apfeld, J., Nicoll, M., Maxwell, M., Hai, B., Ellis, M. C., Parks, A. L., Xu, W., Li, J., Gurney, M., Myers, R. L., Himes, C. S., Hiebsch, R., Ruble, C., Nye, J. S., and Curtis, D., 2002: *aph-1 and pen-2 are required for Notch pathway signaling, γ -secretase cleavage of β APP, and presenilin protein accumulation*, *Dev. Cell*, 3, 85–97.
- Georgieff, I.S., Liem, R.K., Mellado, W., Nunez, J., Shelanski, M.L., 1991: *High molecular weight tau: preferential localization in the peripheral nervous system*. *J. Cell Sci.*, 100, 55–60.
- Gerdes, L.U., Klausen, I.B., Sihm, I., Faergeman, O., 1992: *Apolipoprotein E polymorphism in a Danish population compared to findings in 45 other study populations around the world*. *Genet Epidemiol*, 9, 155–167.
- Ghiso, J., Rostagno, A., Gardella, J.E., Liem, L., Gorevic, P.D., Frangione, B., 1992: *A 109-amino-acid C-terminal fragment of Alzheimer's-disease amyloid precursor protein contains a sequence, -RHDS-, that promotes cell adhesion*. *Biochem J.*, 15, 288 (Pt 3), 1053–9.
- Glenner, G.G., Wong, C.W., 1984: *Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein*. *Biochem Biophys Res Commun*, 120, 885.
- Glenner, G. G., Wong, C. W., Quaranta, V., Eanes, E. D., 1984: *The amyloid deposits in Alzheimer's disease: Their nature and pathogenesis*. *Applied Pathology*, 2, 357–369.
- Griffin, W. S., Stanley, L. C., Ling, C., White, L., MacLeod, V., Perrot, L. J., White, C. L., Araoz, C., 1989: *Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86, 7611–7615.
- Goate, A., Chartier-Harlin, M.C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., James, L., Mant, R., Newton, P., Rooke, K., Roques, P., Talbot, C., Pericak-Vance, M., Roses, A., Williamson, R., Rossor, M., Owen, M., Hardy, J., 1991: *Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease*. *Nature*, 349, 704–706.
- Goedert, M., Jakes, R., 1990: *Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization*. *EMBO J.*, 9, 4225–4230.
- Goedert, M., Spillantini, M.G., Jakes, R., Crowther, R.A., Vanmechelen, E., Probst, A., Gotz, J., Burki, K., Cohen, P., 1995: *Molecular dissection of the paired helical filament*. *Neurobiol. Aging*, 16, 325–334.
- Goedert, M., Spillantini, M.G., Jakes, R., Rutherford, D., Crowther, R.A., 1989a: *Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease*. *Neuron*, 3, 519–526.
- Goedert, M., Spillantini, M.G., Potier, M.C., Ulrich, J., Crowther, R.A., 1989b: *Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain*. *EMBO J.*, 8, 393–399.
- Good, P.F., Werner, P., Hsu, A., Olanow, C.W., Perl, D.P., 1996: *Evidence of neuronal oxidative damage in Alzheimer's disease*. *Am J Pathol*, 149, 21.
- Gouras, G. K., Xu, H., Jovanovic, J. N., Buxbaum, J. D., Wang, R., Greengard, P., Relkin, N. R., & Gandy, S., 1998: *Generation and regulation of beta-amyloid peptide variants by neurons*. *Journal of Neurochemistry*, 71, 1920–1925.
- Greenberg, S.G., Davies, P., 1990: *A preparation of Alzheimer paired-helical filaments that displays distinct tau proteins by polyacrylamide gel electrophoresis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 5827–5831.
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Quinlan, M., Tung, Y.C., Zaidi, M.S., Wisniewski H.M.: 1986 *Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments*. *J Biol Chem*, 261, 6084.
- Guerreiro, R.J., Baquero, M., Blesa, R., Boada, M., Brás, J.M., Bullido, M.J., Calado, A., Crook, R., Ferreira, C., Frank, A., Gómez-Isela, T., Hernández, I., Lleó, A., Machado, A., Martínez-Lage, P., Masdeu, J., Molina-Porcel, L., Molinuevo, J.L., Pastor, P., Pérez-Tur, J., Relvas, R., Oliveira, C.R., Ribeiro, M.H., Rogaeva, E., Sá, A., Samaranch, L., Sánchez-Valle, R., Santana, I., Tarraga, L., Valdivieso, F., Singleton, A., Hardy, J., Clarimón, J., 2010: *Genetic screening of Alzheimer's disease genes in Iberian and African samples yields novel mutations in presenilins and APP*. *Neurobiology of Aging*, 31, 725–731.
- Haass, C., Hung, A.Y., Selkoe, D.J., Teplow, D.B., 1994: *Mutation associated with a locus for Alzheimer's disease result in alternative processing of amyloid β -protein precursor*. *J Biol Chem*, 269, 17741–17748.
- Haass, C., Schlossmacher, M.G., Hung, A.Y., Vigo-Pelfry, C., Mellon, A., Ostaszewski, B.L., Lieberburg, I., Koo, E.H., Schenk, D., Teplow, D.B., Selkoe, D.J., 1992: *Amyloid β -peptide is produced by cultured cells during normal metabolism*. *Nature*, 359, 322–327.
- Hallman, D.M., Boerwinkle, E., Saha, N., Sandholzer, C., Menzel, H.J., Csazar, A., Utermann, G., 1991: *The apolipoprotein E polymorphism: comparison of allele frequencies and effects in nine populations*. *Am J Hum Genet*, 49, 338–349.
- Hanger, D.P., Hughes, K., Woodgett, J.R., Brion, J.P., Anderton, B.H., 1992: *Glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer's disease-like phosphorylation of tau: generation of paired helical filament epitopes and neuronal localization of the kinase*. *Neurosci. Lett.*, 147, 58–62.
- Haniu, M., Denis, P., Young, Y., Mendiaz, E.A., Fuller, J., Hui, J.O., Bennett, B.D., Kahn, S., Ross, S., Burgess, T., Katta, V., Rogers, G., Vassar, R., Citron, M., 2000: *Characterization of Alzheimer's beta-secretase protein BACE. A pepsin family member with unusual properties*. *J. Biol. Chem.*, 275, 21099–21106.
- Harada, A., Oguchi, K., Okabe, S., Kuno, J., Terada, S., Ohshima, T., Sato-Yoshitake, R., Takei, Y., Noda, T., Hirokawa, N., 1994: *Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein*. *Nature*, 369, 488–491.
- Hardy, J., Allsop, D., 1991: *Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease*. *Trends Pharmacol. Sci.* 12, 383–388.
- Hardy, J. a Selkoe, D.J., 2002: *The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics*. *Science*, 297, 353–56.
- Harper, J.D., Lansbury, P.T., 1997: *Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins*. *Annu. Rev. Biochem.*, 66, 385–407.

- Harris, F. M., Brecht, W. J., Xu, Q., Tesseur, I., Kekoni, L., Wyss-Coray, T., Fish, J. D., Masliah, E., Hopkins, P. C., Searce-Levie, K., Weisgraber, K. H., Mucke, L., Mahley, R. W., Huang, Y., 2003: Carboxyl-terminal-truncated apolipoprotein E4 causes Alzheimer's disease-like neurodegeneration and behavioral deficits in transgenic mice. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 100, 10966-10971.
- Hartmann, T., Bieger, S., Bruhl, B., Tienari, P., Ida, N., Allsop, D., Roberts, G., Masters, C., Dotti, C., Unsicker, K., Beyreuther, K., 1997: Distinct sites of intracellular production for Alzheimer's disease Ab40/42 amyloid peptides. *Nat. Med.*, 3, 1016-1020.
- Hendrie, H. C., Hall, K. S., Hui, S., Unverzagt, F. W., Yu, C. E., Lahiri, D. K., Sahota, A., Farlow, M., Musick, B., Class, C. A., Brashear, A., Burdine, V. E., Osuntokun, B. O., Ogunniyi, A. O., Gureje, O., Baiyewu, O., Schellenberg, G. D., 1995: Apolipoprotein E genotypes and Alzheimer's disease in a community study of elderly African Americans. *Ann Neurol.*, 37, 118-120.
- Hendriks, L., van Duijn, C. M., Cras, P., Cruts, M., van Hul, W., van Harskamp, F., Warren, A., McInnis, M. G., Antonarakis, S. E., Martin, J. J., Hofman, A., van Broeckhoven, C., 1992: Presenile dementia and cerebral haemorrhage linked to a mutation at codon 692 of the β -amyloid precursor protein gene. *Nature Genet.*, 1, 218-221.
- Herreman, A., Serneels, L., Annaert, W., Collen, D., Schoonjans, L., & De Strooper, B., 2000: Total inactivation of gamma-secretase activity in presenilin-deficient embryonic stem cells. *Nature Cell Biol.*, 2, 461-462.
- Hesse, L., Beher, D., Masters, C. L., Multhaup, G., 1994: The beta A4 amyloid precursor protein binding to copper. *FEBS Lett.*, 25;349(1), 109-116.
- Holtzman, D. M., Bales, K. R., Tenkova, T., Fagan, A. M., Parsadanian, M., Sartorius, L. J., Mackey, B., Olney, J., McKeel, D., Wozniak, D., Paul, S. M., 2000: Apolipoprotein E isoform-dependent amyloid deposition and neuritic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 97, 2892-2897.
- Hong, M., Chen, D. C., Klein, P. S., Lee, V. M.-Y., 1997: Lithium reduces tau phosphorylation by inhibition of glycogen synthase kinase-3. *J. Biol. Chem.*, 272, 25326-25332.
- Hooper, N. M., & Turner, A. J., 2002: The search for alpha-secretase and its potential as a therapeutic approach to Alzheimer's disease. *Current Medicinal Chemistry*, 9, 1107-1119.
- Howlett, D. R., Simmons, D. L., Dingwall, C., Christie, G., 2000: In search of an enzyme: The beta-secretase of Alzheimer's disease is an aspartic proteinase. *Trends in Neurosciences*, 23, 565-570.
- Huang, W., Qiu, C., von Strauss, E., Winblad, B., Fratiglioni, L., 2004: APOE genotype, family history of dementia, and Alzheimer disease risk. *Arch. Neurol.*, 61, 1930-1934.
- Huang, Y., Liu, X. Q., Wyss-Coray, T., Brecht, W. J., Sanan, D. A., Mahley, R. W., 2001: Apolipoprotein E fragments present in Alzheimer's disease brains induce neurofibrillary tangle-like intracellular inclusions in neurons. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 98, 8838-8843.
- Huse, J. T., Liu, K., Pijak, D. S., Carlin, D., Lee, V. M., & Doms, R. W., 2002: Beta-secretase processing in the trans-Golgi network preferentially generates truncated amyloid species that accumulate in Alzheimer's disease brain. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 16278-16284.
- Huse, J. T., Pijak, D. S., Leslie, G. J., Lee, V. M., Doms, R. W., 2000: Maturation and endosomal targeting of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme. *The Alzheimer's disease beta-secretase*. *J. Biol. Chem.*, 275, 33729-33737.
- Chang, S., ran Ma, T., Miranda, R. D., Balestra, M. E., Mahley, R. W., Huang, Y., 2005: Lipid- and receptor-binding regions of apolipoprotein E4 fragments act in concert to cause mitochondrial dysfunction and neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 20;102(51):18694-9.
- Iqbal, K., Alonso, Adel. C., Chen, S., Chohan, M. O., El-Akkad, E., Gong, C. X., Khatoon, S., Li, B., Liu, F., Rahman, A., Tanimukai, H., Grundke-Iqbal, I., 2005: Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim Biophys Acta*, 1739, 198-210.
- Ignatius, M. J., Gebicke-Harter, P. J., Pate Skene, J. H., Schilling, J. W., Weisgraber, K. H., Mahley, R. W., Shooter, E. M., Feb 1986: Expression of apolipoprotein E during nerve degeneration and regeneration. *Proceedings from the National Academy of Sciences, USA*, 83, 1125-1129.
- Imahori, K., Uchida, T., 1997: Physiology and pathology of tau pro-tein kinases in relation to Alzheimer's disease. *J. Biochem. (Tokyo)*, 121, 179-188.
- Ishikawa, A., Piao, Y. S., Miyashita, A., Kuwano, R., Onodera, O., Ohtake, H., Suzuki, M., Nishizawa, M., Takahashi, H., 2005: A mutant PSEN1 causes dementia with Lewy bodies and variant Alzheimer's disease. *Annals of Neurology*, 57, 429-434.
- Iwata, N., Tsubuki, S., Takaki, Y., Shirotani, K., Lu, B., Gerard, N. P., Gerard, C., Hama, E., Lee, H. J., & Saido, T. C., 2001: Metabolic regulation of brain Abeta by neprilysin. *Science*, 292, 1550-1552.
- Iwata, N., Tsubuki, S., Takaki, Y., Watanabe, K., Sekiguchi, M., Hosoki, E., Kawashima-Morishima, M., Lee, H. J., Hama, E., Sekine-Aizawa, Y., & Saido, T. C., 2000: Identification of the major Abeta1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: Suppression leads to biochemical and pathological deposition. *Nature Medicine*, 6, 143-150.
- Janicki, J. S., Monteiro, M. J., 1997: Increased apoptosis arising from increased expression of the Alzheimer's disease associated presenilin-2 mutation (N141I). *J Cell Biol.*, 139, 485-495.
- Janssen, J. C., Beck, J. A., Campbell, T. A., Dickinson, A., Fox, N. C., Harvey, R. J., Houlden, H., Rossor, M. N., Collinge, J., 2003: Early onset familial Alzheimer's disease: Mutation frequency in 31 families. *Neurology*, 60, 235-9.
- Jarrett, J. T., Berger, E. P., Lansbury Jr., P. T., 1993: The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry*, 32, 4693-4697.
- Ji, Z. S., Miranda, R. D., Newhouse, Y. M., Weisgraber, K. H., Huang, Y., Mahley, R. W., 2002: Apolipoprotein E4 potentiates amyloid beta peptide-induced lysosomal leakage and apoptosis in neuronal cells. *J Biol Chem.*, 14, 277(24):21821-8.
- Jones, C. T., Morris, S., Yates, C. M., Moffoot, A., Sharpe, C., Brock, D. J., St Clair, D., 1992: Mutation in codon 713 of the beta amyloid precursor protein gene presenting with schizophrenia. *Nature Genetics*, 1, 306-309.

- Juwa, K., Verkkoniemi, A., Viramo, P., Polvikoski, T., Kainulainen, K., Kontula, K., and Sulkava, R., 2000: APOE epsilon4 does not predict mortality, cognitive decline, or dementia in the oldest old. *Neurology* 54, 412–415.
- Kamboh, M.I., 2004: Molecular genetics of late-onset Alzheimer's disease. *Annals of Human Genetics*, 61, 381–404.
- Kamboh, M.I., Sepehriani, B., Ferrell, R.E., 1989: Genetic studies of human apolipoproteins. VI. Common polymorphism of apolipoprotein E in Blacks. *Disease Markers*, 7, 49–55.
- Kamino, K., Orr, H.T., Payami, H., Wijsman, E.M., Alonso, M.E., Pulst, S.M., Anderson, L., O'dahl, S., Nemens, E., White, J.A., 1992: Linkage and mutational analysis of familial Alzheimer disease kindreds for the APP gene region. *Am J Hum Genet*, 51(5), 998–1014.
- Kanamaru, K., Takio, K., Miura, R., Titani, K., Ihara, Y., 1992: Fetal-type phosphorylation of the tau in paired helical filaments. *J. Neurochem.*, 58, 1667–1675.
- Kang, J., Lemaire, H.G., Unterbeck, A., Salbaum, J.M., Masters, C.L., Grzeschik, K.H., Multhaup, G., Beyreuther, K., Muller-Hill, B., 1987: The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*, 325, 733–736.
- Khachaturian, A.S., Corcoran, C.D., Mayer, L.S., Zandi, P.P., Breitner, J.C., 2004: Apolipoprotein E epsilon4 count affects age at onset of Alzheimer disease, but not lifetime susceptibility: The Cache County Study. *Arch Gen Psychiatry*, 61, 518–24.
- Kim, T.W., Pettingell, W.H., Jung, Y.K., Kovacs, D.M., Tanzi, R.E., 1997: Alternative cleavage of Alzheimer-associated presenilins during apoptosis by a caspase-3 family protease. *Science*, 277, 373–376.
- Kim, S. H., and Sisodia, S. S., 2005: Evidence that the "NF" motif in transmembrane domain 4 of presenilin 1 is critical for binding with PEN-2. *J. Biol. Chem.*, 280, 41953–66.
- Kimberly, W. T., LaVoie, M. J., Ostaszewski, B. L., Ye, W., Wolfe, M. S., and Selkoe, D. J., 2002: Complex N-linked glycosylated nicastrin associates with active γ -secretase and undergoes tight cellular regulation. *J. Biol. Chem.*, 277, 35113–7.
- Kimberly, W. T., LaVoie, M. J., Ostaszewski, B. L., Ye, W., Wolfe, M. S., and Selkoe, D. J., 2003: γ -Secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, aph-1, and pen-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100, 6382–7.
- Kondo, J., Honda, T., Mori, H., Hamada, Y., Miura, R., Ogawara, M., Ihara, Y., 1988: The carboxyl third of tau is tightly bound to paired helical filaments. *Neuron*, 1, 827–834.
- Kukull, W.A., Higdon, R., Bowen, J.D., McCormick, W.C., Teri, L., Schellenberg, G.D., van Belle, G., Jolley, L., Larson, E.B., 2002: Dementia and Alzheimer disease incidence: a prospective cohort study. *Arch Neurol*, 59, 1737–46.
- Kruman, I. I. a Mattson, M. P., 1999: Pivotal role of mitochondrial calcium uptake in neural cell apoptosis and necrosis. *J. Neurochem.*, 72, 529–540.
- Kumar-Singh, S., De Jonghe, C., Cruys, M., Klei, R., Wang, R., Mercken, M., De Strooper, B., Vanderstichele, H., Lofgren, A., Vanderhoeven, I., Backhovens, H., Vanmechelen, E., Krols, P.M., Van Broeckhoven, C., 2000: Nonfibrillar diffuse amyloid deposition due to a gamma(42)-secretase site mutation points to an essential role for N-truncated abeta(42) in Alzheimer's disease. *Human Molecular Genetics*, 9, 2589–2598.
- Kurochkin, I. V., 1998: Amyloidogenic determinant as a substrate recognition motif of insulin-degrading enzyme. *FEBS Letters*, 427, 153–156.
- Kurochkin, I. V., 2001: Insulin-degrading enzyme: Embarking on amyloid destruction. *Trends in Biochemical Sciences*, 26, 421–425.
- Kyte, J., Doolittle, R.F., 1982: A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.*, 157, 105–132.
- Laudon, H., Hansson, E.M., Melen, K., Bergman, A., Farmery, M.R., Winblad, B., Lendahl, U., von Heijne, G., Naslund, J., 2005: A nine-transmembrane domain topology for presenilin 1. *J Biol Chem*, 280, 35352–35360.
- Lautenschlager, N.T., Cupples, L.A., Rao, V.S., Auerbach, S.A., Becker, R., Burke, J., Chui, H., Duara, R., Foley, E.J., Glatt, S.L., Green, R.C., Jones, R., Karlinsky, H., Kukull, W.A., Kurz, A., Larson, E.B., Martelli, K., Sadovnick, A.D., Volcker, L., Waring, S.C., Crowdon, J.H., Farrer, L.A., 1996: Risk of dementia among relatives of Alzheimer's disease patients in the MIRAGE study: What is in store for the oldest old? *Neurology*, 46(3), 641–50.
- Law, A., Gauthier, S., Quirion, R., 2001: Say NO to Alzheimer's disease: the putative links between nitric oxide and dementia of the Alzheimer's type. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 35, 73–96.
- Lee, V.M.-Y., Balin, B.J., Otvos, L., Jr., Trojanowski, J.Q., 1991: A68: a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal tau. *Science*, 251, 675–678.
- Lee, M.S., Kwon, Y.T., Li, M., Peng, J., Friedlander, R.M., Tsai, L.H., 2000: Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. *Nature (Lond.)* 405, 360–364.
- Lee, M.K., Slunt, H.H., Martin, L.J., Thinakaran, G., Kim, G., Gandy, S.E., Seeger, M., Koo, E., Price, D.L., Sisodia, S.S., 1996: Expression of presenilin 1 and 2 (PS1 and PS2) in human and murine tissues. *J. Neurosci*, 16, 7513–7525.
- Leem, J. Y., Vijayan, S., Han, P., Cai, D., Machura, M., Lopes, K. O., Veselits, M. L., Xu, H., and Thinakaran, G., 2002: Presenilin 1 is required for maturation and cell surface accumulation of nicastrin. *J. Biol. Chem.*, 277, 19236–40.
- Levy, E., Carman, M.D., Fernandez-Madrid, I.J., Power, M.D., Lieberburg, I., van Duinen, S.G., Bots, G.T., Luyendijk, W., Frangione, B., 1990: Mutations of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type. *Science*, 248, 1124–1126.
- Levy-Lahad, E., Wasco, W., Poorkaj, P., Romano, D. M., Oshima, J., Pettingell, W. H., Yu, C., Jondro, P. D., Schmidt, S. D., Wang, K., Crowley, A. C., Fu, Y.-H., Guenette, S. Y., Galas, D., Nemens, E., Wijsman, E. M., Bird, T. D., Schellenberg, G.D., Tanzi, R. E., 1995: Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science*, 269, 973–977.
- Levy-Lahad, E., Poorkaj, P., Wang, K., Fu, Y. H., Oshima, J., Mulligan, J., Schellenberg, G. D., 1996: Genomic structure and expression of STM2, the chromosome 1 familial Alzheimer disease gene. *Genomics*, 34, 198–204.

- Li, T., Ma, G., Cai, H., Price, D. L., and Wong, P. C., 2003: Nicastrin is required for assembly of presenilin/ γ -secretase complexes to mediate Notch signaling and for processing and trafficking of β -amyloid precursor protein in mammals. *J. Neurosci.*, 23, 3272–7.
- Li, X., Greenwald, I., 1996: Membrane topology of the *C. elegans* Sel-12 presenilin. *Neuron*, 17, 1015–1021.
- Li, X., Greenwald, I., 1998: Additional evidence for an eight-trans-membrane-domain topology for *Caenorhabditis elegans* and human presenilins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 7109–7114.
- Li, Y. M., Xu, M., Lai, M. T., Huang, Q., Castro, J. L., DiMuzio-Mower, J., Harrison, T., Lellis, C., Nadin, A., Neduvellil, J. G., Register, R. B., Sardana, M. K., Shearman, M. S., Smith, A. L., Shi, X. P., Yin, K. C., Shafer, J. A., Gardell, S. J., 2000: Photoactivated gamma secretase inhibitors directed to the active site covalently label presenilin 1. *Nature*, 405, 689–694.
- Ling, Y., Morgan, K., Kalsheker, N., 2003: Amyloid precursor protein (APP) and the biology of proteolytic processing: relevance to Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 35(11), 1505–35. Review.
- Lleo, A., Blesa, R., Queralt, R., Ezquerro, M., Molinuevo, J.L., Pena-Casanova, J., Rojo, A., Oliva, R., 2002: Frequency of mutations in the presenilin and amyloid precursor protein genes in early-onset Alzheimer disease in Spain. *Arch Neurol*, 59, 1759–63.
- LoPresti, P., Szuchet, S., Papasozomenos, S.C., Zinkowski, R.P., Binder, L.I., 1995: Functional implications for the microtubule-associated protein tau: localization in oligodendrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 10369–10373.
- Lovestone, S., Hartley, C.L., Pearce, J., Anderton, B.H., 1996: Phosphorylation of tau by glycogen synthase kinase-3 β in intact mammalian cells: the effects on the organization and stability of microtubules. *Neuroscience*, 73, 1145–1157.
- MacManus, A., Ramsden, M., Murray, M., Henderson, Z., Pearson, H., Campbell, V., 2000: Enhancement of 45Ca²⁺ influx and voltage dependent Ca²⁺ channel activity by β -amyloid (1–40) in rat cortical synaptosomes and cultured cortical neurons. *J Biol Chem*, 275, 713.
- Mahley, R.W., 1988: Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science*, 240, 622–630.
- Mahley, R.W., Huang, Y., 2006: Apolipoprotein (apo) E4 and Alzheimer's disease: unique conformational and biophysical properties of apoE4 can modulate neuropathology. *Acta Neurol Scand Suppl.*, 185, 8–14. Review.
- Mahley, R.W., Weisgraber, K.H., Huang, Y., 2006: Apolipoprotein E4: a causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(15):5644–51. Review.
- Mandelkow, E.M., Biernat, J., Drewes, G., Gustke, N., Trinczek, B., Mandelkow, E., 1995: Tau domains, phosphorylation, and interactions with microtubules. *Neurobiol Aging*, 16, 355.
- Mandelkow, E.M., Drewes, G., Biernat, J., Gustke, N., Van Lint, J., Vandenheede, J.R., Mandelkow, E., 1992: Glycogen synthase kinase-3 and the Alzheimer-like state of microtubule-associated protein tau. *FEBS Lett.*, 314, 315–321.
- Margallo-Lana, M., Morris, C.M., Gibson, A.M., Tan, A.L., Kay, D.W., Tyrer, S.P., Moore, B.P., Ballard, C.G., 2004: Influence of the amyloid precursor protein locus on dementia in Down syndrome. *Neurology*, 62, 1996–8.
- Mark, R.J., Blanc, E.M., Mattson, M.P., 1996: Amyloid β -peptide and oxidative cellular injury in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol*, 12, 211.
- Masters, C. L. a Beyreuther, K., 2005: *The neuropathology of Alzheimer's disease in the year 2005*, in *Neurodegenerative Diseases: Neurobiology, Pathogenesis and Therapeutics* (Beal M. F., Lang A. E. and Ludolph A. C., eds), pp. 433–440. Cambridge University Press, Cambridge.
- Matsuo, E.S., Shin, R.W., Billingsley, M.L., Van deVoorde, A., O'Connor, M., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.-Y., 1994: Biopsy-derived adult human brain tau is phosphorylated at many of the same sites as Alzheimer's disease paired helical filament tau. *Neuron*, 13, 989–1002.
- Mattson, M.P. a Chan, S.L., 2001: Dysregulation of cellular calcium homeostasis in Alzheimer's disease: bad genes and bad habits. *J Mol Neurosci*, 17, 205–224.
- Mawal-Dewan, M., Henley, J., Van d, V., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.-Y., 1994: The phosphorylation state of tau in the developing rat brain is regulated by phosphoprotein phosphatases. *J. Biol. Chem.*, 269, 30981–30987.
- Mayeux, R., Saunders, A.M., Shea, S., Mirra, S., Evans, D., Roses, A.D., Hyman, B.T., Crain, B., Tang, M.X., Phelps, C.H., 1998: Utility of the apolipoprotein E genotype in the diagnosis of Alzheimer's disease. *Alzheimer's Disease Centers Consortium on Apolipoprotein E and Alzheimer's Disease*. *N Engl J Med.*, 338, 506–511.
- Meda, L., Cassatella, M. A., Szendrei, G. I., Otvos, L., Baron, P. Jr, Villalba, M., Ferrari, D., Rossi F., 1995: Activation of microglial cells by β -amyloid protein and interferon- γ . *Nature*, 374, 647–650.
- Merrick, S.E., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.-Y., 1997: Selective destruction of stable microtubules and axons by inhibitors of protein serine/threonine phosphatases in cultured human neurons. *J. Neurosci.*, 17, 5726–5737.
- Morishima, Y., Gotoh, Y., Zieg, J., Barrett, T., Takano, H., Flavell, R., Davis, R.J., Shirasaki, Y., Greenberg, M.E., 2001: β -amyloid induces neuronal apoptosis via a mechanism that involves the c-Jun N-terminal kinase pathway and the induction of Fas ligand. *J Neurosci*, 2, 7551–7560.
- Morishima-Kawashima, M., Hasegawa, M., Takio, K., Suzuki, M., Yoshida, H., Watanabe, A., Titani, K., Ihara, Y., 1995: Hyperphosphorylation of tau in PHF. *Neurobiol. Aging*, 16, 365–371.
- Moss, M. L., Jin, S. L., Becherer, J. D., Bickett, D. M., Burkhart, W., Chen, W. J., Hassler, D., Leesnitzer, M. T., McGeehan, G., Milla, M., Moyer, M., Rocque, W., Seaton, T., Schoenen, F., Warner, J., & Willard, D., 1997: Structural features and biochemical properties of TNF- α converting enzyme (TACE). *Journal of Neuroimmunology*, 72, 127–129.
- Motonaga, K., Itoh, M., Becker, L. E., Goto, Y., & Takashima, S., 2002: Elevated expression of β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 2 in brains of patients with Down syndrome. *Neuroscience Letters*, 326, 64–66.
- Mullan, M., Crawford, F., Axelman, K., Houlden, H., Lilius, L., Winblad, B., Lannfelt, L., 1992: A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of β -amyloid. *Nature genet*, 1, 345–347.

- Multhaup, G., Schlicksupp, A., Hesse, L., Beher, D., Ruppert, T., Masters, C.L., Beyreuther, K., 1996: The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease in the reduction of copper(II) to copper(I). *Science*, 8;271(5254), 1406-9.
- Multhaup, G., Mechler, H., Masters, C.L., 1995: Characterization of the high affinity heparin binding site of the Alzheimer's disease beta A4 amyloid precursor protein (APP) and its enhancement by zinc(II). *J Mol Recognit.*, 8(4), 247-57.
- Murayama, M., Tanaka, S., Palacino, J., Murayama, O., Honda, T., Sun, X., Yasutake, K., Nihonmatsu, N., Wolozin, B., Takashima, A., 1998: Direct association of presenilin-1 with β -catenin. *FEBS Lett*, 433, 73-77.
- Murrell, J., Farlow, M., Ghetti, B., Benson, M.D., 1991: A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease. *Science*, 254, 97-99.
- Myers, R.H., Schaefer, E.J., Wilson, P.W., D'Agostino, R., Ordovas, J.M., Espino, A., Au, R., White, R.F., Knoefel, J.E., Cobb, J.L., McNulty, K.A., Beiser, A., Wolf, P.A., 1996: Apolipoprotein E epsilon4 association with dementia in a population-based study: The Framingham study. *Neurology*, 46, 673-7.
- Namba, Y., Tomonaga, M., Kawasaki, H., Otomo, E., and Ikeda, K.: 1991. Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain Res.* 541, 163-166.
- Neve, R.L., Harris, P., Kosik, K.S., Kurnit, D.M., Donlon, T.A., 1986: Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. *Brain Res.*, 387, 271-280.
- Nishimoto, I., Okamoto, T., Matsuura, Y., Takahashi, S., Okamoto, T., Murayama, Y., Ogata, E., 1993: Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein G(o). *Nature*, 4, 362(6415), 75-9.
- Nitsch, R. M., Slack, B. E., Wurtman, R. J., & Growdon, J. H., 1992: Release of Alzheimer amyloid precursor derivatives stimulated by activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Science*, 258, 304-306.
- Nitsch, R.M., Deng, A., Wurtman, R.J., Growdon, J.H., 1997: Metabotropic glutamate receptor subtype mGluR1 α stimulates the secretion of the amyloid β -protein precursor ectodomain. *J. Neurochem.*, 69, 704-712.
- Nordstedt, C., Caporaso, G.L., Thyberg, J., Gandy, S.E., Greengard, P., 1993: Identification of the Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein in clathrin-coated vesicles purified from PC12 cells. *J Biol Chem.*, 5, 268(1), 608-12.
- Nunan, J., & Small, D. H., 2000: Regulation of APP cleavage by alpha-, beta- and gamma-secretases. *FEBS Letters*, 483, 6-10.
- Oda, M., Morino, H., Maruyama, H., Terasawa, H., Izumi, Y., Torii, T., Sasaki, K., Nakamura, S., & Kawakami, H., 2002: Dinucleotide repeat polymorphisms in the neprilysin gene are not associated with sporadic Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, 320, 105-107.
- Okamoto, T., Takeda, S., Murayama, Y., Ogata, E., Nishimoto, I., 1995: Ligand-dependent G protein coupling function of amyloid transmembrane precursor. *J. Biol. Chem.*, 270, 4205-4208.
- Parvathy, S., Hussain, I., Karran, E.H., Turner, A.J., Hooper, N.M., 1999. Cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by alpha-secretase occurs at the surface of neuronal cells. *Biochemistry*, 38, 9728-9734.
- Pasalar, P., Najmabadi, H., Noorian, A.R., Moghimi, B., Jannati, A., Soltanzadeh, A., Krefft, T., Crook, R., Hardy, J., 2002: An Iranian family with Alzheimer's disease caused by a novel APP mutation (Thr714Ala). *Neurology*, 58, 1574-1575.
- Pellegrini, L., Passer, B.J., Tabaton, M., Ganjei, J.K., D'Adamo, L., 1999: Alternative, non-secretase processing of Alzheimer's beta-amyloid precursor protein during apoptosis by caspase-6 and -8. *J Biol Chem.*, 23, 274(30), 21011-6.
- Perez, A., Morelli, L., Cresto, J. C., & Castano, E. M., 2000: Degradation of soluble amyloid beta-peptides 1-40, 1-42, and the Dutch variant 1-40Q by insulin degrading enzyme from Alzheimer disease and control brains. *Neurochemistry Research*, 25, 247-255.
- Pericak-Vance, M.A., Bebout, J.L., Gaskell, P.C., Yamaoka, L.A., Hung, W.Y., Alberts, M.J., Walker, A.P., Bartlett, R.J., Haynes, C.S., Welsh, K.A., Earl, N.L., Heyman, A., Clark, C.M., Roses, A.D., 1991: Linkage studies in familial Alzheimer's disease: evidence for chromosome 19 linkage. *Am J Hum Genet*, 48, 1038-1050.
- Podlisny, M.B., Citron, M., Amarante, P., Sherrington, R., Xia, W., Zhang, J., Diehl, T., Levesque, G., Fraser, P., Haass, C., Koo, E.H., Seubert, P., St George-Hyslop, P., Teplow, D.B., Selkoe, D.J., 1997: Presenilin proteins undergo heterogeneous endoproteolysis between Thr291 and Ala299 and occur as stable N- and C-terminal fragments in normal and Alzheimer brain tissue. *Neurobiol. Dis.*, 3, 325-337.
- Poirier, J., 1994: Apolipoprotein E in animal models of CNS injury and in Alzheimer's disease. *Trends in Neuroscience*, 17(12), 525-530.
- Poirier, J., 1996: Apolipoprotein E in the brain and its role in Alzheimer's disease. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, 21, 28-134.
- Poirier, J., Davignon, J., Bouthellier, D., Kogan, S., Bertrand, P., Gauthier, S., 1993: Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. *The Lancet*, 342, 697-699.
- Ponte, P., Gonzalez-DeWhitt, P., Schilling, J., Miller, J., Hsu, D., Greenberg, B., Davis, K., Wallace, W., Lieberburg, I., and Fuller, F., 1988: A new A4 amyloid mRNA contains a domain homologous to serine proteinase inhibitors. *Nature (Lond)*, 331, 525-527.
- Pope, S.K., Shue, V.M., Beck, C., 2003: Will a healthy lifestyle help prevent Alzheimer's disease? *Ann Rev Public Health*, 24, 111-32.
- Price, J.L., Davis, P.B., Morris, J.C., White, D.L., 1991 The distribution of tangles, plaques and related immunohistochemical markers in healthy aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*, 12, 295-312
- Probst, A., Langui, D., Ulrich, J., 1991: Alzheimer's disease: a description of the structural lesions. *Brain Pathol*, 1, 229-39.
- Qiu, W. Q., Walsh, D. M., Ye, Z., Vekrellis, K., Zhang, J., Podlisny, M. B., Rosner, M. R., Safavi, A., Hersh, L. B., & Selkoe, D. J., 1998: Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid beta-protein by degradation. *The Journal of Biological Chemistry*, 273, 32730-32738.
- Raux, G., Guyant-Marechal, L., Martin, C., Bou, J., Penet, C., Brice, A., Hannequin, D., Frebourg, T., Campion, D., 2005: Molecular diagnosis of autosomal dominant early onset Alzheimer's disease: an update. *J Med Genet*, 42, 793-5.

- Ravaglia, G., Paola, F., Maioli, F., Martelli, M., Montesi, F., Bastagli, L., Bianchin, M., Chiappelli, M., Tumini, E., Bolondi, L., Licastro, F., 2006: Interleukin-1beta and interleukin-6 gene polymorphisms as risk factors for AD: a prospective study. *Exp Gerontol*, 41(1), 85-92. Review.
- Rebeck, G.W., Kindy, M., LaDu, M.J., 2002: Apolipoprotein E and Alzheimer's disease: the protective effects of ApoE2 and E3. *J Alzheimer's Dis*, 4(3):145-54. Review.
- Reiman, E.M., Chen, K., Alexander, G.E., Caselli, R.J., Bandy, D., Osborne, D., Saunders, A.M., Hardy, J., 2004: Functional brain abnormalities in young adults at genetic risk for late-onset Alzheimer's dementia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 6;101(1):284-9.
- Resnik, E., 1997: β -CateninD one player, two games (news). *Nat.Genet*, 16, 9±11.
- Reynolds, C.H., Nebreda, A.R., Gibb, G.M., Utton, M.A., Anderton, B.H., 1997a. Reactivating kinase:p38 phosphorylates tau protein in vitro. *J. Neurochem.*, 69, 191-198.
- Reynolds, C.H., Utton, M.A., Gibb, G.M., Yates, A., Anderton, B.H., 1997b. Stress-activated protein kinase:c-jun N-terminal kinase phosphorylates tau protein. *J. Neurochem.*, 68, 1736-1744.
- Rocca, W.A., Hofman, A., Brayne, C., Breteler, M.M., Clarke, M., Copeland, J.R., Dartigues, J.F., Engedal, K., Hagnell, O., Heeren, T.J., 1991: Frequency and distribution of Alzheimer's disease in Europe: a collaborative study of 1980-1990 prevalence findings. The EURODEM-Prevalence Research Group. *Ann Neurol*, 30, 381-90.
- Rogaev, E.I., Sherrington, R., Rogaeva, E.A., Levesque, G., Ikeda, M., Liang, Y., Chi, H., Lin, C., Holman, K., Tsuda, T., 1995: Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature (Lond)*, 376, 775-778.
- Rogaev, E. I., Sherrington, R., Wu, C., Levesque, G., Liang, Y., Rogaeva, E. A., Ikeda, M., Holman, K., Lin, C., Lukiw, W. J., deJong, P. J., Fraser, P. E., Rommens, J. M., St. George-Hyslop, P. H., 1997: Analysis of the S₂₈ sequence, genomic structure, and alternative splicing of the presenilin-1 gene (PSEN1) associated with early onset Alzheimer disease. *Genomics*, 40, 415-424.
- Rogaeva, E.A., Fafel, K.C., Song, Y.Q., Medeiros, H., Sato, C., Liang, Y., Richard, E., Rogaev, E.I., Frommelt, P., Sadovnick, A.D., Meschino, W., Rockwood, K., Boss, M.A., Mayeux, R., St George-Hyslop, P., 2001: Screening for PS1 mutations in a referral-based series of AD cases: 21 novel mutations. *Neurology*, 57, 621-625.
- Rogers, J., Schultz, J., Brachova, L., Lue, L. F., Webster, S., Bradt, B., Cooper, N. R. Moss, D. E., 1992: Complement activation and beta-amyloid-mediated neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Res.Immunol.* 143, 624-630.
- Romero, I., Jorgensen, P., Bolwig, G., Fraser, P.E., Rogaeva, E., Mann, D., Havsager, A.M., Jørgensen, A.L., 1999: A presenilin-1 Thr116Asn substitution in a family with early-onset Alzheimer's disease. *Neuroreport* 10, 2255-2260.
- Roses, A.D., 1996: Apolipoprotein E alleles as risk factors in Alzheimer's disease. *Annual Review of Medicine*, 47, 387-400.
- Rossjohn, J., Cappai, R., Feil, S.C., Henry, A., McKinsty, W.J., Galatis, D., 1999: Crystal structure of the N-terminal, growth factor-like domain of Alzheimer amyloid precursor protein. *Nat Struct Biol*, 6, 327-31.
- Rossor, M.N., Fox, N.C., Beck, J., Campell, T.C., Collinge, J., 1996: Incomplete penetrance of familial Alzheimer's disease in a pedigree with a novel presenilin-1 gene mutation. *Lancet*, 347, 1560.
- Sabo, S.L., Lanier, L.M., Ikin, A.F., Khorkova, O., Sahasrabudhe, S., Greengard, P., Buxbaum, J.D., 1999: Regulation of beta-amyloid secretion by FE65, an amyloid protein precursor-binding protein. *J Biol Chem.*, 19, 274(12), 7952-7.
- Sanan, D.A., Weisgreber, K.H., Russell, S.J., Mahley, R.W., Huang, D., Saunders, A., Schmechel, D., Wisniewski, T., Frangione, B., Roses, A., Strittmatter, W., 1994: Apolipoprotein E associates with b-amyloid peptide of Alzheimer's disease to form novel monofibrils. Isoform apoE4 associates more efficiently than apoE3. *J Clin Invest*, 94, 860-869.
- Sato, S., Kamino, K., Miki, T., Doi, A., Ii, K., St George-Hyslop, P.H., Ogihara, T., Sakaki, Y., 1998: Splicing mutation of presenilin-1 gene for early-onset familial Alzheimer's disease. *Human Mutation*, 1 Supp: 91-94.
- Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D., St. George-Hyslop, P.H., Pericak-Vance, M.A., Joo, S.H., Rosi, B.L., Gusella, J.F., Crapper-MacLachlan, D.R., Alberts, M.J., Hulette, C., Crain, B., Goldgaber, D., Roses, A.D., 1993: Association of apolipoprotein E allele e4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology*, 43, 1467-1472.
- Schellenberg, G.D., Bird, T.D., Wijsman, E.M., Orr, H.T., Anderson, L., Nemens, E., a kol: 1992: Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Science*, 258, 668-671.
- Schilling, S., Kontush, A., Arlt, S., Buhmann, C., Sturenburg, H. J., Mann, U., Muller-Thomsen, T., Beisiegel, U., 2000: Increased lipoprotein oxidation in Alzheimer's disease. *Free Radic. Biol. Med.*, 28, 351-360.
- Schlondorff, J., Becherer, J.D., Blobel, C.P., 2000: Intracellular maturation and localization of the tumour necrosis factor alpha convertase (TACE). *Biochem. J.*, 347, 131-138.
- Selkoe, D. J., 1989: Biochemistry of altered brain proteins in Alzheimer's disease. *Ann Rev Neurosci* 12, 463-490.
- Selkoe, D. J., 2001: Clearing the brain's amyloid cobwebs. *Neuron*, 32, 177-180.
- Selkoe D. J., 2001b: Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol. Rev.*, 81, 741-766.
- Sengupta, A., Wu, Q., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Singh, T.J., 1997: Potentiation of GSK-3-catalyzed Alzheimer-like phosphorylation of human tau by cdk5. *Mol. Cell Biochem.*, 167, 99-105.
- Seubert, P., Mawal-Dewan, M., Barbour, R., Jakes, R., Goedert, M., Johnson, G.V., Litsersky, J.M., Schenk, D., Lieberburg, I., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.-Y., 1995: Detection of phosphorylated Ser262 in fetal tau, adult tau, and paired helical filament tau. *J. Biol. Chem.*, 270, 18917-18922.
- Seubert, P., Oltersdorf, T., Lee, M. G., Barbour, R., Blomquist, C., Davis, D. L., Bryant, K., Fritz, L. C., Galasko, D., Thal, L. J., Lieberburg, I., & Schenk, D. B., 1993: Secretion of beta-amyloid precursor protein cleaved at the amino terminus of the beta-amyloid peptide. *Nature*, 361, 260-263.

- Shen, J., Bronson, R.T., Chen, D.F., Xia, W., Selkoe, D.J., Tonegawa, S., 1997: Skeletal and CNS defects in presenilin-1-deficient mice. *Cell*, 89, 629–639.
- Sherrington, R., Froelich, S., Sorbi, S., Campion, D., Chi, H., Rogaeva, E.A., Levesque, G., Ikeda, M., Lin, C., Li, G., Holman, K., 1995: Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*, 375, 754–760.
- Shoji, M., Golde, T. E., Ghiso, J., Cheung, T. T., Estus, S., Shaffer, L. M., Cai, X. D., McKay, D. M., Tintner, R., Frangione, B., & Younkin, S. G., 1992: Production of the Alzheimer amyloidbeta protein by normal proteolytic processing. *Science*, 258, 126–129.
- Siest, G., Pillot, G., Régis-Bailly, A., Leininger-Muller, B., Steinmetz, J., Galteau, M.M., Visvikis, S., 1995: Apolipoprotein E: an important gene and protein to follow in laboratory medicine. *Clin Chem*, 4, 1068–1086.
- Silverman, J.M., Li, G., Zaccario, M.L., Smith, C.J., Schmeidler, J., Mohs, R.C., Davis, K.L., 1994: Patterns of risk in first-degree relatives of patients with Alzheimer's disease. *Arch Gen Psychiatry*, 51, 577–86.
- Small, D. H., 2002: Is gamma-secretase a multienzyme complex for membrane protein degradation? Models and speculations. *Peptides*, 23, 1317–1321.
- Small, G.W., Ercoli, L.M., Silverman, D.H., Huang, S.C., Komo, S., Bookheimer, S.Y., Lavretsky, H., Miller, K., Siddarth, P., Rasgon, N.L., Mazziotta, J.C., Saxena, S., Wu, H.M., Mega, M.S., Cummings, J.L., Saunders, A.M., Pericak-Vance, M.A., Roses, A.D., Barrio, J.R., Phelps, M.E., 2000: Cerebral metabolic and cognitive decline in persons at genetic risk for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 23, 97(11), 6037–42.
- Smme, A., Xu, X., Nishiyama, K., Katada, T., Gambetti, P., Yadav, S.P., Wu, X., Shi, Y.C., Yasuhara, S., Homburger, V., Okamoto, T., 1998: Regulation of brain G-protein by Alzheimer's disease gene presenilin-1. *J. Biol. Chem*, 273, 16281–16288.
- Smith, M.A., Sayre, L.M., Anderson, V.E., Harris, P.L., Beal, M.F., Kowall, N., Perry, G., 1998: Cytochemical demonstration of oxidative damage in Alzheimer's disease by immunochemical enhancement of the carbonyl reaction with 2,4-dinitrophenylhydrazine. *J Histochem Cytochem*, 46, 731.
- Snyder, S.W., Lador, U.S., Wade, W.S., Wang, G.T., Barrett, L.W., Matayoshi, E.D., Huffaker, H.J., Kraft, G.A., Holzman, T.F., 1994: Amyloid-beta aggregation: selective inhibition of aggregation in mixtures of amyloid with different chain lengths. *Biophys. J.*, 67, 1216–1228.
- Sontag, E., Nunbhakdi-Craig, V., Bloom, G.S., Mumby, M.C., 1995: A novel pool of protein phosphatase 2A is associated with microtubules and is regulated during the cell cycle. *J. Cell Biol.*, 128, 1131–1144.
- Sontag, E., Nunbhakdi-Craig, V., Lee, G., Brandt, R., Kamibayashi, C., Kuret, J., White III, C.L., Mumby, M.C., Bloom, G.S., 1999: Molecular interactions among protein phosphatase 2A, tau, and microtubules. Implications for the regulation of tau phosphorylation and the development of tauopathies. *J. Biol. Chem.*, 274, 25490–25498.
- St George-Hyslop, P., McLachlan, D.C., Tsuda, T., Rogaev, E., Karlinsky, H., Lippa, C.F., Pollen, D., 1994: Alzheimer's disease and possible gene interaction. *Science*, 18, 263(5149), 904.
- Spillantini, M.G., Goedert, M., 1998: Tau protein pathology in neurodegenerative disease. *Trends Neurosci.*, 21, 428–433.
- Steiner, H., Romig, H., Grim, M.G., Philipp, U., Pesold, B., Citron, M., Baumeister, R., Haass, C., 1999: The biological and patho-logical function of the presenilin-1 DeltaE9 mutation is independent of its defect to undergo proteolytic processing. *J. Biol.Chem*, 274, 7615–7618.
- Steiner, H., Revesz, T., Neumann, M., Romig, H., Grim, M.G., Pesold, B., Kretzschmar, H.A., Hardy, J., Holton, J.L., Baumeister, R., Houlden, H., Haass, C., 2001: A pathogenic presenilin-1 deletion causes aberrant Abeta 42 production in the absence of congophilic amyloid plaques. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 7233–7239.
- Storey, E., Beyreuther, K., Masters, C.L., 1996: Alzheimer's disease amyloid precursor protein on the surface of cortical neurons in primary culture co-localizes with adhesion patch components. *Brain Res.*, 735, 217–231.
- Storey, E., Katz, M., Brickman, Y., Beyreuther, K., Masters, C.L., 1999: Amyloid precursor protein of Alzheimer's disease: evidence for a stable, full-length, trans-membrane pool in primary neuronal cultures. *Eur. J. Neurosci.*, 11, 1779–1788.
- Strittmatter, W.J., Saunders, A.M., Schmechel, D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G.S., and Roses, A.D., 1993: Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 1977–1981.
- Strittmatter, W.J., Saunders, A.M., Goedert, M., Weisgraber, K.H., Dong, L.M., Jakes, R., Huang, D.Y., Pericak-Vance, M., Schmechel, D., Roses, A.D., 1994: Isoform-specific interactions of apolipoprotein E with microtubule-associated protein tau: implications for Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 8, 91(23), 11183–6.
- Suh, Y.H. a Checler, F., 2002: Amyloid Precursor Protein, Presenilins, and α -Synuclein: Molecular Pathogenesis and Pharmacological Applications in Alzheimer's Disease. *Pharmacol Rev* 54, 469–525.
- Sullivan, P. M., Mezdour, H., Quarfordt, S. H., Maeda, N., 1998: Type III hyperlipoproteinemia and spontaneous atherosclerosis in mice resulting from gene replacement of mouse ApoE with human APOE2. *J. Clin. Invest.*, 102, 130–135.
- Tagliavini, F., Rossi, G., Padovani, A., Magoni, M., Andora, G., Sgarzi, M., Bizzi, A., Savoiardo, M., Carella, F., Morbin, M., Giaccone, G., Bugiani, O., 1999: A new BPP mutation related to hereditary cerebral haemorrhage. *Alzheimer's Reports* 2 Supp 1, 28.
- Taleghany, N., Oblinger, M.M., 1992: Regional distribution and biochemical characteristics of high molecular weight tau in the nervous system. *J. Neurosci. Res.*, 33, 257–265.
- Tanaka, S., Shiojiri, S., Takahashi, Y., Kitaguchi, N., Ito, H., Kameyama, M., Kimura, J., Ueda, K., 1989: Tissue-specific expression of three types of beta-protein precursor mRNA: enhancement of protease inhibitor-harboring types in Alzheimer's disease brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 165, 1406–1414.

- Tang, M.X., Stern, Y., Marder, K., Bell, K., Gurland, B., Lantigua, R., Andrews, H., Feng, L., Tycko, B., Mayeux, R., 1998: The APOE- ϵ 4 allele and the risk of Alzheimer disease among African Americans, whites, and Hispanics. *JAMA*, 279, 751–755.
- Terry, R. D., Katzman, R., 1983: Senile dementia of the Alzheimer type. *Ann Neurol* 14, 497–506.
- Tesco, G., Kim, T.W., Diehlmann, A., Beyreuther, K., Tanzi, R.E., 1998: Abrogation of the presenilin 1 β -catenin interaction and preservation of the heterodimeric presenilin 1 complex following caspase activation. *J. Biol. Chem*, 273, 33909–33914.
- Tesseur, I., Van Dorpe, J., Bruynseels, K., Bronfman, F., Sciôt, R., Van Lommel, A., Van Leuven, F., 2000a: Prominent axonopathy and disruption of axonal transport in transgenic mice expressing human apolipoprotein E4 in neurons of brain and spinal cord. *Am J Pathol*, 157(5), 1495–510.
- Tesseur, I., Van Dorpe, J., Spittaels, K., Van den Haute, C., Moechars, D., Van Leuven, F., 2000b: Expression of human apolipoprotein E4 in neurons causes hyperphosphorylation of protein tau in the brains of transgenic mice. *Am J Pathol*, 156(3), 951–64.
- Thinakaran, G., Borchelt, D.R., Lee, M.K., Slunt, H.H., Spitzer, L., Kim, G., Ratovitsky, T., Davenport, F., Nordstedt, C., Seeger, M., Hardy, J., Levey, A.I., Gandy, S.E., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Price, D.L., Sisodia, S.S., 1996: Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives in vivo. *Neuron*, 17, 181–190.
- Thinakaran, G., Regard, J.B., Bouton, C.M., Harris, C.L., Price, D.L., Borchelt, D.R., Sisodia, S.S., 1998: Stable association of presenilin derivatives and absence of presenilin interactions with APP. *Neurobiol. Dis*, 4, 438–453.
- Tran-Paterson, R., Willard, H. F., & Letarte, M., 1989: The common acute lymphoblastic leukemia antigen (neutral endopeptidase-3.4.24.11) gene is located on human chromosome 3. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 42, 129–134.
- Tsujimura, A., Yasojima, K., Hashimoto-Gotoh, T., 1997: Cloning of *Xenopus* presenilin- α and - β cDNAs and their differential expression in oogenesis and embryogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 231, 392–396.
- Turner, A. J., Isaac, R. E., & Coates, D., 2001: The neprilysin (NEP) family of zinc metalloendopeptidases: Genomics and function. *BioEssays*, 23, 261–269.
- Turner, P.R., O'Connor, K., Tate, W.P., Abraham, W.C., 2003: Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Prog Neurobiol*, 70, 1–32. Review.
- Tysoe, C., Whittaker, J., Xuereb, J., Cairns, N.J., Cruts, M., Van Broeckhoven, C., Wilcock, G., Rubinsztein, D.C., 1998: A presenilin-1 truncating mutation is present in two cases with autopsy-confirmed early-onset Alzheimer disease. *American Journal of Human Genetics*, 62, 70–76.
- Van Broeckhoven, C., Haan, J., Bakker, E., Hardy, J.A., van Hul, W., Wehnert, A., Vegter-Van der Vlis, M., Roses, R.A., 1990: Amyloid beta protein precursor gene and hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis (Dutch). *Science*, 248, 1120–1122.
- Van Duijn, C. M., Clayton, D., Chandra, V., Fratiglioni, L., Graves, A.B., Heyman, A., Jorm, A.F., Kokmen, E., Kondo, K., Mortimer, J., Rocca, W.A., Shalat, S.I., Soininen, H., Hofman, A., 1991: Eurodem risk factors research group: Familial aggregation of Alzheimer's disease and related disorders: a collaborative re-analysis of case-control studies. *Int J Epidemiol* 20(Suppl 2), 13–20.
- Van Duijn, C.M., Hendriks, L., Cruts, M., Hardy, J.A., Hofman, A., van Broeckhoven, C., 1991b: Amyloid precursor protein gene mutation in early-onset Alzheimer's disease. *Lancet*, 333, 978.
- Van Gassen, G., Annaert, W., Van Broeckhoven, C., 2000: Binding partners of Alzheimer's disease proteins: are they physiologically relevant? *Neurobiol Dis*, 7, 135–151.
- Vassar, R., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E. A., Denis, P., Teplow, D. B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., Jarosinski, M. A., Biere, A. L., Curran, E., Burgess, T., Louis, J. C., Collins, F., Treanor, J., Rogers, G., & Citron, M., 1999: Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science*, 286, 735–741.
- Vekrellis, K., Ye, Z., Qiu, W. Q., Walsh, D., Hartley, D., Chesneau, V., Rosner, M. R., & Selkoe, D. J., 2000: Neurons regulate extracellular levels of amyloid beta-protein via proteolysis by insulin-degrading enzyme. *Journal of Neuroscience*, 20, 1657–1665.
- Vetrivel, K.S., Zhang, Y.W., Xu, H., Thinakaran, G., 2006: Pathological and physiological functions of presenilins. *Mol Neurodegener.*, 12, 1:4.
- von Koch, C.S., Zheng, H., Chen, H., Trumbauer, M., Thinakaran, G., van der Ploeg, L.H., Price, D.L., Sisodia, S.S., 1997: Generation of APLP2 KO mice and early postnatal lethality in APLP2/APP double KO mice. *Neurobiol. Aging*, 18, 661–669.
- Walsh, D.M., Klyubin, I., Fadeeva, J.V., Cullen, W.K., Anwyl, R., Wolfe, M.S., Rowan, M.J., Selkoe, D.J., 2002a: Naturally secreted oligomers of amyloid β protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature*, 416, 535–539.
- Walsh, D.M., Klyubin, I., Fadeeva, J.V., Rowan, M.J., Selkoe, D.J., 2002b: Amyloid-beta oligomers: their production, toxicity and therapeutic inhibition. *Biochem. Soc. Trans.*, 30, 552–557.
- Walsh, D.M., Tseng, B.P., Rydel, R.E., Podlisky, M.B., Selkoe, D.J., 2000: The oligomerization of amyloid beta-protein begins intracellularly in cells derived from human brain. *Biochemistry*, 39, 10831–10839.
- Walter, J., Capell, A., Hung, A.Y., Langen, H., Schnolzer, M., Thinakaran, G., 1997: Ectodomain phosphorylation of amyloid precursor protein at two distinct cellular locations. *J Biol Chem*, 272, 1896–903.
- Walter, J., Grunberg, J., Capell, A., Pesold, B., Schindzielorz, A., Citron, M., Mendla, K., George-Hyslop, P.S., Multhaup, G., Selkoe, D.J., Haass, C., 1997: Proteolytic processing of the Alzheimer disease-associated presenilin-1 generates an in vivo substrate for protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 5349–5354.
- Walter, J., Schindzielorz, A., Grunberg, J., Haass, C., 1999: Phosphorylation of presenilin-2 regulates its cleavage by caspases and retards progression of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96, 1391–1396.
- Wang, H., Luo, W.J., Zhang, Y.W., Li, Y.M., Thinakaran, G., Greengard, P., Xu, H., 2004: Presenilins and gamma-secretase inhibitors affect intracellular trafficking and cell surface localization of the gamma-secretase complex components. *J Biol Chem*, 279, 40560–40566.

- Watanabe, N., Tomita, T., Sato, C., Kitamura, T., Morohashi, Y., and Iwatsubo, T., 2005: Pen-2 is incorporated into the γ -secretase complex through binding to transmembrane domain 4 of presenilin 1. *J. Biol. Chem.*, 280, 41967-75.
- Weidemann, A., König, G., Bunke, D., Fischer P., Salbaum, J. M., Masters, C. L., Beyreuther, K., 1989: Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell*, 57, 115-126.
- Weingarten, M.D., Lockwood, A.H., Hwo, S.Y., Kirschner, M.W., 1975: A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 1858-1862.
- Wiesgraber, K.H., 1994: Apolipoprotein E: structure-function relationships. *Adv Prot Chem*, 45, 249-320.
- Wiesgraber, K.H., Roses, A.D., Strittmatter, W.J., 1994: The role of apolipoprotein E in the nervous system. *Curr Opin Lipidol*, 5, 110-116.
- Wisnicki, C.M., Novak, M., Thogersen, H.C., Edwards, P.C., Runswick, M.J., Jakes, R., Walker, J.E., Milstein, C., Roth, M., Klug, A., 1988: Isolation of a fragment of tau derived from the core of the paired helical filament of Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 4506-4510.
- Wisniewski, T., and Frangione, B., 1992: Apolipoprotein E: a pathological chaperone protein in patients with cerebral and systemic amyloid. *Neurosci. Lett.* 135, 235-238.
- Wisniewski, T., Golabek, A., Matsubara, E., Ghiso, J., Frangione, B., 1993: Apolipoprotein E: binding to soluble Alzheimer's β -amyloid. *Biochem Biophys Res Commun*, 192, 359-365.
- Wolfe, M., Xia, W., Ostaszewski, B., Diehl, T., Taylor Kimberley, X., Selkoe, D., 1999: Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for endoproteolysis and γ -secretase activity. *Nature*, 398, 513-517.
- Wong, P.C., Zheng, H., Chen, H., Becher, M.W., Sirinathsinghji, D.J., Trumbauer, M.E., Chen, H.Y., Price, D.L., Van der Ploeg, L.H., Sisodia, S.S., 1997: Presenilin 1 is required for Notch1 and Dll1 expression in the paraxial mesoderm. *Nature*, 387, 288-292.
- Yan, R., Bienkowski, M. J., Shuck, M. E., Miao, H., Tory, M. C., Pauley, A. M., Brashier, J. R., Stratman, N. C., Mathews, W. R., Buhl, A. E., Carter, D. B., Tomasselli, A. G., Parodi, L. A., Heinrikson, R. L., & Gurney, M. E., 1999: Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease β -secretase activity. *Nature*, 402, 533-537.
- Yan, R., Munzner, J. B., Shuck, M. E., & Bienkowski, M. J., 2001: BACE2 functions as an alternative α -secretase in cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 34019-34027.
- Ye, S., Huang, Y., Mullendorff, K., Dong, L., Giedt, G., Meng, E. C., Cohen, F. E., Kuntz, I. D., Weisgraber, K. H., Mahley, R. W., 2005: Apolipoprotein (apo) E4 enhances amyloid- β peptide production in cultured neuronal cells: ApoE structure as a potential therapeutic target. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 102, 18700-18705.
- Yoshikai, S., Sasaki, H., Doh-ura, K., Furuya, H., and Sakaki, Y., 1990: Genomic organization of the human amyloid β -protein precursor gene. *Gene*, 87, 257-263.
- Yu, G., Chen, F., Levesque, G., Nishimura, M., Zhang, D.M., Levesque, L., Rogaeva, E., Xu, D., Liang, Y., Duthie, M., StGeorge-Hyslop, P.H., Fraser, P.E., 1998: The presenilin 1 protein is a component of a high molecular weight intracellular complex that contains β -catenin. *J. Biol. Chem*, 273, 16470-16475.
- Yu, G., Nishimura, M., Arawaka, S., Levitan, D., Zhang, L., Tandon, A., Song, Y. Q., Rogaeva, E., Chen, F., Kawai, T., Supala, A., Levesque, L., Yu, H., Yang, D. S., Holmes, E., Milman, P., Liang, Y., Zhang, D. M., Xu, D. H., Sato, C., Rogaeva, E., Smith, M., Janus, C., Zhang, Y., Aebbersold, R., Farrer, L. S., Sorbi, S., Bruni, A., Fraser, P., & St. George-Hyslop, P. H., 2000: Nicastrin modulates presenilin-mediated Notch/glp-1 signal transduction and β APP processing. *Nature*, 407, 48-54.
- Zekanowski, C., Styczynska, M., Peplonska, B., Gabrielewicz, T., Religa, D., Ilkowsky, J., Kijanowska-Haladyna, B., Kotapka-Minc, S., Mikkelsen, S., Pfeffer, A., Barczak, A., Luczywek, E., Wasiake, B., Chodakowska-Zebrowska, M., Gustaw, K., Laczkowski, J., Sobow, T., Kuznicki, J., Barcikowska, M., 2003. Mutations in presenilin 1, presenilin 2 and amyloid precursor protein genes in patients with early-onset Alzheimer's disease in Poland. *Exp Neurol*, 184, 991-6.
- Zhang, Z.H., Hartmann, H., Do, V.M., Abramowski, D., Sturchler-Pierrat, C., Staufenbiel, M., Sommer, B., vande Wetering, M., Clevers, H., Saftig, P., De Strooper, B., He, X., Yankner, B.A., 1998: Destabilization of β -catenin by mutations in presenilin-1 potentiates neuronal apoptosis. *Nature*, 395, 698-702.
- Zhang, Y.W., Luo, W.J., Wang, H., Lin, P., Vetrivel, K.S., Liao, F., Li, F., Wong, P.C., Farquhar, M.G., Thinakaran, G., Xu, H., 2005: Nicastrin is critical for stability and trafficking but not association of other presenilin/ γ -secretase components. *J Biol Chem*, 280, 17020-17026.
- Zheng, H., Jiang, M., Trumbauer, M.E., Sirinathsinghji, D.J., Hopkins, R., Smith, D.W., Heavens, R.P., Dawson, G.R., Boyce, S., Conner, M.W., 1995: B Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity. *Cell*, 81, 525-531.

MOLEKULÁRNO-GENETICKÁ DIAGNOSTIKA
ALZHEIMEROVEJ CHOROBY

RNDr. Katarína LEXO VÁ KOLEJÁKOVÁ, PhD.

pre Lundbeck Slovensko s.r.o.
vydala Zuzana Čičelová v roku 2012
grafický design © Zuzana Čičelová
tlač: Peter Prekop Print Production

vydanie 1.

Lundbeck Slovensko s.r.o.
Zvolenská 19
821 09 Bratislava 2

ISBN 978-80-89434-13-8

MUDr. Katarína Sitárová
MYASTÉNIA GRAVIS

MUDr. Peter Jombík, PhD.
OKULÁRNE VESTIBULÁRNE EVOKOVANÉ
MYOGÉNNE POTENCIÁLY

MUDr. Marek Sýkora, PhD.
PORUCHY KARDIOVASKULÁRNYCH REGULÁCIÍ U PACIENTOV
S NÁHLOU CIEVNOU MOZGOVOU PRÍHODOU

MUDr. Janka Surovcová, PhD.
PROTROMBOTICKÉ STAVY A TROMBÓZY
VENÓZNYCH SPLAVOV A MOZGOVÝCH ŽÍL

MUDr. Karin Gmitterová, PhD.
KOGNITÍVNE PORUCHY PRI PARKINSONOVEJ CHOROBE

MUDr. Ivana Vachalová, PhD.
STEREOTAKTICKÁ RÁDIOCHIRURGIA V LIEČBE
INTRAKRANIÁLNYCH ARTERIOVENÓZNYCH MALFORMÁCIÍ

MUDr. Monika Turčanová Koprušáková, PhD.
URČENIE DOMINANCIE HEMISFÉR
POMOCOU VYBRANÝCH VYŠETROVACÍCH METÓD

MUDr. Norbert Leško
AKÚTNÁ LIEČBA ISCHEMICKEJ CIEVNEJ MOZGOVEJ PRÍHODY

MUDr. Martina Martiníková
STATUS EPILEPTICUS

RNDr. Katarína Lexová Kolejáková, PhD.
MOLEKULÁRNO-GENETICKÁ DIAGNOSTIKA
ALZHEIMEROVEJ CHOROBY



Lundbeck Slovensko
Zvolenská 19
821 09 Bratislava 2

www.lundbeck.com

ISBN 978-80-89434-13-8



9 788089 434138