



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Studies

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Zdravotně sociální fakulta

Katedra laboratorních metod a informačních systémů

Bakalářská práce

Význam vyšetření predispozice pro pozdní Alzheimerovu chorobu pomocí metod molekulární biologie

Vypracoval: Michaela Kopačková

Vedoucí práce: Mgr. Dagmar Bystřická, Ph.D.

České Budějovice 2016

Abstrakt

Alzheimerova choroba patří mezi nejčastější typy demence, přičemž zahrnuje až 70% případů z více než 38 milionů lidí na světě trpících nějakou formou demence. Alzheimerovou chorobou většinou onemocní pacienti nad 65 let, ale existují i výjimky. Předpokládá se, že nemocných s Alzheimerovou chorobou bude v budoucnosti neustále přibývat. Její etiopatogeneze není doposud zcela objasněna, a proto je důležité se tomuto onemocnění více věnovat, ať už z hlediska určitých environmentálních a genetických rizikových faktorů, tak i z hlediska ekonomické zátěže pro společnost.

Předložená bakalářská práce shrnuje poznatky o Alzheimerově chorobě, o její neurobiologii, etiologii, diagnostice a genetických dispozicích, zejména pak o genech ApoE, APP, PSEN1 a PSEN2. Přítomnost alely $\epsilon 4$ genu pro apolipoprotein E prokazatelně přispívá k vyššímu riziku vzniku pozdní formy Alzheimerovy choroby, mutace v genech APP, PSEN1 a PSEN2 jsou naopak spojovány s Alzheimerovou chorobou s časným nástupem ještě před 65 rokem věku.

V experimentální části, bylo cílem praktické zvládnutí izolace DNA z periferní krve a buňkálního stěru, příprava a provedení PCR reakce, detekce PCR produktů pomocí gelové elektroforézy a samostatné vyšetření ApoE pomocí certifikovaného CVD StripAssay® Kit od firmy ViennaLab (PentaGen). Součástí byla taktéž optimalizace další molekulární genetické metody pro detekci variantních alel ApoE. Tato metoda se prováděla pomocí certifikovaného kitu DiaPlexQ™ ApoE od firmy SolGent Co., Ltd. Princip detekce je v tomto případě založen na real-time PCR.

Klíčová slova: Alzheimerova choroba – ApoE – APP – hybridizace – polymorfismus – gen

Abstract

Alzheimer's disease is the most common type of dementia. It affects up to 70% of cases from approximately 38 million people worldwide suffering from some type of dementia. Alzheimer's disease usually affects patients over 65 years of age, however, there are exceptions. It is presumed that the number of people with Alzheimer's disease will grow constantly in the future too. Its etiopathogenesis is not yet fully understood, that is why it is important to investigate dementia further, whether in terms of specific environmental and genetic risk factors, or in view of the economic burden for the society.

The presented bachelor's thesis summarises findings about Alzheimer's disease, its neurobiology, etiology, diagnostics and genetic predispositions, in particular the ApoE, APP, PSEN1 and PSEN2 genes. The presence of $\epsilon 4$ gene allele for apolipoprotein E provably contributes to the increased risk of the late form of Alzheimer's disease. On the contrary, mutation in APP, PSEN1 and PSEN2 genes are connected with Alzheimer's disease with the early onset of the disease, before 65 years of age.

The objective in the experimental part was to manage the practical isolation of DNA from peripheral blood and buccal swab, preparation and execution of PCR reaction, detection of PCR products by gel electrophoresis and independent examination of ApoE gene by a certified CVD StripAssay® Kit from ViennaLab company (PentaGen). The work also includes the optimisation of another molecular genetic method for the detection of variant alleles of ApoE gene. This method was carried out by a certified DiaPlexQ™ ApoE Kit from SolGent Co., Ltd. The principle of detection in this case is based on real-time PCR.

Keywords: Alzheimer's disease – ApoE – APP – hybridisation – polymorphism – gene

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma: „Vyšetření predispozice pro pozdní Alzheimerovu chorobu“ vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to – v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 3. 5. 2016

.....

Poděkování

Chtěla bych tímto poděkovat vedoucí mé bakalářské práce, Mgr. Dagmar Bystřické, Ph.D., za odborné vedení práce, cenné rady, optimismus a připomínky, které mi věnovala, a za možnost realizovat experimentální část v laboratoři GENLABS. Velké díky patří též rodičům za trpělivost a obětavost v průběhu celého studia.

Obsah

1	Teoretická část.....	11
1.1	Demence.....	11
1.1.1	Rozdělní demence.....	12
1.2	Historie Alzheimerovy choroby.....	14
1.3	Alzheimerova choroba	15
1.3.1	Diagnostika	15
1.3.2	Klinický obraz.....	17
1.3.3	Varovné příznaky.....	18
1.3.4	Epidemiologie	18
1.4	Neurobiologie Alzheimerovy choroby.....	21
1.4.1	Makroskopické změny.....	22
1.4.2	Mikroskopické změny.....	23
1.5	Genetika Alzheimerovy choroby	25
1.6	Geny související s rozvojem familiární formy Alzheimerovy choroby.....	25
1.6.1	Amyloidový prekurzorový protein	26
1.6.2	Presenilin 1	27
1.6.3	Presenilin 2	28
1.7	Geny související s rozvojem pozdní formy Alzheimerovy choroby.....	29
1.7.1	ApoE – Apolipoprotein E	30
1.7.2	A2M – alfa-2-makroglobulin.....	32
1.7.3	SORL1	33
1.7.4	IDE gen	33

1.7.5	Gen pro angiotenzinkonvertázu	34
2	Cíl práce.....	35
3	Metodika.....	36
3.1	Charakteristika souboru	36
3.2	Principy laboratorních metod.....	36
3.2.1	PCR – polymerázová řetězová reakce	36
3.2.2	Multiplex PCR.....	38
3.2.3	Gelová elektroforéza.....	39
3.2.4	Reverzní hybridizace na stripech.....	39
3.3	Postupy genetického vyšetření.....	40
3.3.1	Izolace DNA	40
3.3.2	Měření koncentrace DNA.....	43
3.3.3	Reverzní hybridizace na stripech, použití CVD StripAssay®	43
3.4	Optimalizace další molekulárně genetické metody.....	48
4	Výsledky.....	50
5	Diskuze.....	53
6	Závěr.....	56
7	Literatura	57

Seznam použitých zkratk

ACH	Alzheimerova choroba
DNA	deoxyribonukleotidová kyselina
mRNA	messenger RNA
PCR	polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)
EKG	elektrokardiografie
CNS	centrální nervová soustava
A2M	Alpha-2-Macroglobulin
ACE	angiotenzin konvertáza
FAD	Familial Alzheimers Disease (familiární Alzheimerova choroba)
APP	Amyloid prekursor protein
ApoE	Apolipoprotein E
IDE	inzulin degradující enzym
PSEN 1	Presenilin 1
PSEN 2	Presenilin 2
SNP	Single Nucleotide Polymorphism

Úvod

Alzheimerova choroba je závažné neurodegenerativní onemocnění, představující nejčastější druh demence. V České republice je počet pacientů odhadován minimálně na 70 000, a proto se o Alzheimerově chorobě mluví jako o tiché epidemii. V dnešní době není zcela známá její etiopatogeneze. Alzheimerova choroba se dělí na 2 podtypy: forma s časným začátkem, kdy se jedná o pacienty mladší 65 let, a forma s pozdním začátkem, kdy se první příznaky objevují po 65 roku života. K prvním příznakům patří poruchy z oblasti kognitivních funkcí, hlavně tedy poruchy paměti a pozornosti. Mezi neuropatologické nálezy u osob s Alzheimerovou chorobou patří zejména atrofie mozku, tvorba β – amyloidu, formace plaků, sterilní zánět a degenerace τ – proteinu.

K rizikovým faktorům, kromě věku, patří zejména faktory genetické. V současné době, kdy je medicína na vysoké úrovni, jsou známé některé geny související s rozvojem Alzheimerovi choroby. Jedná se především o geny pro APP, PSEN1, PSEN2 a ApoE. Poslední zmíněný gen pro ApoE hraje důležitou roli pro vznik Alzheimerovi choroby s pozdním začátkem. U tohoto proteinu jsou známé 3 izoformy: ApoE 2, ApoE 3 a ApoE 4. Homozygotní forma ApoE 4, představuje nejvyšší riziko pro vznik Alzheimerovi choroby s pozdním začátkem nemoci.

Doposud nebyl nalezen žádný lék, který by zcela vyléčil Alzheimerovu chorobu. Proto je důležité mít na paměti rizikové faktory pro vznik nemoci a snažit se jim vyhnout či je minimalizovat. Mezi takové faktory patří: špatná životospráva, obezita, kouření, vysoký krevní tlak, cukrovka, tělesná i mentální inaktivita, vyšší hladina homocysteinu a mnoho dalších.

V rámci bakalářské práce jsou shrnuty informace o Alzheimerově chorobě, především o genech, které mají velký vliv na její rozvoj. Jedná se o geny APP, PSEN1, PSEN2, ApoE, SORL1 a A2M. Součástí teoretické části je i popis nejvýznamnějších mikroskopických a makroskopických změn mozku u postižených s Alzheimerovou chorobou.

Cílem experimentální části práce bylo zvládnutí laboratorních metod – izolace DNA z periferní krve, izolace DNA z bukalního stěru, PCR, detekce mutací genu ApoE pomocí reverzní hybridizace na stripech. Dílčím cílem byla také optimalizace další molekulárně genetické metody pro detekci mutací v genu ApoE.

1 Teoretická část

1.1 Demence

Demence patří k nejzávažnějším problémům v oboru gerontopsychiatrie. O demenci nemůžeme tvrdit, že se jedná o konkrétní onemocnění. Jde spíše o syndrom, který popisuje více příznaků spojených s poklesem paměti, což u postižených zásadně ovlivňuje vykonávání každodenních činností. [1]

Typické pro demenci jsou úpadky základních kognitivních funkcí – intelektu, paměti, motivace. Nesmíme však zapomenout ani na úpadky exekutivních funkcí (schopnost správně seřadit jednotlivé podúkoly, schopnost plánovat), které mají za následek neschopnost samostatné existence postiženého.[2] Obecně lze konstatovat, že pokles těchto funkcí způsobuje změnu duševních schopností a tím je významně ovlivněn každodenní život člověka.[4] V důsledku progresu onemocnění může být postižena také soudnost, logické myšlení, exekutivní funkce, orientace, až nakonec dojde k těžké intelektové degeneraci. Demence postihuje ale také nekognitivní funkce, jako jsou poruchy emotivity (patické nálady, afektivní labilita, úbytek vyšších citů). [3]

Vývoj demence je popisován zejména u Alzheimerovy choroby, cerebeovaskulárního onemocnění, a dále u onemocnění spojených s postižením mozku. Demence může skončit i smrtí, kterou navozuje buď nepřímo, např. úrazy, anebo přímo selháním životních funkcí (Alzheimerova choroba).[3]

1.1.1 Rozdělní demence

Demence lze seřadit na základě četnosti výskytu a přítomnosti patologického proteinu v mozku na: [6]

- amyloidopatie
- synukleinopatie
- tauopatie
- vaskulární demence

a) Amyloidopatie

U amyloidopatií se v senilních placích v mozku vyskytuje patologický protein β - amyloid (proto se také označují jako amyloidopatie) a τ protein.[4]

Do této skupiny se řadí zejména Alzheimerova choroba. Zhruba 70% všech případů demence je připisováno právě Alzheimerově chorobě. [6] Časté klinické symptomy jsou problémy se zapamatováním konverzace, jmen nebo událostí. K symptomům v pozdějším stadiu patří narušená komunikace, špatný úsudek, změna chování, ale také obtíže při mluvení, polykání a chůzi, poruchy exekutivních (výkonnostních) funkcí přicházejí postupně.[4] Nejtypičtější pro tuto chorobu je porucha paměti, ačkoli implicitní paměť je u postižených dlouho zachována (jedná se např. o schopnost řídit automobil nebo motorické dovednosti). Objevuje se zde tzv. Ribottovo pravidlo – starší informace jsou pro pacienta ze začátku dobře vybavitelné ve srovnání s novými informacemi. Může se objevovat i tzv. Capgrasův příznak, kdy pacient například tvrdí o své manželce, že vypadá i mluví jako jeho manželka, ale není to jeho manželka, je to jen cizí žena. [6]

b) Synukleinopatie

Synukleinopatie tvoří asi 25% všech demencí a jsou druhou nejčastější příčinou syndromu demence. Do této skupiny patří demence s Lewyho tělísky, Parkinsonova choroba a mnohotná systémová atrofie. Pro demenci s Lewyho tělísky jsou mimo

kognitivního deficitu typické projevy, jako extrapyramidový syndrom, halucinatorní produkce a velmi kolísavý průběh. [6] Typický patologický protein přítomný v neuronech je α -synuclein, který se podílí na tvorbě Lewyho tělísek. [4] Rozdílný projev u pacientů s Parkinsonovou chorobou je ten, že halucinace se objevují až jako následek léčby L-dopou a postižení extrapyramidového systému je prokazatelné od počátku onemocnění. Dementní syndrom se projevuje teprve v pozdější fázi onemocnění po mnoha letech. Parkinsonovou chorobou onemocní okolo 10-30% pacientů. K nejčastějším příznakům patří i problémy s pohybem. [6]

c) Tauopatie

Mezi nejtypičtější demence patřící do této skupiny patří Pickova choroba. Tato choroba má jasný klinický obraz a její rozvoj je velmi pomalý. K typickým příznakům patří narušené sociální chování, změna osobnosti a postižení emocí a také výrazné narušení exekutivních funkcí. Mohou se zde objevovat i poruchy příjmu potravy, změna plynulosti řeči a akineze (nepohyblivost). [6]

Další onemocněním, zařazovaným mezi tauopatie, je progresivní supranukleární obrna. Pro pacienty jsou typické poruchy nálad, zpomalené psychomotorické tempo a apraxie, která se projevuje poruchou funkce oko-hybného nervu, extrapyramidovým syndromem (často bez třesu) a pseudobulbárním syndromem. [6]

d) Vaskulární demence

Jedná se o cévně podmíněný typ demence, který tvoří cca 10% všech demencí.[4] Vaskulární demenci lze dále dělit na tři základní podskupiny:

- strategicky umístěný mozkový infarkt – typické jsou infarkty postihující klíčové oblasti (frontální lalok, parietální lalok a talamické léze);
- multiinfarktová demence – tato demence postihuje difuzně kůru i podkorové oblasti mozku;
- subkortikální ischemická leukoencefalopatie – u této vaskulární demence dochází k postižení bílé hmoty mozkové při onemocnění malých cév. [6]

1.2 Historie Alzheimerovy choroby

Alzheimerova choroba je pojmenována po německém lékaři Aloisovi Alzheimerovi, který se narodil 14. června 1861 poblíž Würzburgu. Vystudoval medicínu, poté se stal zástupcem ředitele a následně ředitelem psychiatrické a neurologické kliniky. Alois Alzheimer zemřel na ledvinové selhání v roce 1915.[8]



Obr. č. 1: Dr. Alois Alzheimer. Převzato ze zdroje [23].

První zmínky o Alzheimerově chorobě se objevují v roce 1906-1907. Největšího úspěchu však Alzheimer dosáhl při výzkumu senilních procesů v mozkové tkáni. Kauzálním případem se stala 51-letá Auguste D., která byla v roce 1901 přijata do nemocnice se známkami deprese.[5] Jednalo se o zvláštní nemoc mozkové kůry. Auguste si nedokázala vzpomenout na své datum a místo narození. Trpěla předčasnými projevy postupně progredující demence. Poté co zemřela, Alzheimer provedl patologicko-anatomické vyšetření mozku a kazuistiku publikoval. Jako první lékař objevil v mozku této pacientky dvě abnormality, přítomnost senilních plaků a neurofibrilárních klubek. V roce 1906 uskutečnil přednášku „Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde“ česky nazvanou „O svérázném onemocnění mozkové kůry“ a stal se tak prvním lékařem, který přišel na podstatu Alzheimerovy choroby.[8] V roce 1910 navrhl německý psychiatr E. Kraepelin, aby tato choroba nesla název Alzheimerova demence. [5]

1.3 Alzheimerova choroba

Alzheimerovu chorobu (ACH) řadíme mezi degenerativní onemocnění mozku. Jedná se o proces, který je nevratný a progresivní. [35] Tento typ demence se většinou projevuje okolo 65. roku života, ale existují i takové formy ACH, které se objevují dříve. [9] Choroba je v dnešní době problémem jak zdravotním, tak i ekonomickým. ACH se dá velmi dobře popsat patologickými nálezy, které se opakují u všech postižených. Avšak i zde se nachází interindividuální variabilita, jako je například doba vzniku, rychlost progresu a další klinické odchylky. Důležitou roli mohou hrát genetické predispozice u postiženého jedince. [2]

V případě ACH se jedná především o kortikální demenci. Znamená to, že prvními příznaky jsou poruchy kognitivních funkcí. Jde o poruchy paměti – zapomínání nových paměťových obsahů, zapomínání pojmů, poruchy pozornosti atd. V pozdější fázi ale dochází také k poruchám nekognitivních funkcí, které zahrnují poruchy emotivity a chování. [3]

U ACH se vyskytují viditelné neuropatologické změny jako je např. atrofie mozku, selektivní zánik hlavně acetylcholinergních neuronů, tvorba β – amyloidu a formace plaků. [2] U většiny pacientů trpících touto chorobou lze na mozku prokázat zobrazovacími metodami, a po smrti i verifikovat obraz kortiko-subkortikální atrofie. Nejprve se atrofie objevuje v mediálních temporálních strukturách, kde vede k rozšíření temporálních rohů postranních mozkových komor. U některých pacientů můžeme tvrdit, že stupeň atrofie mozku odpovídá stupni postižení kognitivních funkcí, ale není to zdaleka pravidlem. [2]

1.3.1 Diagnostika

V případě podezření na ACH, se u pacienta provádí nejprve biochemické a hematologické vyšetření (krevní test může odhalit rozpad neuronových membrán), endokrinologické vyšetření, EKG, rentgen plic a zobrazení mozku. Ovšem konečná

diagnóza se stanoví pomocí histologického vyšetření mozku. [43][48] K diagnostice ACH se používají různé diagnostické přístupy, jako například:

- Magnetická rezonance mozku zjišťující strukturální příčiny.
 - Počítačová tomografie (CT) mozku zjišťující strukturální příčiny.
 - Jednofotonová emisní tomografie (SPECT) mozku sledující mozkový metabolismus.
 - Určení β – amyloidových peptidů v likvoru.
 - Stanovení fosforylovaného τ – proteinu a genotypu apolipoproteinu ApoE.
- [43]

V dnešní době jsou využívána k diagnostice ACH i diagnostická kritéria DSM-IV Americké psychiatrické asociace nastavená pro diagnostiku psychiatrických onemocnění. Tato Americká psychiatrická asociace charakterizuje ACH v několika bodech:

- 1.) Vývoj mnohonásobného kognitivního deficitu se projevuje:
 - a. Poruchou paměti – pacient se nedokáže naučit nové věci a nepamatuje si ty dříve naučené.
 - b. Alespoň jednou z těchto kognitivních funkcí:
 - Afázie – získaná porucha řeči.
 - Apraxie – neschopnost vykonat naučené a účelné pohyby, i když je pacient fyzicky schopen.
 - Agnózie – nerozpoznatelnost předmětů, osob a tvarů, ne na základě poškození sensorických funkcí.
 - Zhoršení výkonných funkcí – plánování, organizování apod.
 - 2.) Deficit těchto kognitivních funkcí je natolik zhoršený, že se to projevuje jak v aktivitách každodenních, tak i v sociálních a profesních.
 - 3.) Průběh úbytků kognitivních funkcí má vždy plíživý začátek a plynulý úbytek.
- [42]

1.3.2 Klinický obraz

První příznaky ACH se projevují nenápadně a pomalu. Průběh je plynulý, bez větších výkyvů. Onemocnění lze rozdělit podle závažnosti na tři stádia: lehké, střední a těžké. [3]

- 1.) Lehké stádium: U pacienta se projevují spíše kognitivní poruchy. Může se jednat jak o subjektivní poruchy, kdy si pacient uvědomuje problémy s pamětí, tak o objektivní poruchy, které se dají změřit psychologickými metodami. U pacienta se mohou objevit i známky deprese z důvodu uvědomění si dané choroby.[3]
- 2.) Střední stádium: Jedná se o kognitivní poruchy, kdy pacient ztrácí přehled o chorobě, nedokáže si už poradit s běžnými aktivitami denního života. Individuálně se mohou objevovat i behaviorální a psychologické příznaky demence.[3]
- 3.) Těžké stádium: U pacientů se objevují kognitivní poruchy v takové míře, že nepoznávají své okolí, příbuzné a bývají dezorientovaní místem a časem. Tito pacienti jsou závislí na péči ostatních. [3]

1.3.3 Varovné příznaky

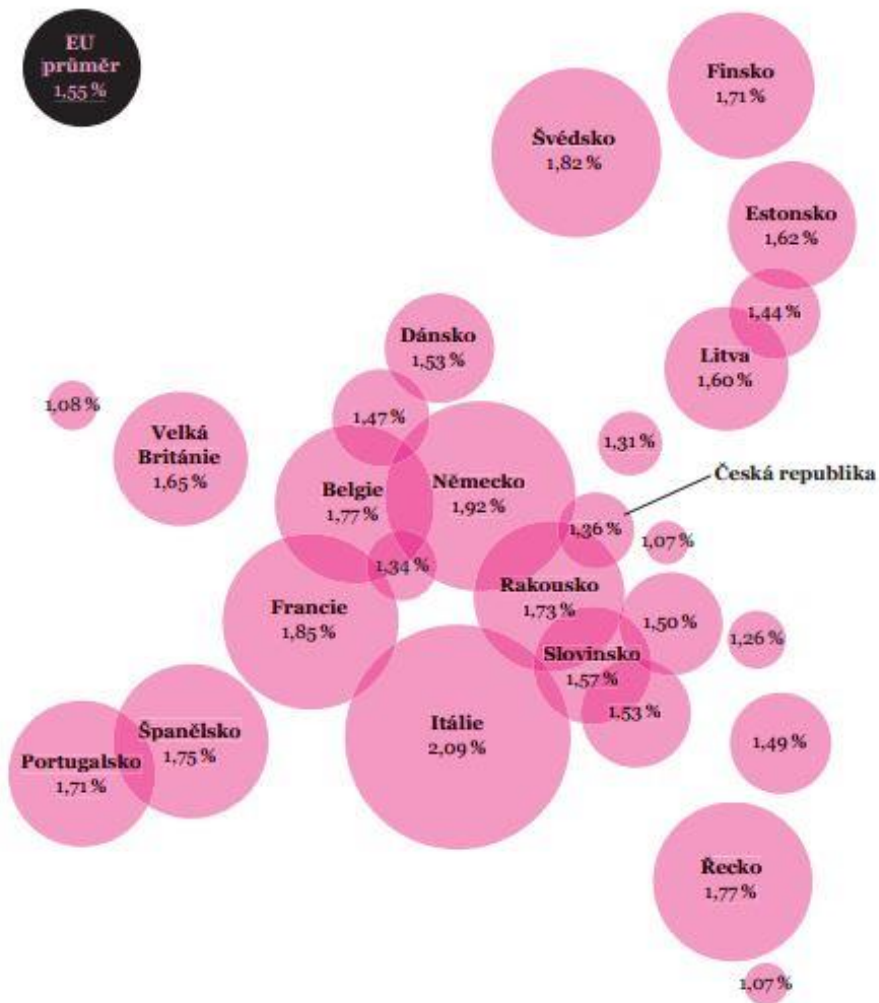
Česká Alzheimerova společnost uvádí na svých stránkách 10 příznaků, které mohou vést k Alzheimerově chorobě: [10]

- 1) Ztráta paměti, která ovlivňuje schopnost plnit běžné pracovní úkoly.
- 2) Neschopnost vykonat každodenní činnosti.
- 3) Poruchy řeči.
- 4) Dezorientace v času a v místě.
- 5) Zhoršení racionálního úsudku.
- 6) Neschopnost abstraktního myšlení.
- 7) Problémy dávat základní věci na správné místo.
- 8) Zvrácená nálada a chování.
- 9) Proměna osobnosti.
- 10) Deficit iniciativy. [10]

1.3.4 Epidemiologie

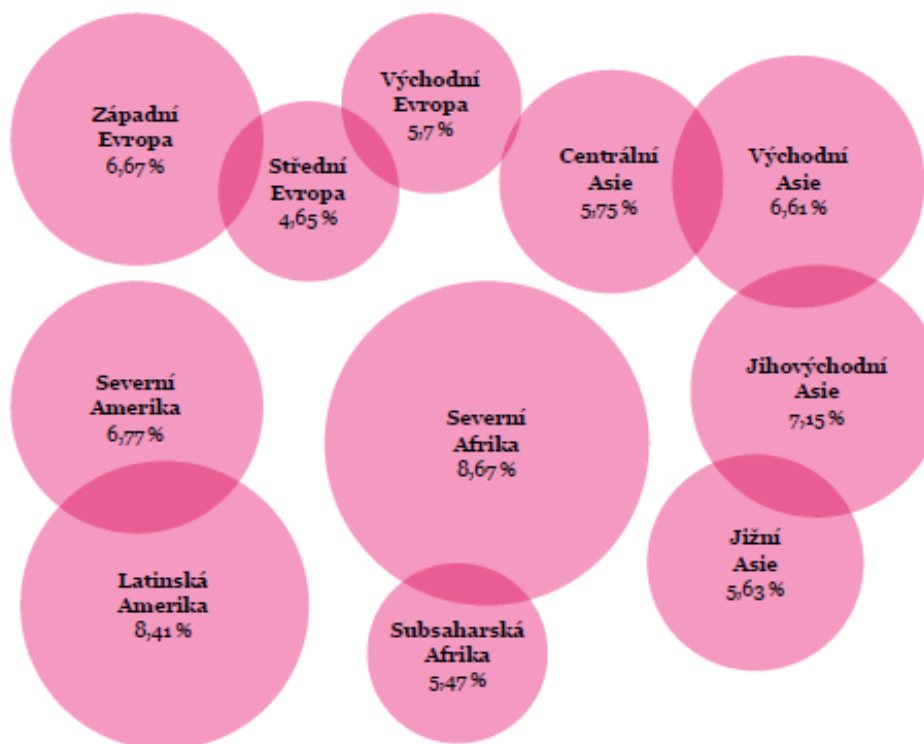
Alzheimerova choroba a její presenilní forma s časným začátkem není tak častá jako ACH s pozdním začátkem. Ve věkové populaci mladší 65-ti let trpí ACH 2-3% , nad 65 let se jedná o 5-7 % postižených ACH.[38]

Výsledky tiskové zprávy Alzheimer Europe z 13. července 2009 vypovídají o tom, že počet lidí trpících demencí je vyšší, než se původně předpokládalo.[44] Alzheimerovou chorobou je celosvětově postiženo přibližně 75% lidí trpících demencí. [13] Za předpokladu, že počet lidí trpících ACH se každých 20 let zdvojnásobuje, by mohlo být v roce 2050 postiženo ACH přibližně 131,5 milionů obyvatel. [15] Proto se o Alzheimerově chorobě mluví jako o tiché epidemii. [3]



Obr. č. 2: Srovnání prevalence demence ve státech EU v roce 2013. Převzato ze zdroje [14].

Dostupné informace ukazují na nižší výskyt ACH ve střední Evropě, kam patří i Česká republika, než v ostatních oblastech Evropy. [15]



Obr. č. 3: Alzheimerova choroba ve světě v roce 2015. Převzato ze zdroje [15].

Incidence ACH roste tedy zejména s věkem (nad 65 let). V literatuře se uvádí vyšší incidence u žen než u mužů. U mužů ale dochází k úmrtí dříve než u žen. [5]

Projekt Epidemiologie a genetika Alzheimerovy choroby se zabýval dotazníkovým šetřením pacientů s ACH. Cílem studie bylo posouzení vlivů určitých potenciálních rizikových faktorů pro vznik ACH a určení vztahu mezi ACH a polymorfizmy kandidátních genů. Sledováno bylo 334 případů s ACH a 102 zdravých kontrol pocházejících z psychiatrických ústavů v České republice. Výsledky ukázaly následující: 47% případů ACH a 39% kontrolních osob mělo základní vzdělání. [13] K vyšší incidenci ACH přispívá úroveň tedy úroveň vzdělání. Čím je vyšší vzdělání, tím se snižuje riziko vzniku ACH. [5] U 85% případů probíhalo onemocnění pomalu, což je typické pro ACH a může být vyloučen jiný typ demence (např. vaskulární). U osob

s anamnézou ACH se objevuje také vyšší výskyt kardiovaskulárních onemocnění. Proto také kardiovaskulární onemocnění patří k rizikovým faktorům pro ACH.[13]

1.4 Neurobiologie Alzheimerovy choroby

Skutečná etiopatogeneze ACH není doposud zcela objasněna.[36] Jedná se především o úbytek zdravých neuronů a snížení synaptické plasticity.[2]

Největší problém představuje patologické ukládání degenerativního proteinu β -amyloidu v mozku. Amyloid β vzniká štěpením amyloidového prekurzorového proteinu (APP) enzymem β sekretázou. Tento enzym se fyziologicky nachází na membránách nervových buněk. [2]

U zdravého člověka je APP štěpen enzymem α sekretázou na solubilní nonamyloidové fragmenty o velikosti max. 39 aminokyselin s neuroprotektivním vlivem. U ACH dochází ke štěpení APP β a γ sekretázou, v jiných místech β -amyloidu, než štěpí α sekretáza. Díky tomu pak vznikají delší fragmenty o velikosti 42 – 43 aminokyselinách. [2] Vzniklé fragmenty se spojují v neurotoxické oligomery a tím se formují delší vlákna tzv. fibrily. Následně v extracelulárním prostoru kortexu koagulují a tvoří dlouhá vlákna β -amyloidu za vzniku patologických útvarů nazývaných plaky.[3]

U pacientů s časným začátkem ACH, kde se patologicky štěpí APP, byla zjištěna přítomnost mutace v APP genu, který je lokalizován na dlouhém raménku chromozomu 21 (21q21.3).[2] Existuje ale více mutací souvisejících s časným výskytem ACH. Jedná se o mutace v genech přítomných na 1. a 14. chromozómu kódujících proteiny nazývané preseniliny. Tyto preseniliny následně přispívají ke vzniku β amyloidu. Preseniliny jsou základní součástí γ sekretázového komplexu katalyzujícího štěpení membránových proteinů včetně APP. V případě mutace mohou působit stejně jako proteázy γ sekretázy, což vede ke štěpení APP na delší neurotoxické fragmenty.[38]

Na tvorbě β amyloidu se podílí ještě další rizikový genetický faktor a tím je apolipoprotein E (ApoE). U ApoE se vyskytuje genetický polymorfismus, kdy jsou známy 3 izoformy genu: ApoE2, ApoE3 a ApoE4.[38] U 16-17% případů je prokázána

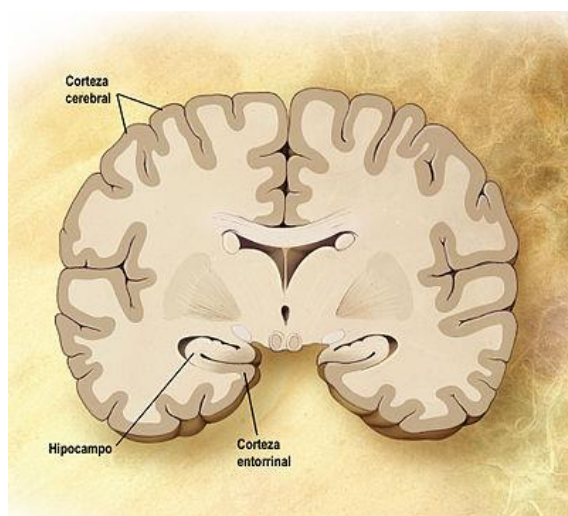
přítomnost Apo-E4 v homozygotní formě. [41] Genetické podstatě Alzheimerovy choroby a apolipoproteinu E jsou věnovány další kapitoly.

1.4.1 Makroskopické změny

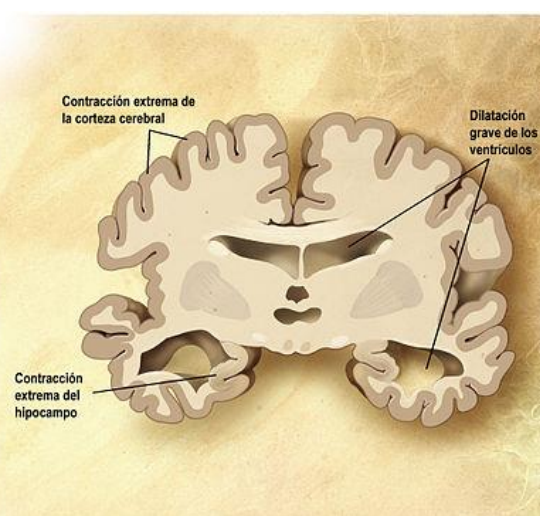
Obecně platí, že s přibývajícím věkem klesá jak hmotnost, tak i velikost mozku. [5] Je prokázáno osmnáctiprocentní pokles hmotnosti mozku u lidí od 77 do 100 let ve srovnání s mladšími jedinci od 20 do 49 let. Dalším problémem s přibývajícím věkem je také pokles objemu mozku. Například u lidí ve věku 80 – 95 let v porovnání s lidmi ve věku 23 - 44 let se jedná o 2% úbytek objemu mozkové kůry a asi tak o 5% úbytek objemu bílé hmoty mozkové. Dále se může jednat i o snížení tloušťky mozkové kůry. U lidí ve věku 20 - 50 let se jedná spíše o úbytek šedé hmoty mozkové, v pozdějším věku je popisován i úbytek bílé hmoty mozkové. Může také dojít k rozšiřování mozkové komory, které se objevuje po 60. roce života. [8]

Tyto změny mozku objevující se ve stáří se obdobně nachází i u lidí s Alzheimerovou chorobou.[5] Jedná se též o snížení hmotnosti a objemu mozku, ztenčení mozkové kůry a rozšiřování se mozkové komory. Změny jsou více prokazatelné u presenilních onemocnění, kdy hmotnost mozku může být 200 – 300g (normální hmotnost mozku je přibližně 1300 – 1400 g). Pozdní forma ACH se většinou projeví lehkým zužováním mozkových závitů a malým rozšiřováním rýh mezi závitů, hlavně v temenní a spánkové kůře mozkové. [8] V průběhu choroby významně klesá objem mozkové kůry, nejvíce v mediálních temporálních strukturách. [36]

Mozek zdravého jedince



Mozek postižený ACH



Obr. č. 4: Mozek zdravého a postiženého jedince ACH. Převzato ze zdroje [16].

1.4.2 Mikroskopické změny

a) Neurony

Hlavní makroskopickou změnou u ACH je atrofie mozkové tkáně. Následkem atrofie vzniká poškození projekčních oblastí. Mezi mikroskopicky viditelné příznaky patří numerická atrofie neuronů, neuritické plaky a přítomnost neurofibrilárních uzlíčků. Nejčastěji se jedná o poškození „velkých“ neuronů s plochou nad $90 \mu\text{m}^2$, které se zmenšují nebo zcela mizí.[5] Největší snížení počtu cholinergních vláken u ACH bylo nalezeno ve spánkové asociační kůře.

S rozvojem onemocnění dochází také ke změnám dendritických systémů a synapsí. Všechny tyto příznaky vedou k poruše kognitivních funkcí. Jak moc je postižena kognitivní funkce souvisí také i s množstvím amyloidu v hipokampu. [8] Díky numericky atrofujícím cholinergním neuronům bazálního telencefala dochází k poklesu množství korové acetylcholinesterázy a cholinacetyltransferázy. U pacientů s ACH jsou dendrity výrazněji kratší, mají menší počet větviček i méně spin (presynaptických částí

synapsí) v porovnání se zdravým člověkem. Přesný mechanismus zániku neuronů při Alzheimerově chorobě není zcela objasněn.[8]

b) Senilní plaky

V histologických řezech pacientů s ACH se nachází ve větší míře senilní plaky. Jedná se o heterogenní útvary velikostí 10-200 μm , obsahující β -amyloid. U zdravého člověka se tyto plaky také vyskytují, ale v menším počtu než u jedinců s diagnostikovanou ACH. [5]

Celkem existuje více typů senilních plaků, které jsou patogeneticky podobné. Liší se především přítomností a druhem degenerace neuronálních výběžků a přítomností β -amyloidu. U stárnoucích lidí se normálně nachází neuronální výběžky a amyloid v senilních plakách. [8] Mohou se také objevit dystrofické neurity, které se nachází i u osob s ACH, na rozdíl od tzv. spirálních vláken, které jsou přítomny především u osob s ACH a u neurodegenerativních osob.[5] Ve spirálních vláknech se prokazuje pomocí imunochemických metod přítomnost τ -proteinu a ubikvitinu. [8]

c) τ -protein

Lidský τ -protein je kódován genem τ , který je lokalizován na chromozómu 17q21 a je složen z celkem 16 exonů podléhajících alternativnímu sestřihu. Tento gen kóduje τ -protein hojně exprimovaný v neuronech, který patří do rodiny tzv. MAPs (mikrotubule-associated proteins) proteinů, tedy proteinů asociovaných s mikrotubuly (tubulin vázící proteiny). Jedná se o protein fungující jako promotor pro polymeraci mikrotubulů, který umožňuje spojení mikrotubul v axonech. U zdravého člověka je prakticky všechen τ protein vázán mikrotubuly, kde podporuje jejich polymerizaci a podílí se na jejich struktuře a stabilitě. Důležitou roli hraje také v axonálním transportu.[11] U lidí s ACH je τ -protein nadměrně fosforylován, vyskytuje se volně v cytosolu nebo vytváří neurofibrilární smotky a přestává pak udržovat mikrotubulární síť.[38] Axonální přenos je narušen a postižené neurony podléhají apoptóze. Následně dojde ke snížení synaptické plasticity a k dalším degenerativním změnám. [2]

1.5 Genetika Alzheimerovy choroby

ACH můžeme rozdělit dle časového období jejího nástupu a možných genetických predispozic na dva typy:

- 1.) Časná familiární forma ACH (FAD) tzv. presenilní forma, jejíž příznaky se objevují u pacientů již před 65. rokem života. [22] Tento typ ACH je spojován s přítomností mutací v genech pro amyloidní prekurzorový protein (APP), presenilin 1 (PSEN1) a presenilin 2 (PSEN2).[51] Mutace v těchto třech genech jsou zodpovědné za autozomálně dominantní familiární formu ACH s vysokou penetrancí závislou na věku, přičemž je tato forma spíše vzácná. [22]
- 2.) Pozdní forma ACH tzv. idiopatická neboli sporadická je charakterizována pozdním nástupem příznaků, které se začínají objevovat od 65 roku života. [22] V tomto případě je zatím znám jediný genetický rizikový faktor či spíše predispozice pro vznik ACH, jedná se o izoformu E4 genu pro apolipoprotein E (ApoE4). V tomto případě mají nositelé izoformy ApoE4 pouze zvýšené riziko, nejedná se tedy o absolutní riziko pro vznik ACH [12]

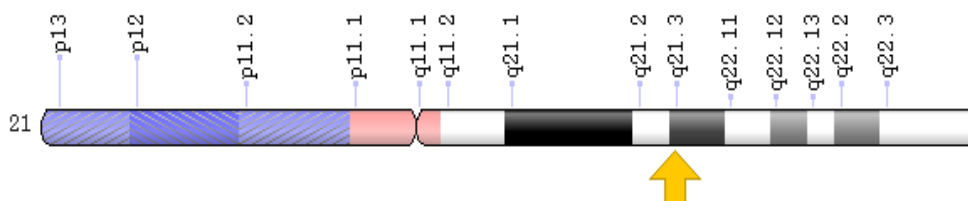
1.6 Geny související s rozvojem familiární formy Alzheimerovy choroby

Touto formou ACH onemocní pouze 5 - 10 % pacientů.[5] V dnešní době je alarmující, že každých 5 let se počet nově vzniklých případů zvyšuje, a to až na dvojnásobek.[38] Jedná se o mutace genů lokalizovaných na chromozomu 21q21.2 (APP gen), na chromozomu 1q42.13 (gen PSEN 2), a na chromozomu 14q24.3 (gen PSEN 1).[8]

Vzhledem k autozomálně dominantní dědičnosti časně ACH, potomek jehož biologická matka nebo otec nesou genetickou mutaci pro FAD, má 50% pravděpodobnost, že zdědí také tuto mutaci. V případě, že se tak stane, má dítě velmi velkou pravděpodobnost vzniku FAD. [18]

1.6.1 Amyloidový prekurzorový protein

APP gen je lokalizován na dlouhém raménku chromozomu 21 (21q21.3). [25]



Obr. č. 5: Lokalizace APP na chromozomu 21. Převzato ze zdroje [25].

APP gen kóduje amyloidní prekurzorový protein (APP). Ten je exprimován v mnoha tkáních a orgánech včetně mozku a míchy (CNS). [25] V případě patologického štěpení vzniká β amyloid ($A\beta$) o velikosti 40-42 aminokyselin, přičemž varianta $A\beta_{42}$ je nejvíce neurotoxická a vyskytuje se jako hlavní část amyloidových plaků v mozku pacientů s ACH. [37]

APP představuje transmembránový protein s jedním transmembránovým úsekem, který se nachází v endozomech, lysozomech, ER a Golgiho aparátu. Fyziologicky je $A\beta$ štěpen endoproteolyticky α sekretázou přímo uvnitř transmembránové domény, a neurotoxický β amyloidový peptid se téměř nevytváří. [37]

Zatím je známo jen málo funkcí tohoto proteinu. Vědci se domnívají, že se může vázat ještě na jiné proteiny na povrchu buněk. Někteří dokonce tvrdí, že v mozku pomáhá i řídit pohyb nervových buněk během časného vývoje. [25]

Sestříhem genu APP složeného z 19 exonů vznikne více než 10 různých izoforem, přičemž alternativnímu splicingu podléhají exony 7, 8 a 15. [22] [52] Z těchto izoforem se v mozku nejvíce nachází transkripty APP695, APP751 a APP770, [22]

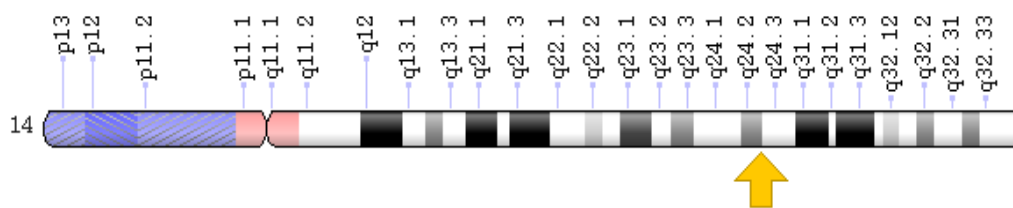
Mutace APP genu se vyskytují u méně než 0.1% případů FAD. Celkem bylo nalezeno více než 30 mutací v APP genu, přičemž 25 z nich je považováno za patogenní mutace. [53] Konkrétně se jedná o 32 mutací s klinickým významem, 1 mutaci s nejasným významem a 6 benigních mutací identifikovaných v rámci 90 rodin. [54] Patogenní mutace byly identifikovány v nejméně 77 rodinách s FAD po celém

světě.[55] Následkem těchto mutací vznikají neurotoxické β amyloidové fragmenty vyvolávající oxidační stres a poškození nervových buněk [22]. K nejběžnějším APP mutacím patří tzv. Londýnská mutace. Jedná se o bodovou mutaci, kdy je valin nahrazen izoleucinem v poloze 717. [56] V přítomnosti mutace je tvořeno zvýšené množství amyloidního β peptidu. Jestliže pak dojde k uvolnění těchto proteinových fragmentů z buňky, hromadí se v mozku, kde tvoří shluky, tzv. amyloidové plaky. Právě tyto amyloidové plaky se ve zvýšené míře nachází u osob s ACH. Nahromadění toxických $A\beta$ fragmentů a následně amyloidových plaků vede ke smrti neuronů a k příznakům ACH. [25]

Další mutace APP genu je mutace „holandská“ (E693Q), díky které se ukládá $A\beta$ peptid do stěny mozkových cév a přináší vysoké riziko mozkového krvácení. Tato mutace byla popsána ve třech dánských rodinách a jedné rodině v Austrálii. [56] Všechny mutace APP genu byly objeveny v místech APP genu, kde působí β - a γ -sekretáza nebo v jejich blízkosti. [22]

1.6.2 Presenilin 1

Gen pro presenilin 1 (PSEN1) se nachází na chromozomu 14 v oblasti 14q24.3. [26]



Obr. č. 6: Lokalizace PSEN 1 na chromozomu 14. Převzato ze zdroje [26].

Gen PSEN1 je složen z 13 exonů, exony 3-12 kódují protein o velikosti 467 aminokyselin.[24] Jedná se o protein s 6 – 8 transmembránovými úseky vyskytující se v různých typech buněk v mozku i mimo něj, v jejich intracelulárních membránách,

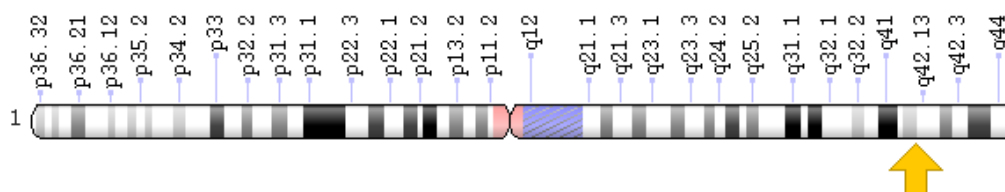
v endoplazmatickém retikulu, Golgiho aparátu a v dalších cytoplazmatických vezikulách. [37] [57]

Mutace PSEN 1 genu se vyznačují autozomálně dominantní dědičností. Dosud bylo popsáno 185 patologických mutací, 8 mutací s nejasným významem a 4 benigní mutace ve 411 rodinách s ACH. [54] Tento gen kóduje protein presenilin 1, důležitý pro štěpení derivátů β APP proteinu enzymem γ sekretázou, ovšem jeho přesná funkce není doposud známá. Některé studie tvrdí, že PSEN 1 může být sám γ -sekretázou. [37]

Mutace v genu PSEN1 se vyskytují asi v 50% případů FAD, většinou se jedná o jednonukleotidové substituce, v menší míře o malé delece či inserce.[37] Spolu s mutacemi v APP a PSEN2 genech vysvětlují 5-10% výskytu FAD. První příznaky ACH u lidí nesoucích tuto mutaci se mohou objevit již od 25. roku věku. [58]

1.6.3 Presenilin 2

Gen pro presenilin 2 (PSEN2) se nachází na chromozomu 1 v oblasti 1q42.13. [28]



Obr. č. 7: Lokalizace PSEN 2 na chromozomu 1. Převzato ze zdroje [28].

Tento gen je vysoce homologní s genem pro PSEN 1, přičemž jejich sekvenční shoda představuje 67%. [22][58] Gen je složen z 12 exonů, z nichž 10 kóduje peptid o velikosti 448 aminokyselin.[34] Dosud bylo v genu PSEN2 popsáno 13 patologických mutací, 7 mutací nejasného významu a 5 benigních mutací v 34 rodinách.[54] Funkce proteinu kódovaného genem PSEN2 je spojována s enzymatickou aktivitou γ - sekretázového komplexu stejně jako funkce proteinu PSEN1.[22] Dědičnost mutací je opět autozomálně dominantní s inkompletní penetrancí.[8] V případě mutací v genu

PSEN2 se ACH projevuje později a věk nástupu onemocnění ACH pohybuje od 40 do 85 let. [37]

Presenilin 2 napomáhá proteinům, které přenáší chemické signály z buněčné membrány do jádra. Poté, co je signál přenesen do jádra, aktivuje gen, který je důležitý pro růst buněk. [28]

Mutace v genu PSEN2 jsou spíše vzácné a vyskytují se u < 1% pacientů s FAD. Dvě z nejčastějších mutací PSEN 2, které způsobují vznik familiární FAD, byly objeveny v německých rodinách žijících v Rusku (N141I) a francouzských rodinách (M239V). V prvním případě se jedná o substituční mutaci N141I, kdy je nahrazena aminokyselina asparagin aminokyselinou isoleucinem na pozici 141. Druhou popisovanou mutací je opět substituční mutace, jejíž příčinou je záměna aminokyseliny methioninu za valin v pozici 239 (M239V). Obě tyto mutace narušují aktivitu γ -sekretázového komplexu a zpracování APP proteinu. Výsledkem je zvýšená produkce dlouhých fragmentů β amyloidu, které se hromadí v mozku a vedou ke vzniku amyloidních plaků charakteristických pro ACH. [28]

1.7 Geny související s rozvojem pozdní formy Alzheimerovy choroby

Tato forma ACH je mnohem častější než FAD, avšak příčiny jejích vzniku nejsou doposud zcela objasněny.[38] Pravděpodobně se jedná o multifaktoriální onemocnění ovlivněné přítomností individuálních rizikových faktorů, jako jsou genetické faktory a životní styl jedince, environmentální faktory (např. trauma), klinické faktory (výskyt ACH v souvislosti s jinými komorbiditami) a sociodemografické faktory (např. vzdělání, inteligence).[33] Již zmíněné deterministické geny (APP, PSEN 1 a PSEN 2) spolu s ApoE vysvětlují přibližně 30 % genetického rozptylu Alzheimerovy choroby. Zbýlých 70 % případů zatím nebylo objasněno. [5]

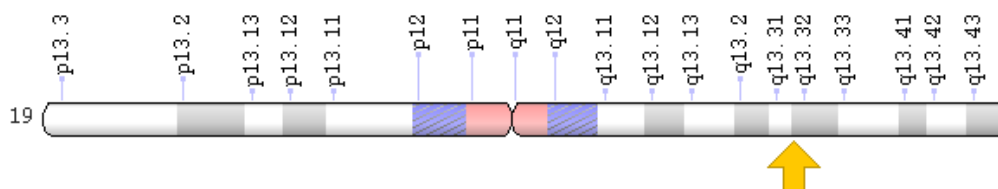
V rámci rozsáhlé studie GWAS (whole genome association study) a mezinárodního projektu zaměřeného na genomiku ACH bylo identifikováno nejméně 20 genových rizikových lokusů, ovšem žádný z nich nemá takový význam jako gen pro ApoE.

Většina těchto rizikových genů je nějakým způsobem zapojena do metabolismu β amyloidů a patologie spojené s přítomností τ proteinu. Asociované geny jsou vždy součástí tří metabolických cest souvisejících s cholesterolovým a lipidovým metabolismem, se zánětlivou a imunitní odpovědí a cyklizací endozomálních vezikul.[58]

Dosud byl popsán jediný rizikový lokus ležící na chromozomu 19, jehož součástí je gen pro apolipoprotein E (ApoE), vykazující významnou asociaci s ACH.[27] Tento fakt byl podpořen více studiemi, které přikládají polymorfismu genu ApoE důležitý význam pro vznik pozdní formy ACH. Díky těmto studiím mohou být genetické testy společně s dalšími diagnostickými metodami užitečné pro včasnou diagnózu ACH, její predikaci a možnou léčbu. [22]

1.7.1 ApoE – Apolipoprotein E

Apolipoprotein E (ApoE) je lokalizován na dlouhém rameni chromosomu 19 v oblasti 19q13.32. [29]



Obr. č. 8: Lokalizace ApoE na chromozomu 19. Převzato ze zdroje [29].

Apolipoproteiny představují informační molekuly zajišťující vazbu lipoproteinu na specifická vazebná místa. V případě ApoE se lipoproteiny vážou na specifické receptory především v játrech (zde bylo nalezeno největší množství mRNA pro ApoE), ale jejich výskyt byl prokázán také v mozkové tkáni. Zde je ApoE mRNA syntetizována především astrocyty a mikroglie. [32] Mezi hlavní funkce ApoE patří transport cholesterolu v mozku, který pak reguluje ukládání amyloidu. [2]

Z genetického hlediska rozlišujeme 3 izoformy nebo alelové formy ApoE genu: $\epsilon 2$ (ApoE2), $\epsilon 3$ (ApoE3) a $\epsilon 4$ (ApoE4). [2] Každá z těchto izoform se na metabolismu cholesterolu podílí jiným způsobem. Jednotlivé izoformy se liší v důsledku dvou substitučních mutací. Jedná se vždy o záměnu argininu (Arg) za cystein (Cys) v pozici 112 a 158 aminokyselinového řetězce. [5] Isoforma ApoE2 je determinována kombinací Cys/Cys, ApoE3 pak kombinací Cys/Arg a izoforma ApoE4 kombinací Arg/Arg.[22] Každý jedinec nese vždy 2 kopie ApoE genu, variantní alely jsou tedy děděny v homozygotním nebo heterozygotním stavu. Jedná se vždy o jednu z těchto šesti možných alelových kombinací: $\epsilon 2 / \epsilon 2$, $\epsilon 2 / \epsilon 3$, $\epsilon 3 / \epsilon 3$, $\epsilon 2 / \epsilon 4$, $\epsilon 3 / \epsilon 4$, $\epsilon 4 / \epsilon 4$, kdy mohou vzniknout 3 různé homozygoti ApoE2/E2, ApoE3/E3, ApoE4/E4 nebo tři různé heterozygoti ApoE2/E4, ApoE2/E3, ApoE3/E4.[27]

Nejčastější genotyp je ApoE3/3. Lidé s alelou ApoE4 mají genetickou predispozici pro vznik ACH v mladším věku. Opakem je alela ApoE2, která má spíše protektivní charakter a nezvyšuje riziko vzniku ACH. U ApoE 4 je také velmi důležité, jestli jde o heterozygotní či homozygotní formu. U lidí s heterozygotní formou ApoE 4 je riziko vzniku až 3x vyšší, zatímco u homozygotů se stejnou alelou je riziko vzniku až 8x vyšší. [22] Protein ApoE je součástí gliových elementů, které pak tvoří komplexy s fosfolipidy a cholesterolem. Tyto komplexy pak transportuje do neuronů díky vazebným místům pro LDL. Poté dochází k rozštěpení komplexu. Fosfolipidy a cholesterol se vstřebávají a ApoE se uvolní. V přítomnosti izoformy ApoE4, která odolává tomuto štěpení, dochází k uvolňování nedostatečného množství fosfolipidů pro neurony, které jsou nutné jak pro stavbu jejich membrány, tak pro tvorbu acetylcholinu. Další možností, nad kterou vědci uvažují, je interference ApoE4 s $\alpha 2$ – makroglobulinem, který má čistící funkci a odstraňuje tak vzniklá depozita β -amyloidu. [2]

Význam genu ApoE jako hlavního rizikového genetického faktoru pro ACH byl ověřen čtyřmi nezávislými přístupy: vazebnou analýzou v rodinách s více případy ACH a pozdním nástupem, zvýšeným výskytem ApoE4 u pacientů s ACH ve srovnání s kontrolami, dále ověřením faktu, že ApoE je součástí amyloidových plaků u pacientů s ACH a váže se na neurotoxický β amyloidový peptid.[37] Vědci zatím nezjistili, zda ApoE 4 souvisí přímo se vznikem ACH. Zatím je známo spojení této izoformy se

zvýšeným počtem proteinových shluků tvořících amyloidní plaky v mozkové tkáni nemocných. Nahromadění proteinových shluků a amyloidových plaků může vést až ke smrti neuronů, a tedy ke známkám a příčinám ACH. Právě proto lidé s alelou $\epsilon 4$ zdědí zvýšené riziko vzniku ACH, ale nezdědí nemoc samotnou. Ne u všech nositelů ApoE4 se nemoc vyvine. [29] Přítomnost ApoE4 je dále spojována se zvýšeným rizikem pro kardiovaskulární onemocnění, aterosklerózu, onemocnění periferních cév nebo diabetes typu 2.[31]

Existují studie provedené na monozygotních a dizygotních dvojčatech, které podpořily význam ApoE pro rozvoj ACH s pozdním začátkem. Této studii se zúčastnilo více jak 20 000 jedno a dvojvaječných dvojčat starších 60 let. U 12 tisíc dvojčat bylo provedeno kompletní vyšetření zabývající se ACH s pozdním začátkem. Zjistilo se, že genetické faktory se podílí ze 79 % na vzniku ACH, přičemž pohlaví dvojčat nehrálo žádnou důležitou roli. U jedinců ve věku od 65 do 69 let se pohybovalo riziko vzniku ACH okolo 1,4 %, u osob starších 90 let bylo riziko vzniku až 30%. Zajímavé je, že u jednovaječných dvojčat byla shodně diagnostikována ACH u 59 %. U stejného pohlaví dvojvaječných dvojčat byla ACH prokázána u 32 % případů a u dvojčat nestejného pohlaví se jednalo pouze o 24 % případů. [22]

Studie u bělošské a afroamerické populace přinesly zajímavý objev. Celkem bylo vyšetřeno 6158 osob, u kterých se zjistilo, že alela ApoE4 je riziková pro vznik ACH spíše u bělošské populace.[30]

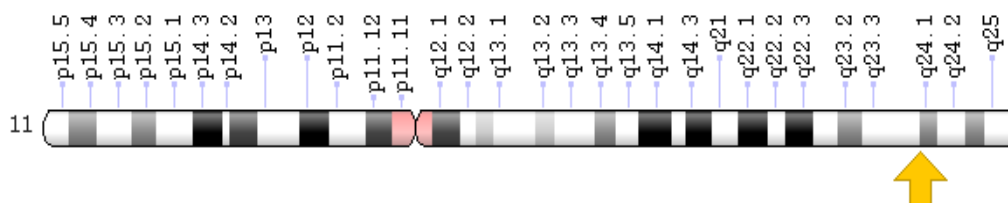
1.7.2 A2M – alfa-2-makroglobulin

A2M gen je lokalizován na 12. chromozomu v oblasti 12p13.31. [39] Tento gen určuje expresi $\alpha 2$ - makroglobulinu (A2M) proteinu, který je ligandem receptoru pro nízkodenzitní lipoproteiny, stejně tak jako je ApoE. [22] Jeho funkcí je odstraňování vzniklého β -amyloidu. Možné polymorfní varianty jsou z hlediska jeho funkce stále studovány [22] Na 12. chromozomu se nachází také LRP1 gen. Bohužel zde nebyly zjištěny žádné významné změny související s dlouhodobou pamětí. Tento gen je

odpovědný za expresi proteinu vztahujícího se ke skupině receptorů pro nízkodenzitní lipoproteiny. Tento receptor umožňuje zčásti odstranit β -amyloidní peptidy přes hematoencefalickou bariéru pomocí ApoE. Zatím ale nebylo prokázáno, že by polymorfismus tohoto genu vedl k rozvoji ACH s pozdním nástupem. [22]

1.7.3 SORL1

Gen SORL1 se vyskytuje na 11 chromozomu v oblasti 11q23.2-q24.2. [40]



Obr. č. 9: Lokalizace SORL1 na chromozomu 11. Převzato ze zdroje [40].

Tento gen byl identifikován jako rizikový faktor ACH s pozdním výskytem. Jednonukleotidová substituce v genu SORL1 ovlivní jeho expresi a následně i aktivity APP proteinu, což může mít za následek příčinu vzniku ACH. [22]

1.7.4 IDE gen

Gen IDE se nachází se na 10. chromozomu v oblasti 10q23-q25. IDE gen je složen z 24 exonů, které kódují inzulin degradující enzym (IDE). Jeho funkcí je štěpení peptidů například inzulinu, ale také $A\beta$ peptidu. Proto zvýšená hladina $A\beta_{42}$ v hyperinzulinemii způsobuje „soutěž“ mezi peptidy o stejné enzymy.

V závěru tedy můžeme říci, že hyperinzulinémie u osob s cukrovkou 2. typu, ale také u osob s nadváhou, představuje velké riziko pro vznik ACH s pozdním začátkem

v tomto případě bez přítomnosti alely $\epsilon 4$. Ostatní geny vyskytující se v blízkosti tohoto genu, mohou představovat riziko pro vznik ACH v přítomnosti alely $\epsilon 4$. [22]

1.7.5 Gen pro angiotenzinkonvertázu

Gen pro angiotenzinkonvertázu (ACE) je lokalizován na chromozomu 17q23. Tento gen se vyskytuje ve třech variantních genotypech – DD, II, ID, kde I označuje inzerční polymorfismus a D deleční polymorfismus. Angiotenzinkonvertáza je důležitý enzym v renin-angiotenzinovém systému. Genotypy vedoucí k vyššímu riziku ACH, jsou II a ID. Genotyp ID představuje 1.67x vyšší riziko a genotyp II pak 2.22x vyšší riziko. Genotyp DD má spíše neuroprotektivní charakter. [13]

2 Cíl práce

Cílem mé bakalářské práce bylo:

- Napsat odbornou rešerši na dané téma.
- Praktické zvládnutí laboratorních metod – izolace DNA z periferní krve, izolace DNA z bukalního stěru, PCR, detekce mutací genu ApoE pomocí reverzní hybridizace na stripech (komerční kit).
- Optimalizace další molekulárně genetické metody pro detekci mutací v genu ApoE.
- Vyhodnocení a diskuze získaných výsledků.

3 Metodika

3.1 Charakteristika souboru

Laboratorní část bakalářské práce byla vykonána v Českých Budějovicích, na ambulantní klinice, Matice školské 1786/17 v genetické laboratoři GENLABS pod vedením Mgr. Dagmar Bystřické, Ph.D. Veškerá vyšetření byla prováděna pod odborným dohledem kvalifikovaného pracovníka.

3.2 Principy laboratorních metod

Před každou PCR reakcí byla provedena izolace DNA. DNA byla izolována z periferní krve nebo z bukalního stěru. Periferní krev odebírá kvalifikovaný pracovník, na rozdíl od vzorku z bukalního stěru. Vzorek bukalního stěru si může každý klient odebrat sám, přičemž dodržuje tyto pokyny: (nejméně 60 minut před odběrem nejíst, jedním odběrovým tampónem otírat sliznice obou tváří přibližně po dobu 1 minuty, maximálně do 48 hodin doručit vzorek do laboratoře). Je důležité, aby na tamponu zůstalo co nejvíce epitelových buněk. Poté, co vzorek přijme laboratoř, musí být uchován v ledničce při teplotě cca 4°C. Součástí každého přijatého vzorku musí být řádně vyplněná žádanka a informovaný souhlas s genetickým laboratorním vyšetřením s potřebnými informacemi jak o pacientovi, tak o požadovaném vyšetření. Po přijetí je vždy žádanka zkontrolována a každému vzorku je přiřazeno identifikační číslo.

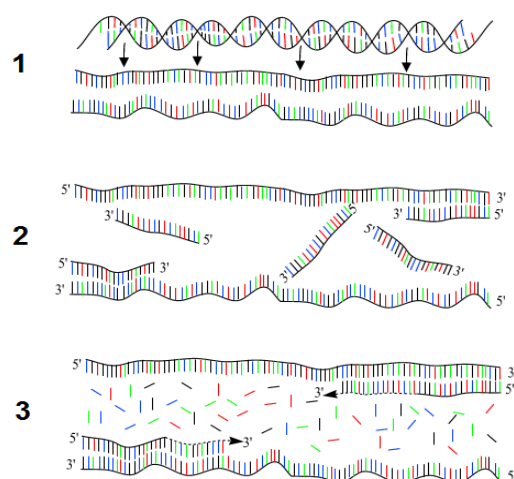
3.2.1 PCR – polymerázová řetězová reakce

PCR umožňuje enzymatickou amplifikaci DNA in vitro syntézou vybrané sekvence DNA v cyklické reakci, kdy se mění 3 teploty za použití termostabilní DNA

polymerázy. [47] Daný úsek, který chceme namnožit, nebo-li amplifikovat, musí být vždy ohraničen, jak na začátku, tak na konci vybrané části genomu pomocí krátkých oligonukleotidových sekvencí tzv. primerů. Jedná se o chemicky syntetizované oligonukleotidy. [45] Tyto primery se vždy připojí ke komplementárním úsekům DNA a řídí syntézu nových vláken ve směru 5'→3'. [47] Výsledkem PCR jsou až miliony exaktních kopií vzorového fragmentu DNA o délce až 10 tisíc nukleotidů. Každá reakční směs se skládá z templátové DNA, primerů, ze směsi nukleotidů dNTP, reakčního pufru a termostabilního enzymu DNA polymerázy. Nejvíce se používá tzv. *Taq* polymeráza získaná z bakterie *Thermus aquaticus*. Zmiňované dNTP, DNA polymeráza a reakční pufr jsou většinou součástí komerčně dodávaného master mixu. [46]

Celá tato reakce probíhala v tzv. termocykleru, který umožňuje během několika sekund zvýšit nebo snížit teplotu o několik desítek °C. Každý tento teplotní cyklus má 3 fáze a trvá přibližně 0.5 - 5 minut.

1. Denaturace – dochází k separaci řetězců DNA, díky vysoké teplotě 94 - 98°C za vzniku jednovláknových DNA molekul.
2. Annealing – nasednutí primerů na specifická místa DNA díky snížené teplotě na 50 - 65°C.
3. Extension – syntéza DNA, dochází k přírůstu vlákna komplementární DNA k původní molekule DNA ve směru od 5' konce k 3' konci. Obvykle se tyto kroky opakují ve 30 cyklech. [45] [46]



Obr. č. 10: Ukázka průběhu PCR, 1 - denatuarace, 2 - annealing, 3 – extension.

Převzato ze zdroje [46].

3.2.2 Multiplex PCR

Multiplexní reakce patří k výkonným metodám PCR. Tato metoda umožňuje testovat více delecí a bodových mutací v jedné amplifikační reakci. To vše je následováno jedním elektroforetickým dělením v agaróze a obvykle je určena k detekci značením ethidiumbromidem [47] či jiným interkalačním barvivem (např. GelRed, MidoriGreen apod.). Pro každý jednotlivý lokus jsou navrženy dva párové primery stejně jako u klasické PCR, avšak narušil od klasické PCR, musí mít jednotlivé primerové páry stejnou či velice podobnou teplotu annealingu. V elektroforéze musí být pak snadně odlišitelné velikosti amplifikačních produktů z jednotlivých lokusů. [62] Metoda je náročná ve fázi přípravy, kdy je důležité detailní a promyšlené návrhu primerů, a poté sestavování návrhu postupného přidávání jednotlivých dvojic k již vytvořené struktuře. [62] Ke každé reakci je důležité provést pozitivní i negativní kontrolu. [47]

3.2.3 Gelová elektroforéza

Velikosti PCR produktů byly zkontrolovány pomocí gelové elektroforézy. Tyto fragmenty mají různou pohyblivost v agarózovém gelu (větší fragmenty se pohybují pomaleji, menší rychleji). Tento pohyb fragmentů zajišťuje působení stejnosměrného elektrického pole. DNA je nabitá záporně, proto se pohybuje vždy ke kladnému konci (anodě).

3.2.4 Reverzní hybridizace na stripech

Reverzní hybridizace slouží k detekci bodových mutací a jednonukleotidových polymorfismů. Při této metodě dochází k hybridizaci jednovláknových nukleových kyselin na základě jejich sekvenční komplementarity, přičemž jedno vlákno představuje testovaná DNA, získaná během PCR a druhé vlákno pak referenční úsek DNA se známou sekvenční specificitou imobilizovaný na pevném nosiči. Postup reverzní hybridizace se skládá ze tří kroků: izolace DNA, amplifikace testované DNA a vlastní hybridizace.

Pro vizualizaci hybridizace se používá několik přístupů. Dříve bylo využíváno radioaktivního značení testované DNA. Toto značení bylo postupně nahrazeno fluorescenčním či enzymatickým značením (např. systém streptavidin-biotin s křenovou peroxidázou či alkalickou fosfatázou). Na základě fluorescenční či enzymatické aktivity dochází ke zviditelnění hybridizace komplementárních genomových sekvencí.

3.3 Postupy genetického vyšetření

3.3.1 Izolace DNA

Před každým molekulárně – genetickým vyšetření (při kterém je analyzována DNA), se musí provést izolace DNA, která je nejčastěji izolována z lymfocytů periferní krve nebo z epitelových buněk získaných pomocí bukalního stěru.

a) Periferní krev

K izolaci DNA z periferní krve byl použit Genomic DNA Mini Kit dle doporučení výrobce.

Reagencie

- 96% ethanol
- GT Buffer
- W1 Buffer
- Wash Buffer
- Elution Buffer
- RBC Lysis Buffer

Spotřební materiál

- GD Column
- 2 ml collection tube
- 1,5 ml mikroskopické pipety
- Špičky a rukavice

Před začátkem izolace byl vytemperován termostat na 60°C. Pro 1 vzorek bylo nutné připravit 2 x 1,5 ml mikrozkušavky. Jedna zkumavka pro lyzační reakci a druhá pro finální eluci. Každá zkumavka byla označena laboratorním číslem vzorku.

Postup

Nejprve bylo napipetováno 300 µl plné krve do označené mikrozkušavky. Poté bylo přidáno 900 µl RBC Lysis Buffer. Následovala inkubace 10 minut při pokojové teplotě. Dále byl vzorek centrifugován 5 minut při 3 tis. ot/min. Supernatant byl opatrně odstraněn a byla ponechána peleta. Následně bylo přidáno 100 µl RBC Lysis Buffer, ve kterém byla peleta resuspendována. Dále bylo přidáno 200 µl GB Buffer, zkumavka byla zvortexována a krátce stočena. Následovala inkubace 10 – 15 minut v termostatu při 60 °C. Při této inkubaci se zkumavka každé 3 minuty promíchala převrácení v ruce. Do zkumavky bylo přidáno 200 µl 96% etanolu, následoval vortex a stočení zkumavky.

Takto připravený lyzát byl přepipetován na kolonku (GD Column), která byla umístěna do čisté sběrné zkumavky. Tato kolonka se sběrnou zkumavkou byla zcentrifugována při 14 – 16 tis. otáčkách po dobu 5 minut. Poté byla kolonka přendána do nové sběrné zkumavky a použitá sběrná zkumavka s tekutinou byla vyhozena. Na tuto kolonku bylo napipetováno 400 µl W1 Bufferu, opět proběhla centrifugace při 14 – 16 tis. otáčkách po 30s. Ze sběrné zkumavky byla vylita tekutina a kolonka byla vrácena zpět do stejné sběrné zkumavky. Na kolonku bylo přidáno 600 µl Wash Bufferu a proběhla centrifugace při 14-16tis. otáčkách po dobu 30s. Naposledy byla vylita tekutina ze sběrné zkumavky, kolonka byla vrácena do sběrné zkumavky a zcentrifugována při 14 – 16 tis. otáčkách po dobu 3 min.

Suchá kolonka a navázanou DNA byla přesunuta do připravené čisté 1,5 ml mikrozkušavky řádně označené štítkem (jméno a příjmení klienta, RČ, číslo vzorku, datum izolace, iniciály kdo izolaci provedl). Na filtr kolonky bylo napipetováno 50 µl predehřátého Elution Buffer, následovala inkubace minimálně 3 minuty při pokojové teplotě. Kolonka byla zcentrifugována při 14 – 16 tis. otáčkách po dobu 30s. Izolovaná

DNA dána do lednice pro pozdější použití (max. 24 hod) nebo do mrazicího boxu (-20°C), ve kterém je DNA archivována.

b) Izolace z bukálního stěru

K izolaci genomové DNA z bukálního stěru byl použit DNA Isohelix DNA Isolation Kit dle doporučení výrobce.

Reagencie

- Lysis buffer
- Proteinkinase K
- Capture buffer CT
- Re – hydration buffer TE

Před začátkem izolace byly pro 1 vzorek připraveny 3 1,5 ml mikrozkušavky, byla nastavena suchá lázeň na 60 °C a Proteinkinase K byla vyndána z mrazáku.

Postup

Do zkumavky s odběrovým tampónem bylo přidáno 500 µl Lysis Bufferu a poté 20 µl proteinkinase K. Krátce připravený vzorek byl zvortexován a zcentrifugován. Posléze byl inkubován hodinu při 60 °C, opět byl zvortexován a zcentrifugován. Následně byl celý objem (asi 400 µl) vzorku získaný během několika centrifugací přepipetován do nové 1,5 ml mikrozkušavky. K lyzátu bylo přidáno 500 µl Capture buffer, následoval zvortex a zkumavka byla zcentrifugována při 13tis ot/min po dobu 7 min. Supernatant byl opatrně odstraněn, aby nedošlo k narušení pelety DNA. K peletě bylo přidáno 50 µl předeřátého Re-hydration buffer TE. Takto připravený vzorek byl inkubován 5 minut při RT, opět byl krátce zvortexován a zkumavka byla zcentrifugovaná při 13 tis. ot/min po dobu 2 minut. Nakonec byl odebrán supernatant obsahující DNA do nově připravené 1,5 ml zkumavky. Takto připravená DNA byla uložena do krabičky v mrazicím boxu.

3.3.2 Měření koncentrace DNA

Koncentrace DNA byla měřena pomocí přístroje Fluorometr Qubit[®] 2.0. Naměřené hodnoty byly uváděny v jednotkách ng/μl. Výsledné koncentrace DNA izolované z periferní krve a DNA z bukalního stěru se zásadně nelišily. Ačkoli koncentrace DNA získaná z bukalního stěru byla o něco vyšší než koncentrace DNA z periferní krve. Na druhou stranu byla DNA z bukalního stěru více znečištěná možnými inhibitory PCR reakce. Důvodem znečištění mohl být způsob izolace DNA, kdy nebyla použita kolonková metoda. Konečné výsledky koncentrace DNA pro jednotlivé vzorky shrnuji v tab. č. 5.

3.3.3 Reverzní hybridizace na stripech, použití CVD StripAssay[®]

Pro reverzní hybridizaci na stripech byl použit kit CVD StripAssay[®] dle doporučení výrobce. Reverzní hybridizace na stripech se skládá několika kroků: z izolace DNA, z multiplexové PCR amplifikace využívající biotinylované primery s následnou kontrolou PCR produktů na agarózovém gelu a samotné hybridizace amplifikovaných produktů k testovacímu stripu. Na něm jsou imobilizovány oligonukleotidové próby představující paralelní linky na stripu. Specifická hybridizace biotinylovaných sekvencí získaných v rámci PCR k oligonukleotidovým próbám je pak detekována pomocí streptavidinu, alkalické fosfatázy a barevného substrátu.

Reagencie

- Amplification Mix A
- Amplification Mix B
- Taq Dilution Buffer
- DNAT
- Promývací korýtka
- Testovací stripy
- Hybridization Buffer
- Wash Solution A
- Conjugate Solution
- Wash Solution B
- Color Developer

Postup

Vodní lázeň byla vyhřáta přesně na 45 °C, vodní hladina sahala do ½ výšky promývacího korýtka. Současně byl vytemperován Hybridization Buffer a Wash Solution A na 45 °C. Ostatní reagencie (DNAT, Conjugate Solution, Wash Solution B a Color Developer) včetně testovacích proužků byly vytemperovány na pokojovou teplotu. Pro každý vzorek byl čistou pinzetou vyjmut 1 strip a na okraj tohoto stripu bylo napsáno obyčejnou tužkou číslo vzorku.

a) Amplifikace DNA

Nejprve byla naředěna pracovní koncentrace *Taq* DNA Polymerase v *Taq* Dilution Buffer odpovídající 0,2 U/μl. Například pro 5 vzorečků bylo smícháno 24 μl *Taq* Dilution Buffer + 1 μl *Taq* DNA Polymerase. Do připravených PCR zkumavek, umístěných do chladicího stojánku byly rozpipetovány PCR reakční mixy pro jednotlivé amplifikační mixy, Mix A a Mix B:

Mix A: 15 μ l Amplification Mix A + 5 μ l naředěné Taq DNA Polymerase + 5 μ l izolované DNA;

Mix B: 15 μ l Amplification Mix B + 5 μ l naředěné Taq DNA Polymerase + 5 μ l izolované DNA.

Zkumavky byly uzavřeny, krátce promíchány a stočeny a následně vloženy do cycleru. Pro amplifikaci byl spuštěn příslušný PCR protokol.

Tab. č. 1: Teplotní profil reakce.

	Krok	Čas	Teplota	Počet cyklů
1	Úvodní denaturace	2 min	94 °C	1
2	Denaturace	15 s	94 °C	35
	Anealing	30 s	58 °C	
	Extenze	30 s	72 °C	
3	Konečná extenze	3 min	72 °C	1

b) Gelová elektroforéza

Reagencie

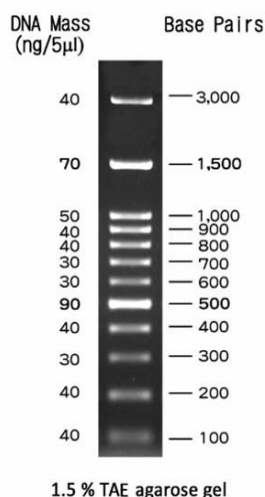
- Crystal 10 x TBE Buffer
- 10 x TBE
- Pracovní roztok 1 x TBE
- Agarózové tablety
- Mildori Green Advanced DNA Stain
- 100bp DNA LADDER H3RTU
- DNA Loading Buffer Blue

Postup

Před samotnou elektroforézou byl nejprve připraven pracovní roztok 1 x TBE. TBE pufr se mění v elektroforetické vaně 1 x za 14 dní.

Agarózové tablety byly dány do plastové kádinky (min. objem plastové kádinky činil 100 ml). Počet agarózových tablet a objem TBE pufru závisí na tom, kolik % gel má být připraven (1 tableta o 0.5 g/50 ml TBE = 1% gel). Tablety byly rozpuštěny v TBE pufru. Po několika zahříváních v mikrovlné troubě vznikl gel, ke kterému bylo přidáno 15 µl barvy Midori Green Advanced DNA Stain. Po krátkém zchladnutí byl gelový roztok nalit gel na připravenou elektroforetickou podložku a do gelu byly vloženy hřebeny. Po ztuhnutí gelu byly hřebeny odstraněny a gel byl vložen do elektroforetické vany obsahující 1 x TBE pufr. Do vybrané jamky (první nebo poslední) bylo napipetováno 5 µl markeru 100 bp DNA LADDER H3RTU (obr. č. 11). Do ostatních jamek bylo napipetováno vždy 5 µl každého PCR produktu.

Následně byla elektroforéza spuštěna nejméně na 15 minut při 100 – 135 V. Celý průběh elektroforézy bylo možné sledovat pomocí speciálního iluminátoru Mupid™ LED Illuminator a barvě Midori Green Advance DNA Stain. Po skončení elektroforézy byl gel zdokumentován pomocí detekčního systému FastGene® GelPic LED Box. Příklad gelové elektroforézy dvou vybraných vzorků je uveden v kapitole Výsledky na obr. č. 12.



Obr. č. 11: 100bp DNA LADDER H3RTU. Převzato ze zdroje [59].

c) Hybridizace

Nejprve bylo napipetováno do spodní části korýtky vždy 10 μ l DNAT. Následně bylo přidáno 10 μ l PCR produktu A a 10 μ l PCR produktu B vždy přímo do roztoku DNAT. Tento roztok byl promíchán pipetou s PCR produkty (zmodral), následovala inkubace 5 minut při pokojové teplotě. Do každého korýtky byl napipetován 1 ml Hybridization Buffer, promíchán s DNAT, poté byl do roztoku ponořen hybridizační strip označenou stranou nahoru. Následovala inkubace 30 min při 45 °C ve třepané vodní lázni. Po skončení této inkubace byl odsát hybridizační roztok, který byl nahrazen promývacím roztokem. Během výměny roztoků nesmělo dojít k vysušení stripu.

d) Promývání

Po odsátí hybridizačního pufru byl přidán 1 ml Wash Solution A, který byl následně odsát (pro opláchnutí stripu). Opět byl přidán 1 ml Wash Solution A, následovala inkubace 15 min při 45 °C ve třepané lázni. Poté byl opět odsát Wash Solution A a napipetován znovu 1 ml Wash Solution A. Celý proces (přidání, inkubace a odsátí promývacího roztoku) byl zopakován.

e) Barvení

Po odstranění Wash Solution A byl přidán 1 ml Conjugate Solution, následovala inkubace 15 min při pokojové teplotě za neustálého třepání. Po odstranění roztoku byl přidán 1 ml Wash Solution B, který byl následně odstraněn (pro opláchnutí stripu). Znovu byl přidán 1 ml Wash Solution B, následovala inkubace 5 min při pokojové teplotě na třepačce. Celý proces promývání roztokem Wash Solution B byl zopakován. Nakonec byl přidán 1 ml Color Developer, následovala inkubace 15 min při pokojové teplotě ve tmě. Po ukončení hybridizace byly stripy několikrát opláchnuty destilovanou vodou a usušeny pomocí filtračního papíru.

3.4 Optimalizace další molekulárně genetické metody

Další způsob umožňující genotypizaci ApoE genu představuje certifikovaný kit DiaPlexCTM ApoE od firmy SolGent Co., Ltd. Detekce polymorfismů je v tomto případě založena na principu real-time PCR.

Komerční kit DiaPlexQ™ ApoE dokáže analyzovat jednonukleotidové polymorfismy tzv. SNP v genu pro Apolipoprotein E pomocí multiplexové alelově specifické real-time PCR využívající sondy Taqman. V rámci reakce jsou detekovány dvě bodové mutace typu missence zodpovídající za záměnu aminokyselin na pozici 112 a 158, což vede k detekci různých ApoE alel u testovaného jedince.

DiaPlexQ™ ApoE kit je složen ze dvou 2x Multiplex Real-Time PCR Smart mixů pro ApoE 112 genotyp a ApoE 158 genotyp obsahujících DNA polymerázu, reakční pufr a nukleotidy (dNTP) a z cílových genově specifických primerů a prób. Průběžná amplifikace PCR je sledována v reálném čase a může být analyzována na základě alelově diskriminačního nasednutí příslušných primerů a prób. V každém běhu je současně analyzována také pozitivní kontrola s předem známým genotypem, důležitá pro kontrolu správného průběhu reakce a negativní kontrola nezbytná pro kontrolu možné kontaminace vzorků. Součástí kitu je také UDG (Uracil-DNA glykosyláza) systém, který minimalizuje možnost kontaminace reakcí předešlými vzorky zpracovanými v laboratoři.

Tab. č. 2: Složení reakčního mixu.

2x Multiplex Real-Time PCR Smart mix	10 µl
Primer & Probe mixture (ApoE112 nebo ApoE158)	5 µl
DNA templát	5 µl
Celkový objem reakce	20 µl

Tab. č. 3: Teplotní profil Real-Time PCR.

	Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
1	UDG aktivace	50 °C	3 min	1
2	Pre-PCR Analýza	60 °C	1 min	1
3	Iniciační aktivace PCR	95 °C	15 min	1
4	Denaturace	95 °C	15 s	40
5	Nasednutí primerů a extenze	60 °C	1 min	
6	Post-PCR analýza	60 °C	1 min	1

Tab. č. 4: Vyhodnocení reakce.

ApoE genotyp	SNP	ApoE112	ApoE158
E2/E2	TT/TT	T/T typ	T/T typ
E2/E3	TT/TC	T/T typ	T/C typ
E2/E4	TC/TC	T/C typ	T/C typ
E3/E3	TT/CC	T/T typ	C/C typ
E3/E4	TC/CC	T/C typ	C/C typ
E4/E4	CC/CC	C/C typ	C/C typ

Ačkoli výrobce deklaroval kompatibilitu tohoto kitu s přístrojem LightCycler 2.0 firmy Roche, který je jako jediný real-time přístroj součástí přístrojového vybavení laboratoře, nepodařilo novou metodu úspěšně optimalizovat ani za přítomnosti prodejce kitu. Příslušný kit je bohužel použitelný pro jiné typy real-time cyclerů.

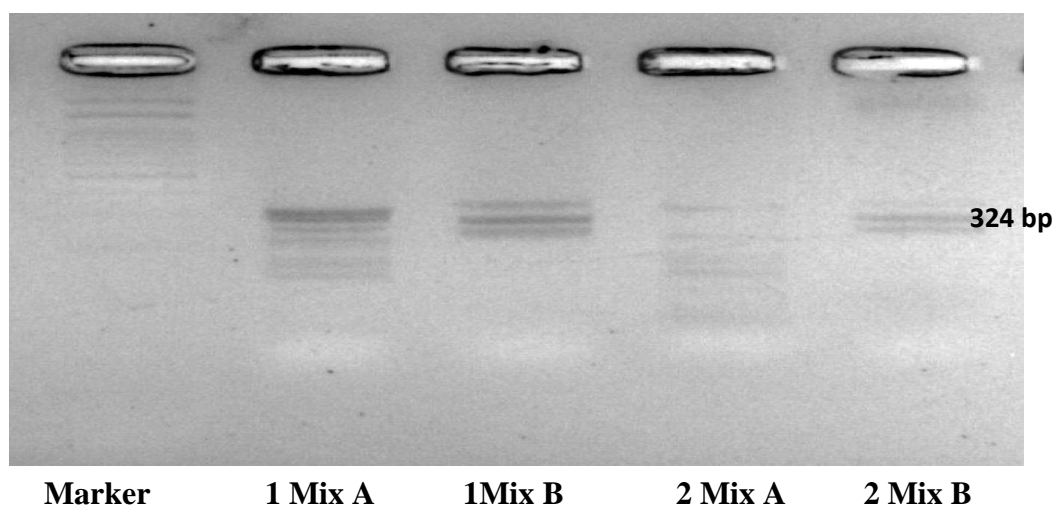
4 Výsledky

Výsledné koncentrace DNA byly naměřené na přístroji Fluorometr Qubit[®] 2.0.

Tab. č. 5: Výsledné koncentrace DNA (bukálního stěru/periferní krve).

Vzorek	BS/PK	DNA [ng/μl]
1	PK	70,2
2	PK	50,8
3	PK	22,2
4	BS	11
5	BS	42,6
6	PK	21,2
7	PK	34,6
8	PK	20,6
9	PK	34
10	BS	44
11	BS	23,6
12	BS	94,4

Výsledné produkty multiplex PCR reakcí byly detekovány pomocí gelové elektroforézy na 4% agarózovém gelu (obr. č. 12). V rámci amplifikační reakce A (Mix A) vznikly PCR produkty o velikosti: 134, 156, 173, 202, 223, 254, 297, 324 bp a v rámci amplifikační reakce B (Mix B) vznikly PCR produkty o velikosti: 225, 248, 283, 346 bp.

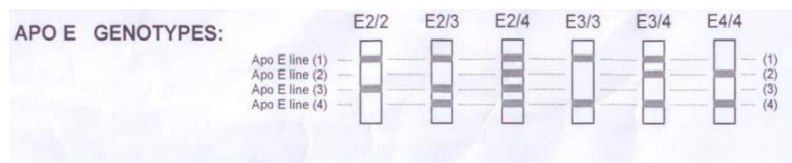


Obr. č. 12: Výsledné PCR produkty na 4% agarózovém gelu.

Samotná analýza genotypu ApoE k danému onemocnění byla provedena u 12 osob. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 6. Dané výsledky byly hodnoceny pomocí panelu pro vyhodnocení, který je zobrazen na obr č. 13. Výsledky hybridizace jsou uvedeny na obr. č. 14.

Tab. č. 6: Výsledky genotypizace ApoE.

Vzorek	Genotyp Apo E
1	E3/3
2	E3/3
3	E3/4
4	E3/4
5	E4/4
6	E3/3
7	E3/3
8	E3/3
9	E3/3
10	E3/3
11	E3/3
12	E3/3



Obr. č. 13: Panel hodnocení pro genotypizaci ApoE.



Obr. č. 14: Ukázka výsledné hybridizace pro jednotlivé vzorky.

5 Diskuze

Izoforma ApoE4 patří z hlediska genetiky k zatím jedinému prokázanému rizikovému faktoru pro vznik sporadické formy ACH. Tato varianta existuje vedle dvou dalších variant tohoto genu, jedná se o izoformy ApoE2 a ApoE3. Jedinci bez přítomnosti ApoE4 negativní, patří do skupiny s nižším rizikem vzniku tohoto onemocnění, přičemž toto riziko představuje zhruba 9% a souvisí zejména s věkem nad 65 let.

Pro vyšetření genu ApoE byl použit certifikovaný kit CVD StripAssay® Kit od firmy ViennaLab/PentaGen, který obsahuje 20 testů. Celkem bylo testováno 12 jedinců, kdy byla většina negativní pro ApoE 4, celkem 9 případů. Ani v jednom případě se nejednalo o pacienty s ACH, ale spíše o příbuzné osob trpících touto chorobou, kterým šlo o vyloučení přítomnosti tohoto rizikového faktoru v jejich genomu. Nejčastěji byli identifikováni nositelé varianty ApoE3/E3. Tato izoforma se vyskytuje v evropské populaci nejčastěji (72.2 – 77.6 %) [60] a nepředstavuje významné riziko pro vznik ACH. Nejvyšší riziko je popisováno u jedinců homozygotních pro variantu ApoE 4 (ApoE4/E4), přičemž její výskyt v populaci je odhadován na 10.6 – 14.8 %. [60] V rámci testovaných jedinců byl identifikován pouze jediný případ ApoE4/E4. Pro takového pacienta je důležité to, že je o riziku vzniku sporadické formy ACH informován, což může být klíčové pro případné včasné zahájení léčby, která umí výrazně zpomalit projevy onemocnění a tím umožňuje dlouhodobější zachování kvality života. U dvou pacientů byla nalezena izoforma ApoE4 v heterozygotním stavu, konkrétně kombinace ApoE3/E4. Tito pacienti se vyznačují zvýšenou hladinou triacylglycerolů v plazmě způsobenou nedostatečným odstraňováním lipoproteinových zbytků z oběhu. Jedná se o pacienty ohrožené hyperlipoproteinémií a dále o obézní jedince s hypertriglyceridemií. [60] Rozsáhlá meta-analýza z roku 1992 zahrnující 15 000 jedinců ze 17 různých zemí potvrdila u jedinců se fenotypem ApoE3/E4 vyšší koncentrace celkového cholesterolu a triglyceridů a nižší koncentrace HDL-cholesterolu ve srovnání s jedinci ApoE3/E3. [61]

V současnosti je známo, že alela $\epsilon 4$ je silně asociována s ACH a její přítomnost může představovat významný rizikový, ale ne absolutní rizikový faktor, pro vznik tohoto onemocnění. Lékařské komunity jsou spíše proti genetickému testování rizikových faktorů ACH [50] z toho důvodu, že pro pozitivní jedince může mít toto vyšetření fatální následky zejména z psychického hlediska. Můj názor je takový, že v dnešní době, kdy máme lékařskou vědu na vysoké úrovni, je vhodné pro pacienta genetické vyšetření podstoupit. Pokud se prokáže výskyt izoformy ApoE 4, může pacient změnit svůj styl života, vyhýbat se rizikovým faktorům, a tím také snížit riziko vzniku ACH. Velice důležitou roli hraje také schopnost lékaře interpretovat pacientovi výsledky tohoto vyšetření. Před samotným vyšetřením by měl lékař s pacientem prodiskutovat anamnézu celé rodiny a tedy genetické předpoklady pro vznik choroby. Na základě výsledků genetického vyšetření a anamnézy, by měl lékař pacientovi poskytnout poradenství, jak snížit riziko vzniku ACH. Na druhou stranu je diskutabilní co s pacienty, u kterých vyšetření neprokáže výskyt ApoE4. Tito pacienti pak mohou mít sklon k ignoraci veškerých preventivních opatření.

Nejnovější vědecké studie poukazují na vztah mezi patogeny (viry či bakterie) a vznikem ACH. Jedná se především o Herpes simplex virus (HSV 1), *Chlamydia pneumoniae* a několik druhů spirochet, které byly identifikovány ve vyšší míře v mozku starších lidí [49]. Tyto patogeny se v mozku nacházejí především ve stádiu vegetačního klidu a k jejich reaktivaci může dojít zejména vlivem přirozeného oslabení imunitního systému v důsledku stáří nebo vlivem imunosuprese či vlivem stresu. U HSV1 jde zejména o imunosuprimované pacienty, kdy je HSV1 DNA v mozku amplifikována. [19] Například virus Herpes simplex encefalitis (HSE) vyvolává poškození některých regionů CNS spojených s limbickým systémem, které následně ovlivňuje paměť, kognitivní a afektivní procesy. [17] Tyto studie jsou na samotném počátku. V případě, že se tyto poznatky potvrdí, myslím si, že by to mohl být další velký pokrok v diagnostice ACH.

Závěrem lze říci, že vyšetření genetických predispozic pro ACH s pozdním začátkem obnáší zejména analýzu genu ApoE. Neznamená to však, že u jedince s ApoE4 se onemocnění vždy rozvine. Varianta ApoE4, především v homozygotní formě,

představuje pro pacienta pouze zvýšené riziko vzniku onemocnění. Přesnější genetická vyšetření se teprve vyvíjí a uplyne ještě nějaká doba, než se stanou skutečně základním vyšetřením pro diagnostiku ACH. V současné době se Alzheimerova choroba nedá vyléčit. Proto je tedy důležité využití všech dostupných vyšetření, ať už ve smyslu kognitivních funkcí nebo genetických predispozic, umožňujících její diagnostiku. Díky znalosti dostupných farmakologických (např. kognitiva, antidepressiva, neuroleptika, anxiolitika, neuroleptika, lecitin, vitamínové doplňky) či nefarmakologických (např. stimulace mozku, trénink kognitivních funkcí, ošetrovatelská rehabilitace, zlepšení výživy a pitného režimu) přístupů pak dochází k významnému zmírnění nebo odstranění příznaků demence. Tak mohou být oddálena její těžká stádia spojená s nesoběstačností postiženého jedince, což vede k celkovému zlepšení kvality jeho života.

6 Závěr

Cílem mé bakalářské práce bylo shrnutí informací o Alzheimerově chorobě. V teoretické části jsem se zabývala nejčastějšími typy demence, z hlediska Alzheimerovy choroby její historií, neurobiologií, etiologií, diagnostikou a genetickými predispozicemi zejména geny ApoE, APP, PSEN1 a PSEN2.

V experimentální části bylo mým úkolem praktické zvládnutí izolace DNA z periferní krve a bukalního stěru, příprava PCR reakce, elektroforetická separace a detekce PCR produktů na agarózovém gelu a metoda reverzní hybridizace na stripech. K vyšetření ApoE genu byl použit certifikovaný CVD StripAssay[®] Kit od firmy ViennaLab (PentaGen).

Součástí experimentální části, byla také optimalizace jiné molekulárně genetické metody pro detekci mutací v genu ApoE. K analýze ApoE genu byl použit certifikovaný kit DiaPlexQ[™] ApoE od firmy SolGent CO., Ltd. Tato metoda byla založena na real - time PCR.

7 Literatura

1. DONĚK, E., DOŇKOVÁ, J., DONĚK, A. Počátky vědecké klasifikace demencí a Alois Alzheimer. *Česká a Slovenská psychiatrie*. 2005, 101(1).
2. FIŠAR, Z. Vybrané kapitoly z biologické psychiatrie. 2., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2009. *Psyché* (Grada). ISBN 978-80-247-2737-0.
3. RABOCH, J., PAVLOVSKÝ, P. *Psychiatrie*. Vyd. 1. Praha: Karolinum, 2012. ISBN 978-80-246-1985-9.
4. Alzheimer's Association: *Alzheimer's & Dementia* [online]. [cit. 2015-10-13]. Dostupné z: <http://www.alz.org/dementia/types-of-dementia.asp>
5. JIRÁK, R., KOUKOLÍK, F. Demence: neurobiologie, klinický obraz, terapie. 1. vyd. Praha: Galén, 2004. ISBN 80-726-2268-4.
6. KROMBHOLZ, R. Nejčastější demence a jejich léčba. *Neurologie pro praxi*. 2011, 12(3), 196–200.
7. Alzheimerova choroba – v minulosti a dnes. *Rehabilitace.info* [online]. 2013 [cit.2016-04-25]. Dostupné z: <http://www.rehabilitace.info/zdravotni/alzheimerova-choroba-v-minulosti-a-dnes/>
8. KOUKOLÍK, F., JIRÁK, R. *Alzheimerova nemoc a další demence*. Vyd. 1. Praha: Grada, 1998. ISBN 80-716-9615-3.
9. Genetics Home Reference: *Alzheimer disease* [online]. [cit. 2016-01-07]. Dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/alzheimer-disease>
10. ČESKÁ ALZHEIMEROVSKÁ SPOLEČNOST, O.P.S.: *Alzheimerova choroba - Příznaky* [online]. Česká alzheimerovská společnost [cit. 2015-10-06]. Dostupné z: <http://www.alzheimer.cz/alzheimerova-choroba/priznaky/>
11. KOLÁŘOVÁ, M. et al. Structure and pathology of tau protein in Alzheimer disease. *International Journal of Alzheimer's Disease*. 2012, 1 - 13.
12. QUI, C. et al. Risk and protective effects of the APOE gene towards Alzheimer's disease in the Kungsholmen project: variation by age and sex. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*. 2004, 75(6), 828-833.

13. POVOVÁ, J. et al. Alzheimerova choroba a její rizika pro další generace. *Hygiena*. 2013, **58**(3), 117-120.
14. MÁTL, O., HOLMEROVÁ, I., MÁTLOVÁ, M. *Zpráva o stavu demence 2014*. Praha: Česká alzheimerovská společnost, o.p.s., 2014. ISBN 978-80-86541-34-1.
15. MÁTL, O., MÁTLOVÁ, M. *Zpráva o stavu demence 2015*. Praha: Česká alzheimerovská společnost, o.p.s., 2015. ISBN 978-80-86541-45-7.
16. Cerebro corte frontal Alzheimer. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2011 [cit. 2015-11-19]. Dostupné z: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cerebro_corte_frontal_Alzheimer.jpg
17. ROOS, K.L. Encephalitis. *Handbook of Clinical Neurology*. 2014, 121, 1377-1381.
18. What Is Early Onset Familial Alzheimer Disease (eFAD)? In: *Alzforum networking for a cure* [online]. [cit. 2015-12-03]. Dostupné z: <http://www.alzforum.org/early-onset-familial-ad/overview/what-early-onset-familial-alzheimer-disease-efad>
19. Saldanha J, Sutton RN, Gannicliffe A, Farragher B, Itzhaki RF. Detection of HSV1 DNA by in situ hybridisation in human brain after immunosuppression. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1986, **49**, 613-619.
20. HORT, J. et al. Tau protein a beta amyloid v likvoru u Alzheimerovy choroby. *Česká a Slovenská neurologie a neurochirurgie*. 2007, **70/103**(1), 30-36.
21. Alzheimer's Disease Genetics. *Alzheimer's Disease Education and Referral (ADEAR) Center* [online]. 2015 [cit. 2016-02-06]. Dostupné z: <https://www.nia.nih.gov/alzheimers/publication/alzheimers-disease-genetics-fact-sheet>
22. ŠŤASTNÝ, F. Genetická podstata Alzheimerovi nemoci a možnost její predikace. *Psychiatrie*. 2008, **12**(4), 207-213.

23. Alois Alzheimer. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001 [cit. 2015-09-02]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Alois_Alzheimer
24. CRUTS, M. et al. Molecular genetic analysis of familial early-onset Alzheimer's disease linked to chromosome 14q24.3. *Human Molecular Genetics*. 1995, **4**(12), 2363-2371.
25. Amyloid beta precursor protein. *Genetics Home Reference*. [online]. 2012 [cit. 2016-03-17]. Dostupné z: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/APP>
26. Presenilin 1. *Genetics Home Reference*. [online]. 2013 [cit. 2016-03-05]. Dostupné z: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/PSEN1>
27. Genetics of dementia. In: *Alzheimer's Society* [online]. 2012 [cit. 2015-12-14]. Dostupné z: https://www.alzheimers.org.uk/site/scripts/documents_info.php?documentID=168
28. Presenilin 2. *Genetics Home Reference*. [online]. 2008 [cit. 2016-03-05]. Dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/PSEN2>
29. Apolipoprotein E. *Genetics Home Reference*. [online]. 2008 [cit. 2016-03-22]. Dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/APOE>
30. EVANS, DA. et al. Incidence of Alzheimer disease in a biracial urban community. Relation to Apolipoprotein E status. *Archives of neurology*, 2003, **60**, 185-189
31. LIU, C. C. et al. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nat Rev Neurol*. 2013, **9**(2), 106 - 118.
32. CIBIČKOVÁ, L., PALIČKA, V. Alzheimerova choroba, cholesterol a apolipoprotein E – nové souvislosti. *Klin. Biochem. Metab.* 2005, **13**(34), 127 - 130.
33. PAPASSOTIROPOULOS, A. et. al. Genetics, transcriptomics and proteomics of Alzheimer's disease. *J Clin Psychiatry*. 2006, **67**(4), 652 - 670.
34. LEVY - LAHAD, E. et al. A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1. *Science*. 1995, **269**(5226), 970 - 973.

35. MANUKYAN, A., JIRÁK, R. Vztahy mezi některými genetickými polymorfismy a klinickými rysy u Alzheimerovy choroby. *Česká a slovenská psychiatrie*. 2005, **111**(5), 236–240.
36. PREISS, M., KUČEROVÁ, H. *Neuropsychologie v neurologii*. Vyd. 1. Praha: Grada, 2006. Psyché (Grada). ISBN 80-247-0843-4.
37. NUSSBAUM, L., MCINNES, R. R., WILLARD, H. F., THOMPSON, J. a THOMPSON, M. W. *Klinická genetika*. 6. vyd. Praha: Triton, c2004. ISBN 80-725-4475-6.
38. HÖSCHL, C., LIBIGER, J., ŠVESTKA J. *Psychiatrie*. 1. vyd. Praha: Tigis, 2002. ISBN 80-900-1301-5.
39. Alpha-2-macroglobulin. *Genetics Home Reference*. [online]. [cit. 2016-02-09]. Dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/A2M>
40. SORL1. *Genetics Home Reference*. [online]. [cit. 2016-02-02]. Dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/SORL1>
41. KOUKOLÍK, F., JIRÁK, R. *Diagnostika a léčení syndromu demence*. Vyd. 1. Praha: Grada, 1999. ISBN 80-716-9716-8.
42. ČECHOVÁ, L. et al. Alzheimerova nemoc a mírná kognitivní porucha: diagnostika a léčba. *Neurologie pro praxi*. 2011, **12**(3), 175–180.
43. MLČOCHOVÁ, J. *Patogeneze Alzheimerovy choroby z hlediska molekulární biologie*. Brno, 2011. Bakalářská práce. Masarykova Univerzita, Přírodovědecká fakulta.
44. Number of people with dementia higher in Europe than previously reported. *Alzheimer Europe* [online]. 2009 [cit. 2016-01-11]. Dostupné z: <http://www.alzheimer-europe.org/News/Alzheimer-Europe/Monday-13-July-2009-Numbers-of-people-with-dementia-in-Europe-higher-than-previously-reported>

45. Polymerázová řetězová reakce. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001 [cit. 2016-04-27]. Dostupné z:
https://cs.wikipedia.org/wiki/Polymer%C3%A1zov%C3%A1_%C5%99et%C4%9Bzov%C3%A1_reakce#cite_ref-Kary_Mullis_Nobel_Lecture_4-0
46. Bártová Eva. PCR (polymerázová řetězová reakce). *Molekulární biologie*. [online].2011[cit.2016-01-01].
Dostupné z: http://mmp.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-pcr&lang=cz
47. ZIMA, Tomáš. *Laboratorní diagnostika*. 3., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén, 2013. ISBN 978-80-7492-062-2.
48. Diagnostika Alzheimerovy choroby. In: *Alzheimer centrum* [online]. [cit. 2016-02-27]. Dostupné z: <http://www.alzheimercentrum.cz/alzheimerovo-onemocneni/diagnostika-alzheimerovy-choroby/>
49. DE CHIARA, G. et al. Infectious Agents and Neurodegeneration. *Molecular Neurobiology*. 2012, **46**(3), 614–638.
50. SCOTT ROBERTS, J. et al. Genetic susceptibility testing for neurodegenerative diseases: Ethical and practice issues. *Progress in Neurobiology*. 2013, , 89 - 101.
51. BLENNOW, K. et al. Alzheimer's disease. *Lancet*. 2006, **368**(9533), 387-403.
52. ROCKENSTEIN, E.M. et al. Levels and alternative splicing of amyloid beta protein precursor (APP) transcripts in brains of APP transgenic mice and humans with Alzheimer's disease. *J Biol Chem*. 1995,**270**(47), 28257–28267.
53. JONSSON, T. et al. A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature*. 2012, **488**(7409), 96 - 99.
54. CRUTS, M., THEUNS, J., VAN BROECKHOVEN, Ch. Locus-Specific Mutation Databases for Neurodegenerative Brain Diseases. *Human Mutation*. 2012, **33**(9), 1340–1344.
55. BETTENS, K. et al. Current status on Alzheimer disease molecular genetics: from past, to present, to future. *Hum Mol Genet*. 2010, **19**(R1), R4 - R11.

56. PANEGYRES, P.K. et al. A Western Australian kindred with Dutch cerebral amyloid angiopathy. *Journal of the Neurological Sciences*. 2005, **239**(1), 75 - 80.
57. JANSSEN, J. C. et al. Alzheimer's disease due to an intronic presenilin - 1 (PSEN1 intron 4) mutation. *Brain*. 2000, , 894 - 907.
58. VAN CAUWENBERGHE, C. et al. The genetic landscape of Alzheimer disease: clinical implications and perspective. *Genetics in medicine*. 2015, , 1 - 10.
59. DNA ladder (Molecular Weight Marker). In: *Nippon Genetics Europe* [online]. Dueren - Germany [cit. 2016-02-28]. Dostupné z: <http://www.nippongenetics.eu/products/dnarna-electrophoresis/dna-ladder-molecular-weight-marker/>
60. KARÁSEK, D. et al. Eruptivní xantomatóza jako první manifestace diabetes mellitus. *Interní Medicína*. 2013, **15**(10), 314-316.
61. DALLONGEVILLE, J. et al. Modulation of plasma triglyceride levels by apoE phenotype: a meta-analysis. *Journal of Lipid Research*. 1992, **33**(4), 447-454.
62. BARTOŠ, Milan. Metodiky stanovení genových polymorfismů. In: *Základy farmakogenomiky* [online]. Brno: Farmaceutická fakulta VFU [cit. 2016-03-01]. Dostupné z: <http://farmakogenomika.cz/index.php?kapitola=9&podkapm=94>