

Súbor prác prednesených na 1. martinských neuroimunologických dňoch, ktoré usporiadala Slovenská neurologická spoločnosť SLS, Slovenská imunologická spoločnosť, Slovenská spoločnosť alergológie a klinickej imunológie SLS, Spolok lekárov v Martine, Martinská fakultná nemocnica a Jeseniova lekárska fakulta UK v Martine 24. a 25. mája 1996

NEUROIMUNOLÓGIA ALZHEIMEROVEJ CHOROBY

NOVÁK M.

NEUROIMMUNOLOGY OF THE ALZHEIMER'S DISEASE

Alzheimer's disease (AD) is the most frequent cause of premature, irreversible cognitive decline in man, the consequence of which is complete psycho-social incompetence. 60 % of all dementias are of the AD type, with its prevalence increasing logarithmically with age. Statistics from countries where average life expectancy is around 70 years show that 1 % of the total population suffers from AD. If current demographic trends do not change, 40 % of the population will be over 60 in 20 to 25 years and the number of AD sufferers will increase 5 times. AD is the fourth commonest cause of death in humans, after heart attack, cancer and stroke. We do not have any cure or efficient preventive measures against AD. The duration of the disease varies from 4–12 years and it is always fatal. Pathological characteristics of AD are neurofibrillary tangles and senile plaques. Despite the identification and molecular characterization of the pathological forms of tau and β -amyloid found in these pathological features, little is known of the etiology and pathogenesis of AD. The main goal of current research is the identification of interactions between the nervous and immune systems which may be involved in the neuropathology and pathogenesis of AD. Namely, the identification of those sequences of molecular, cellular and systemic mechanisms which lead to the fatal neuronal degeneration which ultimately results in dementia. Understanding AD pathogenesis may lead to early AD diagnostic assay and new potentials for therapy. (Tab. 1, Fig. 8, Ref. 178.)

Key words: neuroimmunology, Alzheimer's disease, dementia.

Bratisl Lek Listy 1997; 98: 303–314

Alzheimerova choroba (ACh) je najčastejšou príčinou predčasného, trvalého poškodenia až postupného zániku kognitívnych a intelektuálnych funkcií človeka, čo má za následok úplnú psychosociálnu inkompetenciu. Patrí do skupiny demencií, v rámci ktorých predstavuje 60 % a jej prevalencia sa zvyšuje logaritmicke s vekom. Štatistiky štátov, v ktorých je priemerná dĺžka života nad 70 rokov, ukazujú, že 1 % celkovej populácie je postihnuté ACh. Ak sa súčasný demografický vývoj nezmení, v priebehu 20–25 rokov bude 40 % populácie nad 60 rokov a počet postihnutých ACh sa zvýši 5-násobne. ACh je po infarkte srdcového svalu, rakovine a mozgovej príhode štvrtou najčastejšou príčinou úmrtia. V súčasnosti ľudstvo nedisponuje liekom ani žiadnym účinným preventívnym opatrením proti ACh. Dĺžka ochorenia je od 4 do 12 rokov a vždy sa končí smrťou postihnutého. Charakteristickým pre ACh je výskyt neurofibrilárnych kľbiek, senilných plakov a demencia. Napriek identifikácii a molekulovej charakterizácii patologických foriem tau-proteínov a β -amyloidu ako hlavných zložiek týchto zmien je etiológia a patogenéza ACh málo známa. Hlavným cieľom súčasného bádania je identifikácia súvislostí medzi nervovým a imunitným systémom, medzi neuropatológiou a patogenézou Alzheimerovej choroby. Konkrétne ide najmä o určenie a identifikovanie sledu tých molekulových, bunkových a systémových mechanizmov, ktoré vedú k fatálnej degenerácii neurónov a nakoniec majú za následok demenciu. Reverznú molekulovú čítanie patogenézy ACh nás privedie ku skorému diagnostickému testu pre Alzheimerovu chorobu a načrtne nové možnosti jej liečby. (Tab. 1, obr. 8, lit. 178.)

Kľúčové slová: neuroimunológia, Alzheimerova choroba, demencia.

Bratisl. lek. Listy, 98, 1997, č. 6, s. 303–314

Starnutie, demencia a Alzheimerova choroba

Človek dosahuje vrchol svojej fyziologickej výkonnosti približne vo veku 30 rokov. Každým rokom telo stráca priemerne 0,8

Neuroimunologický ústav Slovenskej akadémie vied v Bratislave
Neuroimmunological Institute, Slovak Academy of Sciences, Bratislava
Address for correspondence: M. Novák, MVD, DSc, Neuroimunologický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 842 46 Bratislava, Slovakia.
Phone: +421.7.3788 100, Fax: +421.7.37 42 76, Internet: nilunova@savba.savba.sk

% svojej energie a fyzickej výkonnosti. Príčiny tohto poklesu, starnutie nie sú známe (Hayflick, 1991). U človeka je starnutie pomalý proces a veľmi ťažko určiť spoľahlivé kritériá na objektívne meranie tohto procesu. Storočných ľudí pribúda a s tým aj poznatky o výkonnosti ich nervového a imunitného systému (Franceschi a spol., 1995). Existuje viacero teórií (imunologická, neuroendokrinná, hypotéza voľných radikálov, mitochondriová, programová teória a pod.), ktoré vysvetľujú príčiny starnutia a nepriamo aj neurodegenerácie. Jedna z nich — teória nahromaďovania od-

padových látok, sa sústreďuje najmä na nedeliace sa bunky, v ktorých je pravdepodobnosť ukladania odpadových látok vyššia ako v bunkách deliacich sa. V centrálnom nervovom systéme ide najmä o neuróny, ktoré — podľa tejto teórie — majú až 7 % svojho objemu obsadeného odpadovými látkami. Zhodou okolností ide o bunku, ktorá je nositeľom hlavných chorobných zmien pri ACh. Neuróny sa po narodení človeka už viac nedelia. Pri ich poškodení nedochádza k náhrade za nové neuróny. Zlepšením životných podmienok a najmä vďaka pokroku v medicíne sa výrazne predĺžila priemerná dĺžka ľudského života. Napriek tomuto pokroku však nedošlo súčasne i k predĺženiu absolútnej dĺžky ľudského života. Stále je to približne 100 rokov. V tomto veku mnohé funkcie, ktoré nie sú esenciálne, pre život už zanikli. Je pozoruhodné, ako to dokumentuje svojím životom aj George B. Shaw, ktorý zomrel roku 1950 vo veku 94 rokov a ešte vo veku 90 rokov napísal niekoľko divadelných hier, že práve zdravý mozog napriek vysokému veku a neobmieňaniu svojich kľúčových buniek — neurónov — je schopný plného intelektuálneho výkonu. Ako každý iný orgán môže aj mozog ochorieť, a to najmä v priebehu procesu starnutia, pri ktorom sa množstvo a kvalitatívne zastúpenie molekúl a buniek mení. Zlyhanie pamäti v pokročilom veku sa ani nie viac ako pred 30 rokmi pokladalo za niečo, čo je vo vyššom veku bežné, a preto nie je potrebné venovať tomu zvýšenú pozornosť. V súčasnosti sa pokladá progresívne zlyhanie pamäti najprv krátkodobej, neskôr dlhodobej a s tým súvisiace organické zmeny v centrálnom nervovom systéme človeka za štvrtú najčastejšiu príčinu smrti. Kde hľadať korene tohto epidemického nárastu ACh? Je veľmi pravdepodobné, že s tým súvisí priemerná dĺžka života, ktorá sa napríklad v USA za posledných 125 rokov zdvojnásobila zo 40 na 80 rokov (Hayflick, 1991).

ACh zaraďujeme medzi demencie. Jednu z prvých zmienok o demencii, ktorú chápal ako stav „chladu“ v mozgu, nachádzame v prácach veľkého Galena. Oxfordský náučný slovník uvádza termín demencia prvýkrát roku 1644. V tom istom období dr. William Salmon publikuje opis demencie, ktorý je už takmer zhodný s dnešným opisom. Vďaka svetelnému mikroskopu a vývoju histologických metódik, rozmach neuroanatómie v 19. storočí položil pevné základy vedeckému výskumu funkcií mozgu. Roku 1892 Blocq a Marinesco opisujú plaky, drobné kongofilné útvary u pacientov s epilepsiou. Podobné útvary v mozgu dvoch pacientov s demenciou roku 1898 opísal Redlich, čo sa považuje za prvú písomnú zmienku o plakoch pri demencii. V Prahe tú istú léziu opísal roku 1907 Fischer. Pomocou novej histologickej techniky — Bielschowského metódy farbenia striebrom našiel Alois Alzheimer vnútri neurónov 51-ročnej pacientky s progresívnou demenciou (ktorá zomrela za 4,5 roka) argyrofilné vlákna formujúce sa do drobných klobiek. Preto ich označil názvom neurofibrilárne klobká. Alzheimer predniesol svoj nález na 37. konferencii nemeckých psychiatrov v Tübingene roku 1906. Dnes už nevieme s určitosťou povedať, či to bola rivalita medzi Prahou a Mníchovom (obe mestá mali už vtedy svetoznáme neuropatologické laboratória), alebo skorý začiatok ochorenia, resp. kombinácia oboch, že Kraepelin (v ústave ktorého Alzheimer pracoval ako jeho zástupca) označil v 8. vydaní svojej knihy toto ochorenie ako Alzheimerova choroba a oddelil ju od senilných demencií.

Prvé vydanie knihy *Demencia* z roku 1994 uvádza 48 rôznych ochorení ako možných príčin demencie (Burns a Levy, 1994).

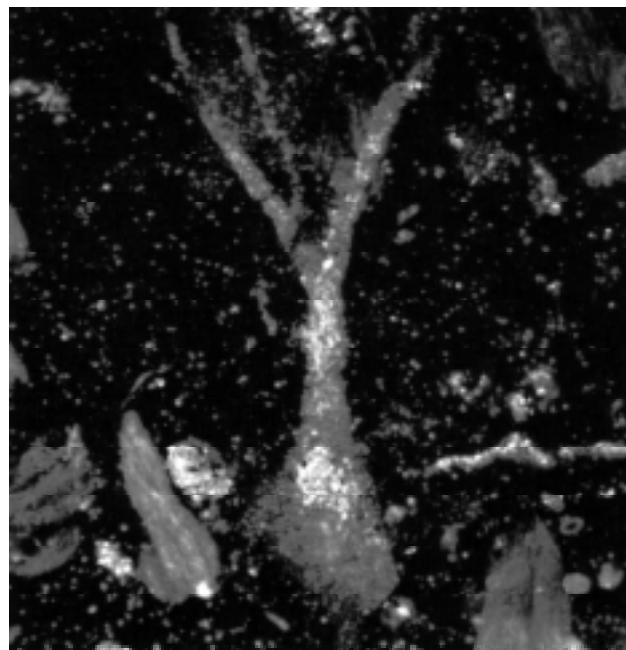
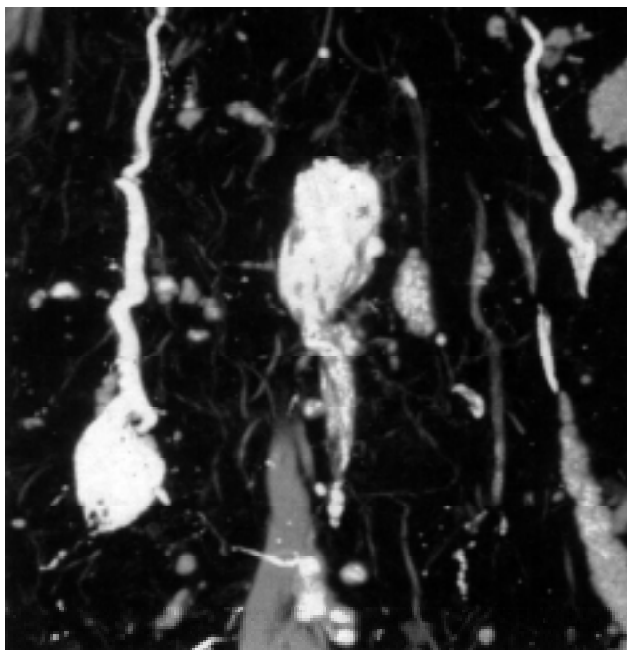
Za demenciu považuje ochorenia prejavujúce sa poruchami pamäti, schopnosti myslieť, uvažovať, orientovať sa v priestore a čase, poruchami reči a citového života. Preto ju často mnohí autori označujú aj ako paralýza ducha. Rôznorodosť demencií robí klinickú diagnózu Alzheimerovej choroby veľmi náročnou, a preto mnohí poprední pracovníci v tejto oblasti definitívnu diagnózu vyslovia až po komplexnom zhodnotení klinických a patologických nálezov. Ešte stále však nemáme také kritériá, ktoré by boli prijateľné bez výhrad celou vedeckou a medicínskou komunitou, ako potvrdil aj medzinárodný kongres o Alzheimerovej chorobe v Minneapolis v USA (1994) a v Osake v Japonsku (1996).

Mechanizmy degenerácie neurónov pri Alzheimerovej chorobe

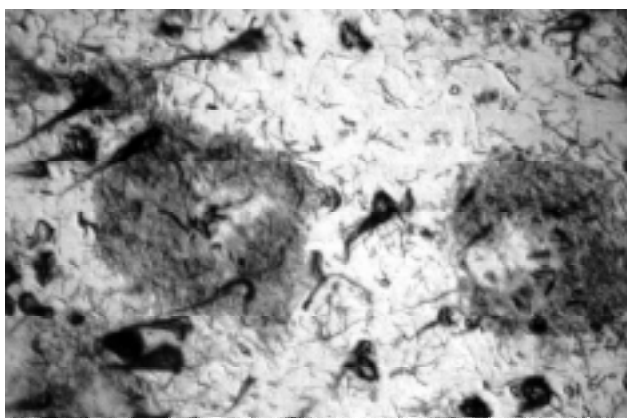
Alzheimerovu chorobu charakterizujú neuritické plaky, neurofibrilárne klobká, amyloidové (senilné) plaky a demencia (Alzheimer, 1907). Pokles intelektuálnych schopností človeka pri Alzheimerovej chorobe súvisí s hromadením sa nerozpustného vláknitého materiálu v mozgovom tkanive, a to tak vnútri buniek, ako aj v ich okolí.

Vnútri buniek sa hromadenie nerozpustného materiálu prejavuje formou vláknitých klobiek (obr. 1 a, b), ktoré Alzheimer vo svojej práci označil ako neurofibrilárne klobká (Alzheimer, 1907). Nachádzajú sa vnútri niektorých skupín neurónov v mozgovej kôre a v niektorých ďalších častiach mozgu, najmä hipokampe. Neurofibrilárne klobká sú súčasťou tzv. neurofibrilárneho komplexu pri Alzheimerovej chorobe (Bondareff a spol., 1990), ktorý zo všetkých morfológických zmien je z diagnostického hľadiska najvýznamnejší, pretože poskytuje najlepšiu koreláciu so stupňom kognitívneho zlyhania (Blessed a spol., 1968). Biochemické testy na kvantitatívne meranie týchto zmien, zostavené na báze monoklonových protilátok (Novák a spol., 1989, 1991), ukázali až 40-násobné zvýšenie neurofibrilárnych zmien v porovnaní s kontrolami. Najviac postihnutými boli oblasti mozgu v tomto poradí: temporálny, entorhinálny, parietálny, frontálny kortex a hipokampus (Harrington a spol., 1991; Mukaetova-Ladinska a spol., 1992, 1993).

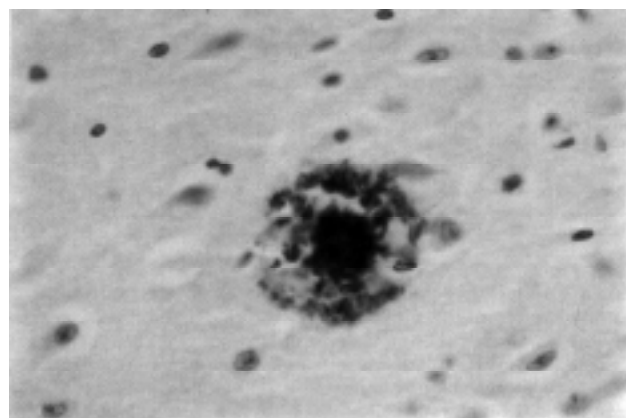
Neurofibrilárny komplex pozostáva z neurofibrilárnych klobiek, z dystrofických nervových výbežkov a z neuritickej zložky plakov (obr. 2). Spoločným menovateľom všetkých troch zložiek je, že elektrónovomikroskopicky pozostávajú z jednej a tej istej morfológickej jednotky, Alzheimerovho párového špirálového vlákna. Svoj názov dostali podľa vzhľadu v elektrónovom mikroskope od svojho objaviteľa M. Kidda roku 1963. Zistenie, že morfológickou jednotkou neurofibrilárnych zmien pri Alzheimerovej chorobe sú párové špirálové vlákna (Wischik a spol., 1988; Novák a spol., 1993), otvorilo cestu pre nový progresívny prístup k výskumu ACh. Najprv bolo potrebné objaviť postup, ako tieto vlákna izolovať z mozgu v relatívne čistej forme. Problémom bolo, že vlákna neboli rozpustné a nebolo ich možné analyzovať pomocou polyakrylamidovej elektroforézy. Okrem toho táto pre organizmus úplne nová štruktúra *Alzheimerových špirálových vlákien (AV)* im zabezpečuje odolnosť voči degradácii. To, že od svojho vzniku prežívajú párové špirálové vlákna svojho „hostiteľa“, poukazuje na to, že ľudský organizmus nemá žiadnu proteázu, enzým, ktorý by ich bol schopný štiepiť. Navyše ani vyskúšanie dostupných enzýmov z rastlín, o ktorých bolo známe, že štiepia bielkoviny, ne-



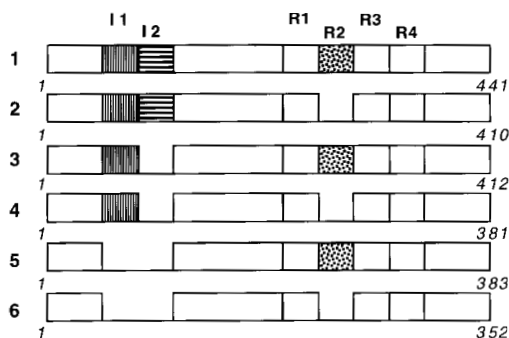
Obr. 1. Alzheimerove neurofibrilárne kľbká (ANFK) v mozgovom tkanive človeka postihnutého Alzheimerovou chorobou. Preparát je farbený špecifickou štruktúrnou sondou označujúcou výlučne krátke patologické formy tau-proteínov zmontovaných do párových špirálových vlákien (Novák a spol., 1989). Dosiaľ nepoznáme proteázu, ktorá by bola schopná štiepiť ANFK. Skutočnosť, že tieto kľbká prežívajú v mozgovom tkanive človeka bez toho, že by došlo k ich degradácii poukazuje na to, že ani ľudský organizmus nedisponuje proteolytickým degradačným mechanizmom schopným odstrániť ich. Fig. 1. Alzheimer's neurofibrillary tangles (NFT) in the brain tissue of a patient suffering from Alzheimer's disease. The section is stained with a specific structural probe specifically showing short pathological forms of tau-proteins assembled into paired helical filaments (Novak et al.1989). No protease capable of digesting PHF is known. The fact that NFT survive their hosts suggests that human brains do not contain such a protease.



Obr. 2. Histologický rez mozgovým tkanivom pacienta postihnutého Alzheimerovou chorobou ukazujúci v jednom zornom poli všetky typické znaky tzv. neurofibrilárnej patológie Alzheimerovej choroby. Neuritickú zložku senilného plaku, neurofibrilárne kľbká, a početné dystrofické neuróny a časti nervových spojení. Pretože monoklonová protilátka MN423 (Novák a spol., 1989) použitá na vizualizáciu zmien rozpoznáva špecificky práve krátke patologické formy tau-proteínu, možno vidieť ich dominantnú účasť na patologickomorfologických zmenách pri Alzheimerovej chorobe. Fig. 2. Histological section from the brain tissue of a patient suffering from Alzheimer's disease showing all the hallmarks of neurofibrillary pathology: neuritic components of senile plaques, neurofibrillary tangles, dystrophic neurites and synapses. The antibody used for this section staining is specific for truncated forms of tau-proteins and shows that tau truncation is present in most of the pathological features of Alzheimer's disease.



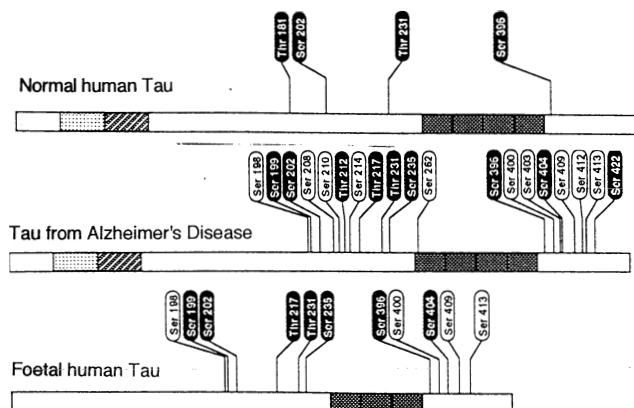
Obr. 5. Typický senilný plak v mozgovom tkanive (cortex temporalis) človeka postihnutého Alzheimerovou chorobou. Hlavnou zložkou plaku je β -amyloidový proteín, ktorý obsahuje 42 až 43 aminokyselín a vzniká vyštiepením z dlhého amyloidového prekursorového proteínu, ktorý je zakotvený v membráne buniek. β -amyloidový proteín je vizualizovaný pomocou monoklonovej protilátky MN10 (Novák, 1994), ktorá ho špecificky rozpoznáva. Fig. 5. Classical senile plaque in brain tissue (cortex temporalis) of a patient suffering from Alzheimer's disease. The main constituent of the plaque is β -amyloid protein, 42—43 aminoacids long, produced by cleavage from a larger transmembrane precursor, bAPP. β -amyloid is stained with the monoclonal antibody MN19 (Novak, 1994)..



Obr. 3. Izoformy tau-proteínu. Je ich 6 a vznikajú z jedného génu. Zastávajú dôležitú úlohu v informatike mozgu a v stabilizácii jeho štruktúr. Ich premena na patologické krátke formy má za následok nezvratnú degeneráciu neurónov vrátane ich apoptózy pri ACh.

Fig. 3. Tau protein isoforms. Six isoforms of the tau-protein are derived from a single gene by alternative splicing. They play important structural and signalling roles in the brain. Changes of full length tau to short pathological forms leads to irreversible neurodegeneration in AD.

PHOSPHORYLATION SITES OF TAU PROTEIN



Obr. 4. Fosforylačné miesta tau-proteínu. Fosforylácia proteínu tau má dôležitú regulačnú úlohu. Za fyziologických podmienok reguluje účinnosť montáže tubulínu do mikrotubulov. Pri ACh je proteín tau výrazne fosforylovaný a nie je schopný sa viazať na mikrotubuly.

Fig. 4. Tau protein phosphorylation sites. Tau phosphorylation plays an important regulatory role. Under physiological conditions it promotes the microtubule assembly. Alzheimer's disease-derived tau is not able to bind to microtubules, perhaps due to overphosphorylation.

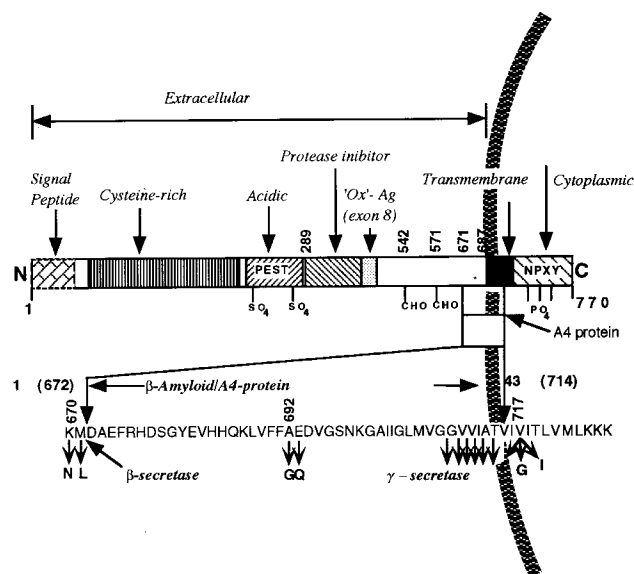
viedlo k úspechu. Bez rozpustenia Alzheimerových špirálových vlákien by nebolo možné zistiť ich primárnu štruktúru a izolovať gén, resp. gény kódujúce syntézu jednotlivých zložiek. Preto sa prijala stratégia, podľa ktorej bolo potrebné najprv pripraviť monoklonovú štruktúrnú sondy, ktorá by rozpoznala morfológicky intaktné AV, ako aj ich jednotlivé zložky v prípade úspešnej solu-

bilizácie (Wischik a spol., 1988). Sonda spĺňajúca tieto požiadavky dostala označenie MN423 (Novák a spol., 1989, 1993) a je dosiaľ jedinou štruktúrnou sondou, ktorá špecificky označuje AV. Práve pomocou tejto sondy bolo možné medzi miliómi rôznych molekúl identifikovať pravý fragment z drene AV. Jeho primárna štruktúra ukázala, že ide o nový proteín, ktorého gén ešte nebol známy (Wischik a spol., 1988). Časť jeho primárnej štruktúry s aminokyselinovou sekvenciou Gln-Ile-Val-Tyr-Lys-Pro sa podľa platného genetického kódu použila na prípravu zmiešaných oligonukleotidov s cieľom ich využitia ako špecifických sond na izoláciu príslušného génu. Prehľadka komplementárnych DNA (cDNA) knižnic z mozgových tkanív pacientov s ACh viedla k izolácii génu, ktorý niesol zápis pre syntézu proteínu tau v 6 rôznych podobách, ázh.(ibo.o3). Ti(tb i 3). Tieto izoformy vznikajú z jediného génu, ktorý sa nachádza na dlhom ramene chromozómu 17 (Neve a spol., 1986), vystrihovaním z tau mRNA. Každá izoforma má 3, resp. 4 tandemovo, t.j. za sebou v rade, usporiadané väzbové domény. Každá doména obsahuje 31–32 aminokyselinových jednotiek a má typický motív -Pro-Gly-Gly-Gly- (Goedert a spol., 1989). Všetky sú si vzájomne veľmi podobné (Novák, 1994). Práve pomocou týchto domén sa tau-proteíny viažu na mikrotubuly. V patologických, nerozpustných špirálových vláknach tieto väzbové domény vytvárajú ich dreň, ktorá je najodolnejšia proti proteázam (Novák a spol., 1993). Najhojnejší výskyt tau-proteínov je v centrálnom nervovom systéme. Predstavujú skupinu vývojovo regulovaných proteínov a sú súčasťou cytoskeletu neurónov. Viažu sa na mikrotubuly a ich hlavnou fyziologickou funkciou je stabilizácia, ako aj pomoc pri ich montáži (Novák, 1994). To, že proteín, ktorého normálnou funkciou v centrálnom nervovom systéme je stabilizovať mikrotubulovú sieť, je hlavnou zložkou AV, ktoré sú bezprostrednou príčinou deštrukcie neurónov, umožnilo začať experimentov smerujúcich k zodpovedaniu najdôležitejšej otázky: čo je príčinou premeny normálneho proteínu tau na patologický proteín? Aký je mechanizmus montáže proteínu tau do AV, ktorá mu zaručuje odolnosť proti všetkým deštručným mechanizmom, ktorými ľudský organizmus disponuje? Výsledky súčasných štúdií ukazujú, že s najväčšou pravdepodobnosťou dochádza k dvom zmenám proteínu tau. Prvou zmenou je abnormálna fosforylácia (obr. 4) proteínu tau (Mandelkow a Mandelkow, 1993) a druhou zmenou je patologická strata C-terminálneho úseku, v dôsledku čoho vznikajú tzv. krátke patologické formy (Novák a spol., 1993). Proteín tau postihnutý jednou z týchto zmien nie je schopný viazať sa na mikrotubuly, a tým ich ani stabilizovať. Navyše dochádza k zmene jeho interakcií s ďalšími proteínmi, čo môže viesť k tvorbe AV v neurónoch, k ich degenerácii a apoptóze — naprogramovanej bunkovej smrti (Novák, 1994). Rekombinantná molekulová rekonštrukcia drene AV a jej ultraštruktúrna analýza (vyvinutie techník umožňujúcich zväčšenie až 2 miliónkrát) umožnili dokázať, že základnou stavebnou jednotkou AV je minimálna jednotka proteínu tau, ktorá svoju odolnosť voči pôsobeniu proteáz a deštručných mechanizmov bunky získava špeciálnym zoskupovaním do základných stavebných kameňov AV — *tauonov* (Novák, 1994; Ruben a spol., 1995).

V mimobunkovom priestore mozgovej kôry, ako aj v ďalších častiach mozgu, sa nachádzajú nahromadenia amyloidových fibril. Tieto vlákna majú priemer 8 nm. Vytvárajú útvary v podobe plakov, ktoré sa vyskytujú v malom množstve i u zdravých starých ľudí, a preto sa nazývajú *senilné plaky*. Plaky tohto typu majú vo

svojom strede fokálne nahromadenia amyloidu, a preto sa považujú za tzv. *zrelé plaky* (obr. 5). Na rozdiel od nich sa difúzne rozptýlené amyloidové vlákna bez centrálnej hustej zóny považujú za mladé plaky a používa sa pre ne označenie *difúzne plaky*. Výskyt a množstvo senilných a difúzných plakov nekoreluje so stupňom demencie, t.j. nemajú diagnostický význam. Ak senilné plaky obsahujú degenerované úseky neuritov, tzv. neuritickú zložku, označujú sa ako *neuritické plaky*. Práve „obohatenie“ plakov o túto zložku robí ich na rozdiel od senilných a difúzných plakov diagnosticky významnými, pretože prítomnosť degenerovaných neuritov v zóne plaku a počet takýchto plakov koreluje so stupňom demencie.

Klasický senilný plak pri Alzheimerovej chorobe obsahuje viacero patologických zložiek. Od prvého opisu senilných plakov po identifikáciu a čiastočnú biochemickú analýzu hlavnej zložky prešlo 92 rokov. Boli to Glenner a Wong, ktorí roku 1984 zistili, že ňou je 42 aminokyselín dlhý bielkovinový fragment, ktorý bol pomenovaný ako β -amyloid, zvaný aj A4-proteín (Masters a spol., 1985). V tom období najmä tzv. „Americká škola“ bola presvedčená, že má riešenie na dosah ruky. Všadeprítomnosť proteínu A4 v mozgu postihnutých pacientov viedla mnohých pracovníkov k presvedčeniu, že ide o kľúč k vyriešeniu záhady Alzheimerovej choroby. Navyše sa β -amyloid nachádza v senilných plakoch, a to najmä v podobe nerozpustných patologických vlákien — amyloidových fibril. Je zrejme, že práve takéto abnormálne nerozpustné štruktúry môžu veľmi ľahko porušiť jemnú architektóniku centrálného nervového systému, a tým aj komunikáciu v ňom samom. Začal sa dlhoročný urputný boj medzi najlepšimi pracovníkmi sveta o to, komu sa podarí zistiť pôvod tohto krátkeho proteínu. Po troch rokoch práce molekulárni biológovia izolovali gén, ktorý kodoval bielkovinu vyskytujúcu sa v troch hlavných izoformách obsahujúcich 695, 751 a 770 aminokyselinových jednotiek. Gén sa nachádzal na chromozóme 21 (Kang a spol., 1987; Kitaguchi a spol., 1988; Ponte a spol., 1988; Tanzi a spol., 1988). Isoforma dlhá 695 aminokyselín je najhojnejšie sa vyskytujúci β -amyloidový prekurzorový proteín (β APP) v neurónoch. V nich sa zúčastňuje na anterogradnom a retrogradnom axónovom transporte a transcytóze (Koo a spol., 1990; Yamazaki a spol., 1995). β APP sa nachádza na povrchu takmer všetkých buniek nervového systému, neurónov, astrocytov, mikrogliových a endoteliových buniek. Normálnym štiepením vzniká z transmembránového prekurzorového proteínu β APP (s M_r 90–100x10³) jeho sekrečná forma — β APPs (Weidemann a spol., 1989; Esch a spol., 1990; Sisodia a spol., 1990). Identifikácia ďalších sekrečných foriem poukázala na viac alternatívnych metabolických ciest amyloidového prekurzorového proteínu, ktoré produkujú β APP štiepený na rôznych miestach mimobunkovej (extracelulárnej) a transmembránovej domény (Shoji a spol., 1992; Hçass a spol., 1992; Seubert a spol., 1992; Busciglio a spol., 1993a). Známa primárna štruktúra β -amyloidu umožnila jeho rýchlu identifikáciu ako súčasť prekurzorového amyloidového proteínu, ktorý sa v β APP nachádza medzi aminokyselinovými jednotkami na pozíciách 596 až 638 (Selkoe, 1994). Z časového hľadiska bol β -amyloid objavený skôr ako jeho prekurzorový proteín. Preto bol prekurzor pomenovaný po svojom produkte „ β -amyloide“ ako *β -amyloidový prekurzorový proteín (β APP)*. N-koniec A4-proteínu vyčnieva nad povrch bunky a jeho C-koniec je vnorený do membrány, ale už nezasahuje do vnútra bunky na rozdiel od svojho prekurzora (obr. 6). Dlhé roky vedci verili, že β -amyloidový A4-proteín je patologickým produktom vznikajúcim pôsobením patologického enzýmu „sekretázy“, ktorá štie-



Obr. 6. Štruktúra β -amyloidového prekurzorového proteínu (β APP). Z tohto proteínu sa pomocou enzýmov vyštiepi (označené šípkami) β -amyloidový fragment nazývaný aj A4-proteín, ktorý sa z neznámeho dôvodu začína ukladať, hromadiť vo forme senilných plakov (pozri aj obr. 1) v mozgu človeka. β -amyloidový peptid sa skladá z 39–43 aminokyselín. Šípky vnútri β -amyloidového peptidu naznačujú ďalšie možné štiepne miesta fragmentu predpokladanými proteázami-sekretázami. Šípky zakončené písmenami znamenajú zmenu aminokyselín v dôsledku mutácie v prekurzorovom géne. KPI — doména Kunitzovho typu proteázového inhibítora. Číslovanie je podľa najdlhšej izoformy β APP₇₇₀.

Fig. 6. Structure of β amyloid precursor protein (β APP). The β -amyloid fragment, (called A4 protein) is proteolytically derived (in effect of unidentified proteases termed secretases) from the β APP precursor protein. The A4 protein is deposited in the form of senile plaques (see Fig. 1) in the human brain due to unknown reasons. The β -amyloid peptide is 39–42 (43) aminoacids long and originates from parts of exons 16 and 17. Arrows pointing towards the β -amyloid fragment show the possible secretase cleavage sites. Arrows with capital letters represents productive mutations in β APP gene.

pi jeho rodičovský prekurzorový proteín na nesprávnom mieste. Tým dochádza k produkcii, resp. vzniku abnormálneho fragmentu, ktorý je základným stavebným kameňom nerozpustných amyloidových fibril organizujúcich sa do senilných plakov. Dnešné výsledky poukazujú na to, že β -amyloid je fyziologickým produktom bunky a možno ho nájsť dokonca aj v supernatante bežných tkanivových kultúr. Táto skutočnosť presvedčila popredné vedecké tímy, že pre pochopenie mechanizmu, ktorým sa z normálneho bunkového produktu β -amyloidu stáva patologický β -amyloid — hlavná súčasť senilných plakov, je potrebné sa vrátiť naspäť a hlbšie sa oboznámiť s metabolizmom a biológiou tohto transmembránového prekurzorového proteínu. Napriek nesmiernemu úsiliu v posledných rokoch je fyziologická úloha β APP v mozgu človeka len čiastočne známa. Predpokladá sa, že sekrečné formy β APP (β APPs) pôsobia ako autokrinné faktory, ktorých úlohou je stimulácia proliferácie buniek (Saitoh a spol., 1989). β APPs podporujú aj adhéziu buniek k rôznym substrátom pravdepodobne prostredníctvom interakcie s lamininom (Schubert a spol., 1989; Breen a spol., 1991; Chen a Yan-ker, 1991; Milward a spol., 1992; Kibbey a spol., 1993). Dôležité

zistenie pochádza zo štúdií Millwarda a spol. (1992), ktorí zistili, že β APPs má úlohu pri sprotredkovaní stimulujúceho účinku nervového rastového faktora na rast nervových výbežkov na modele PC12 buniek. Ojedinelé práce poukazujú na účasť β APP pri prenose signálov v bunke. β APP interaguje s heterotrimérnymi G-proteínmi (Nishimoto a spol., 1993) a zúčastňuje sa aj na aktivácii vysokej vodivosti draslíkových kanálov (Furukawa a spol., 1996). Fosforylácia má pri Alzheimerovej chorobe svoje významné miesto najmä v oblasti patológie tau-proteínov. Preto oprávnenú pozornosť vzbudzuje práca poukazujúca na zvýšenie aktivity MAP-kinázy pôsobením β APP (Greenberg a spol., 1994). Snaha o úplné zmapovanie biologických funkcií viedla k príprave geneticky „upravených“ myši, ktorým sa odstránil gén pre β APP (tzv. β APP-knockout mice). Myši sa javili pri narodení úplne normálne, čo dokumentuje, že β APP nie je bezpodmienečne potrebný pre ich vývin. Dospelé myši preukazovali 20 % zníženie hmotnosti sprevádzané zníženou motorickou aktivitou. Jedinou zistiteľnou abnormalitou mozgu bola reaktívna glióza. Neuróny týchto myši nemali žiadne známky degenerácie (Zheng a spol., 1995; Muller a spol., 1994). Tieto výsledky sú prekvapujúce, pretože vzhľadom na úlohu β -amyloidu, ktorá sa mu pripisuje pri Alzheimerovej chorobe, sa v dôsledku odstránenia génu pre β APP očakávalo oveľa viac. Je dosť možné, že v priebehu embryonálneho vývoja sa dokázali uplatniť kompenzačné mechanizmy a nahradiť chýbajúci β APP.

Identifikácia viacerých génov s vysokou homológiou (APLP1, APLP2) s β APP génom poukázala na jeho „členstvo“ v rodine podobných proteínov (Wasco a spol., 1992, 1993; Slunt a spol., 1994). Výskyt APLP2 proteínu v CNS poukazuje na jeho možnú úlohu pri synaptogenéze (Thinakaran a spol., 1995). Homológy β APP proteínu boli identifikované aj v známom nematode *Caenorhabditis elegans* (Luo a spol., 1992; Digne a Li, 1993) a sekvenácia jeho génu v MRC, Laboratóriu molekulárnej biológie v Cambridge (U.K.), mala zásadný význam aj pre vypracovanie stratégie na sekvenovanie genómu človeka.

Dôležitou otázkou zostáva, či porucha funkcie β APP sa zúčastňuje na patogenéze pri Alzheimerovej chorobe alebo nie. Hladiny sekrečného komponentu β APP označovaného ako APPs v mozgovomiechovom moku sú pri Alzheimerovej chorobe znížené (Van Nostrand a spol., 1992). *In vitro* pokusy ukázali, že APPs majú na bunkové kultúry protektívny účinok a sú schopné chrániť ich pred stresom vyvolaným napr. glukózovým hladovaním, a to mechanizmom zúčastňujúcim sa na stabilizácii vnútrobunkového vápnika (Mattson a spol., 1993 a; Schubert a Behl, 1993). Zvýšenie hladiny β APP proteínu, ktoré sa dosiahlo transgénne zvýšenou expresiou, zvýšilo počet synapsí v mozgovej kôre (Mucke a spol., 1994, 1995). Tento výsledok spätne poukazuje na to, že zníženie množstva produkcie β APP proteínu pri Alzheimerovej chorobe môže mať za následok zvýšenú zraniteľnosť neurónov toxickými atakmi.

Úloha β APP a β -amyloidu pri Alzheimerovej chorobe

Napriek nesmiernemu množstvu vynaloženej vedeckej práce zaostáva podiel β APP a β -amyloidu v patogenéze ACh ďaleko za „nádejami“ do neho vkladanými. Na jeho priamu účasť doteraz poukazujú tri hlavné skutočnosti: a) mutácie β APP génu pri ACh (sú však veľmi zriedkavé); b) pri Downovom syndróme je zvýšená expresia β APP a podobná patológia ako pri ACh; c) neurotoxickosť β -amyloidových fibríl.

Mutácie v β APP sú pri ACh veľmi zriedkavé a vyskytujú sa len v niekoľkých rodinách. Úplne prvá mutácia v β APP géne bola identifikovaná v kodóne 717, ktorý sa nachádza proximálne od štiepneho miesta β -amyloidového proteínu (Goate a spol., 1991). *In vitro* tento mutant produkoval zvýšené množstvo ľahko agregovateľného β -amyloidu (Suzuki a spol., 1994). Práve táto forma β -amyloidu, ktorá má 42 aminokyselinových jednotiek, je prevládajúcou formou β APP fragmentu v senilných plakoch (Roher a spol., 1993). Mullan a spol. (1992) opísali ďalšie dve mutácie v blízkosti N-terminálneho konca β -amyloidu, ktorý pri expresii *in vitro* niekoľkonásobne prevyšil normálny β APP v produkcii β -amyloidu (Citron a spol., 1992; Cai a spol., 1993). Jediná mutácia priamo v β -amyloidovom fragmente sa zistila u členov niekoľkých holandských rodín s hemoragickými poruchami, u ktorých sa ukladá β -amyloid v cievach mozgu (Levy a spol., 1990; Wisniewski a spol., 1991). Z týchto prác vyplýva, že mutácie v β APP proteíne majú za následok vyššiu produkciu β -amyloidového fragmentu, ako aj zvýšenú tvorbu amyloidových fibríl. Nie je vylúčené, že práve zvýšená agregácia β -amyloidového proteínu môže viesť k vzniku ACh.

Štúdie na bunkových modeloch ukázali, že C-terminálny koniec β APP proteínu, v ktorom sa nachádza aj β -amyloidový fragment, je neurotoxický. Na základe tohto mnohí autori predpokladajú, že práve táto toxickosť β -amyloidu môže byť primárnou príčinou degenerácie neurónov pri ACh (Yanker a spol., 1989, 1990a, 1990 b; Pike a spol., 1991, 1993; Roher a spol., 1991; Busciglio a spol., 1992; Mattson a spol., 1993 b). Novšie štúdie dokazujú, že neurotoxickosť fragmentu podmieňuje výlučne jeho montáž do fibríl. Zhluky β -amyloidu bez tvorby fibríl nie sú toxické (Lorenzo a spol., 1994; Busciglio a spol., 1995; Howlett a spol., 1995). *In vitro* zistenia sú odzrkadlením situácie *in vivo*, kde neurodegeneratívne zmeny pri ACh sa nachádzajú v okolí „fibrilárnych“ senilných plakov, a to v oblasti amorfných, difúzných agregácií β -amyloidu (Mann a Esiri, 1989; Yamazaki a spol., 1992). Základným ohniskom tvorby plaku môže byť prvý pár fibríl, okolo ktorých sa potom ukladajú dlhodobo v priebehu niekoľkých rokov krátke β -amyloidové peptidy (Jarret a Lansbury, 1993; Barrow a Zagorski, 1991; Maggio a spol., 1992; Iwatsubo a spol., 1994; Suzuki a spol., 1994). Niektoré rizikové faktory môžu významne ovplyvňovať tvorbu amyloidových fibríl *in vitro* a pôsobiť ako katalyzátory tohto procesu, napr. ApoE, heparansulfát (Fraser a spol., 1992; Snow a spol., 1994), oxidácia (Dyrks a spol., 1992), ťažké kovy a hliník (Mantyh a spol., 1993; Bush a spol., 1994; Fasman a spol., 1995). V poslednom čase rýchlo pokračujú práce na molekulovej charakterizácii receptora pre koncové produkty glykácie, ktorý nesie označenie RAGE. Práve tento receptor sprostredkuje interakciu β -amyloidu s neurónmi a endotelovými bunkami, ktorej výsledkom je oxidačný stres. Interakcia β -amyloidu týmto istým mechanizmom s mikroglia má za následok aktiváciu buniek, produkciu cytokínov, chemotaxiu a haptotaxiu (Yan a spol., 1996).

Neurotoxickosť amyloidogénnych peptidov *in vitro* sa neviaže len s β -amyloidom, ale pozorovala sa aj pri amyline, sérovom amyloide P a peptidových fragmentoch z priónového proteínu (Forloni a spol., 1993 a; May a spol., 1993; Lorenzo a spol., 1994; Urbányi a spol., 1994). Toxickým výsledkom pôsobenia týchto peptidov na bunky je ich naprogramovaná smrť (apoptóza) (Forloni a spol., 1993 b; Loo a spol., 1993; Lorenzo a spol., 1994). Ak

sa preukáže, že skutočne tvorba amyloidogénnych fibríl je primárnym kľúčom k degenerácii neurónov pri ACh, potom bude úplne opodstatnené zamýšľať sa nad špecifickou inhibíciou tvorby fibríl, ako nad jedným z možných terapeutických prístupov. Napríklad farbivo Kongo-červená sa viaže na amyloidogénne fibrily a zabráni ich tvorbe. Podobne je to aj pri priónových fibrilách (Caughey a Race, 1992; Lorenzo a Yanker, 1994; Kisilevsky a spol., 1995; Polack a spol., 1995; Podlisny a spol., 1995). Na lepšie pochopenie úlohy β -amyloidového fragmentu sa pripravilo niekoľko transgénnych myších modelov, ktorých úlohou bolo napodobniť degeneráciu cholinérgických neurónov pri ACh (Davies a Maloney, 1976; Whitehouse a spol., 1982; Bartus a spol., 1982). Náznaky degenerácie cholinérgických neurónov týchto transgénnych myší sa mohli úplne zastaviť podávaním nervového rastového faktora (Koliatis a spol., 1991; Tuszyński a spol., 1991). Dôležitým testom amyloidovej hypotézy bola aj príprava takých transgénnych myší s β APP mutáciou 717, u ktorých sa už pozorovali patologické zmeny ACh typu vrátane straty synapsií a dendritov v mozgovej kôre (Lamb a spol., 1993; Quon a spol., 1991; Moran a spol., 1995). Napriek tomu sa u týchto transgénnych β APP zvierat (Games a spol., 1995) nevyvinuli neurofibrilárne zmeny, ktoré sú veľmi významné pri ACh a ktoré korelujú u človeka s jeho intelektuálnym úpadkom. Aj preto zostáva stále nevyriešená otázka súvislosti medzi výskytom senilných plakov a neurofibrilárnych kľbiek. Je dosť možné, že myši nie sú schopné (z neznámych príčin) tvoriť neurofibrilárne kľbky. Preto sa začali pozorovať opice, kde sa sice zistili u starých jedincov drobné imunoreaktívne β -amyloidové akumulácie (Martin a spol., 1994), ale žiadne neurofibrilárne kľbky. Okrem človeka to bola jedine ovca, u ktorej sa zistila tvorba spontánnych neurofibrilárnych kľbiek (NFK) vo vyššom veku (Nelson a spol., 1994). Sériu pokusov na potkanoch, ktorým sa priamo do mozgu injikoval β -amyloidový fragment, priniesla protichodné výsledky. Najskôr sa ukazovalo, že tieto fragmenty sú cytotoxické (Frautschy a spol., 1991; Kowall a spol., 1991). Neskôr iné laboratória neboli schopné tieto výsledky potvrdiť (Podlisny a spol., 1991). Konečným vysi až ďalšie pokusy, ktoré ukázali, že pre cytotoxickosť je rozhodujúci stupeň tvorby fibríl. Ak sa po injikovaní nevytvorili fibrily, potom sa ani nepozorovali žiadne cytotoxické zmeny (Busciglio a spol., 1992; May a spol., 1992; Snow a spol., 1994; Giovannelli a spol., 1995). Napriek veľkému úsiliu o získanie modelu, ktorý by mal všetky typické patologickomorfologické črty ACh, sa takýto doteraz nepodarilo pripraviť.

Hypotéza, že β -amyloidový peptid je primárnym faktorom v patogenéze ACh, je stále otvorenou otázkou. Všetky doterajšie práce potvrdzujú, že so stupňom intelektuálneho úpadku nekorreluje β -amyloidový peptid, ale strata synapsií v mozgovej kôre a počet neurofibrilárnych kľbiek (Morris a spol., 1991; Terry a spol., 1991). Pochopiteľne, že sme sa neuspokojili s týmto stavom. Amyloid je všade a je integrálnou súčasťou patológie a patogenézy pri ACh. Preto sme sa pri vypracúvaní pracovných hypotéz na našom pracovisku pozornejšie sústredili na metabolizmus prekursorového β APP proteínu a jeho „komunikáciu“ s imunitným systémom. Spôsobilá to skutočnosť, že v senilných plakoch sú „imobilizované“ mnohé zložky imunitného systému, čo poukazuje na interakciu imunitného systému a β APP pri tvorbe senilných plakov. Už úvodné experimenty ukázali, že v prípade „nefyziologickej“ lokalizácie A4-proteínu sa z neškodnej

molekuly stáva „agresívny“ inštruktor atakujúci najmä imunitný systém. Jeho ústredné orgány začínajú prostredníctvom svojich T-lymfocytov vysielat nesprávne signály do organizmu, ktoré vzápätí vypnú pre život bunky dôležitý systém pozostávajúci zo 6 izoformami tau-proteínu.

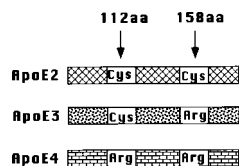
Rizikové a genetické faktory pri Alzheimerovej chorobe

Analýza rýchlo pribúdajúcich poznatkov o ACh poukazuje na to, že táto choroba predstavuje zložitý syndróm s nejednotnou etiológiou a množstvom rizikových a genetických faktorov definovaných do rôzneho stupňa. Za hlavné rizikové faktory sa považuje vek a genetické lokusy na chromozómoch 1, 14, 19 a 21. V poslednom čase sa identifikovalo viacero rodín s ACh a genetickými mutáciami v uvedených lokusoch. Niekoľko mutácií bolo identifikovaných na β -amyloidovom prekursorovom proteíne (obr. 6), ktorý sa nachádza na chromozóme 21. Mutácia priamo v úseku β -amyloidového fragmentu sa zistila v niekoľkých holandských rodinách s hemoragickými poruchami, pri tzv. hereditárnej cerebrálnej hemorágii s amyloidózou — holandský typ (HCHWA-D). Pri tejto chorobe dôjde k zámene kyseliny glutámovej za glutamín, čo má za následok ukladanie β -amyloidu v cievach mozgu (Levy a spol., 1990; Wisniewski a spol., 1991). Ide o mutáciu s najvýraznejším účinkom zo všetkých mutácií dosiaľ identifikovaných na chromozóme 21.

Poznatky z prác študujúcich vplyv mutácií β APP naznačujú, že mutácie v tomto proteíne majú za následok vyššiu produkciu β -amyloidového fragmentu, ako aj zvýšenú tvorbu amyloidových fibríl. Nie je vylúčené, že práve zvýšená agregácia β -amyloidového proteínu môže viesť k vzniku ACh. Skôr ako budeme môcť zodpovedať túto kľúčovú otázku, bude potrebné zistiť, akú biofyzikálnu zmenu spôsobujú jednotlivé mutácie v súvislosti so vznikom ACh alebo s cerebrálnou hemorágiou, alebo čo je príčinou, že v mnohých prípadoch mutácia nemá žiadny zistiteľný fenotypový prejav.

Chromozóm 19 (19q13.2) — Apolipoprotein E ako rizikový faktor pri Alzheimerovej chorobe

Mimoriadnu pozornosť si zasluhuje lokus na chromozóme 19, kde sa nachádza aj gén pre apolipoprotein E (apoE), ktorý je dôležitým transportérom cholesterolu. ApoE je klasickým príkladom toho, ako výmena jednej aminokyseliny v jeho jednotlivých izoformách spôsobuje výrazné rozdiely v ich biochemických a metabolických vlastnostiach vrátane rozdielného vplyvu na výskyt ACh. ApoE sa najčastejšie vyskytuje v troch genetických variantoch: apoE2, apoE3 a apoE4 (obr. 7), ktoré zodpovedajú za 99 % polymorfizmu a ktoré umožňujú vznik šiestich apoE fenotypov: E2/2, E3/3, E4/4 u homozygotov a E3/2, E4/2 a E4/3 u heterozygotov. Za ostávajúce 1 % polymorfizmu zodpovedajú alely ApoE1 a ApoE5. Najčastejšie sa vyskytujúcou izoformou je ApoE3 (78 %), potom ApoE4 (15 %). Najmenej častou izoformou je ApoE2 (7 %). Jednotlivé izoformy sa navzájom líšia len prítomnosťou, alebo absenciou cysteínu v polohe 112, alebo 158 ich proteínového refazca. A práve tento malý rozdiel v jednej aminokyseline má hlavnú úlohu pri tom, či určitý človek bude viac alebo menej náchylný na vznik ACh. Genetické analýzy ukazujú, že riziko vzniku ACh stúpa úmerne s číslom izoformy apoE, t.j. apoE2 je najmenej riziková (Corder a spol., 1994; Royston a spol., 1994) a homozygoti E4/4



Obr. 7. Apolipoprotein E je dôležitým prenášačom cholesterolu. Najčastejšie sa vyskytuje v troch izoformách ApoE 2,3 a 4, ktoré sa navzájom líšia výmenou aminokyselín v polohe 112 a 158. Súbežne s touto zámennou sa mení aj schopnosť transportovať cholesterol od výkonného transportéra (ApoE2) až po veľmi slabý transportér (ApoE4).

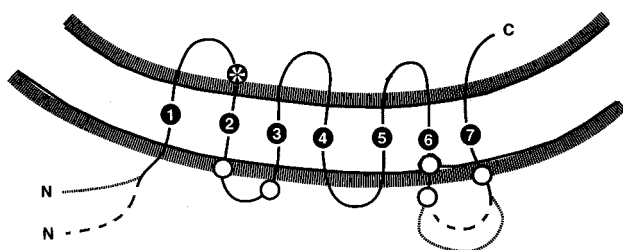
Fig. 7. Apolipoprotein E is an important transporter of cholesterol. Three isoforms of Apolipoprotein E (Apo E2, E3, and E4) are most frequent. They differ in aminoacid residues at sites 112 and 158. Changes at these residues are associated with a changed capacity for cholesterol transportation, from very efficient (ApoE2) to very weak (ApoE4).

Tab. 1. Percentuálny výskyt jednotlivých typov geneticky determinovaných a sporadických ACh.

Tab. 1. Occurrence (%) of genetic (FAD) and sporadic AD.

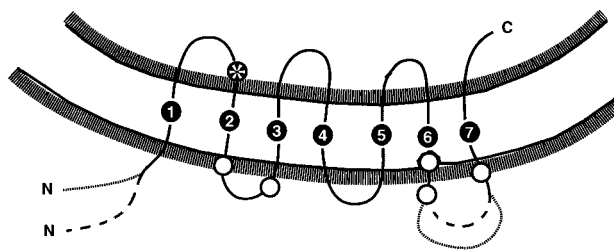
Typ Type	Chromozóm Chromosome	Gén Gene	%
Skorý typ FACH Early onset FAD	21	b-APP	<1
Skorý typ FACH Early onset FAD	14	PS-1	~ 8
Skorý typ FACH Early onset FAD	1	PS-2	~ 1
Sporadický, neskorý typ ACh Sporadic late onset AD	19	ApoEε4	
Ostatné ACh ?? ~ 40 Other AD			

Mutations in proteins coded for by PS-1 and PS-2 are localized in the vicinity of transmembrane domains



- Primary structure PS-1 (S182) different from PS-2
- - - - - Primary structure PS-2 different from PS-1
- High homology regions
- ⊛ Mutations in PS-2
- Mutations in PS-1 (S182)

Mutácie v proteínových produktoch génov PS-1 a PS-2 lokalizované v blízkosti transmembránových úsekov



- Primárna štruktúra PS-1 (S182) odlišná od PS-2
- - - - - Primárna štruktúra PS-2 odlišná od PS-1
- Oblasti s vysokou homológiou
- ⊛ Miesto mutácie v PS-2
- Miesto mutácie v PS-1 (S182)

Obr. 8. Presenilín-1 (PS-1) a presenilín-2 (PS-2) sú proteíny kódované gémi umiestnenými na chromozóme 14 (PS-1) a 1 (PS-2). Ich úloha sa vzhľadom na ich výskyt v mutovanej podobe dáva do súvislosti s agresívnymi formami ACh, vyskytujúcimi sa nezriedka pred dosiahnutím veku 40 rokov. Dosiaľ sa zistilo celkovo 22 mutácií v géne pre PS-1, ktoré môžu mať kľúčovú úlohu v etiológii a patogenéze ACh.

Fig. 8. Presenilin 1 (PS-1) and presenilin-2 (PS-2) are proteins coded for by genes on chromosomes No 14 (PS-1) and No 1 (PS-2). Aggressive forms of AD with early onset have mutated presenilins causing AD before the age of 40. 22 mutations have been identified in the PS-1 gene, and 2–3 in the PS-2 gene. These can play an important role in the etiology and pathogenesis of AD.

sú ohrození najviac. Prečo je to tak? Pravdepodobné vysvetlenie sa našlo na úrovni proteínov. Skupina, ktorú viedol náš spolupracovník prof. Alan Roses (Duke University Medical Center, Durham) zo Severnej Karolíny, zistila, že apoE izoformy sú intimne spojené s metabolizmom dvoch hlavných aktérov pri ACh, a to β-amyloidu a patologických foriem tau-proteínu. Izoforma E3 sa viaže na tau-proteín a na základe štatistických štúdií sa predpokladá, že tým ho chráni pred nepriaznivými účinkami metabolických zmien pri starnutí organizmu. *In vitro* pokusy preukázali schopnosť ApoE3 viazať sa na tau-proteín. Vzniknutý komplex tau-ApoE je odolný voči pôsobe-

niu 2 % sodium dodecylsulfátu (SDS) a nerozdelí ho ani pôsobenie teplôt okolo bodu varu (Strittmatter a spol., 1993 b). Celý komplex má molekulovú hmotnosť 105 000, čo predstavuje súčet molekulových hmotností tau-proteínu (68 000) a ApoE3 (34 000). K ireverzibilnej reakcii medzi tau-proteínom a ApoE dôjde už v priebehu 30 minút. ApoE sa viaže len na nefosforylovaný proteín tau. Hyperfosforylácia proteínu tau zabraňuje jeho interakcii s mikrotubulmi (Biernat a spol., 1993; Bramblett a spol., 1993; Lu a Wood, 1993; Alonso a spol., 1994). Predpokladá sa, že práve väzba ApoE na proteín tau zabraňuje jeho hyperfosforylácii. Izoforma ApoE4 nie

je schopná reagovať s tau-proteínom, ani s proteínom MAP2, ktorý má časť molekuly do značnej miery podobnú s tau-proteínom a patrí do skupiny proteínov spojených s mikrotubulmi. Predpokladá sa, že u ApoE4 homozygotov nie je tau-proteín v dôsledku jeho inertnosti voči ApoE4 ním chránený, a v dôsledku toho rýchlo podlieha čiastočnej degradácii, ktorá môže v určitom stupni mať za následok jeho samomontáž do AV. Izoforma ApoE4 uprednostňuje β -amyloid, s ktorým tvorí *in vitro* ireverzibilné komplexy. Tieto komplexy sú stále aj na pôsobenie SDS a guanidín hydrochloridu (Strittmatter a spol., 1993 b; Polvikoski a spol., 1995). Tieto *in vitro* výsledky sú v súlade s imunohistochemickými a biochemickými štúdiami, ktoré ukázali, že ApoE sa nachádza v senilných plakoch (Namba a spol., 1991; Wisniewski a Frangione, 1992; Rebeck a spol., 1993; Näslund a spol., 1995). ApoE3-A β komplex sa vytvorí *in vitro* až po dvoch hodinách, čo je podstatne pomalšie pri porovnaní s ApoE4, ktorý utvorí ireverzibilný komplex s A β už v priebehu 5 minút. Väzbová doména, t.j. definovaný úsek molekuly, ktorou sa ApoE viaže na A β , sa určila pomocou fragmentov ApoE proteínu pripravených rekombinantnou cestou. Fragment ApoE s veľkosťou 22 000 (N-terminálny úsek molekuly od prvej aminokyseliny po aminokyselinu 199) netvorí stabilné komplexy s A β . Podobne sa správa aj fragment ApoE, ktorý utvára úsek až po aminokyselinu 244. Stabilné komplexy tvorí fragment o niečo dlhší, ktorý dosahuje prvých 266 aminokyselinových jednotiek (Strittmatter a spol. 1993 b; Ma a spol., 1994; Sanan a spol., 1994; Wisniewski a spol., 1994). Tento diferenciálny prístup umožnil identifikáciu oblasti ApoE, od aminokyselinovej pozície 244 po pozíciu 266, ako úseku, s ktorým reaguje A β . Zhodou okolností ide o ten istý úsek molekuly ApoE, ktorý realizuje väzbu lipoproteínových častíc. Niekoľkodňová inkubácia A β s ApoE proteínom má za následok tvorbu vlákien s priemerom 10 nm. Elektrónová mikroskopia dokumentuje interakciu ApoE s A β pozdĺž celej dĺžky týchto vlákien. Štruktúrne ApoE-A β vlákna nie sú identické s *in vivo* amyloidovými vláknami z ACh, ktoré majú odlišnú štruktúru.

Izoformovo-špecifické interakcie ApoE a jeho lokalizácia vnútri neurónov

Podrobné štúdie jednotlivých izoform ApoE na molekulovej úrovni poukázali na to, že izoformy sa výrazne líšia z hľadiska ich interakcie s dôležitým nízkodenzitným lipoproteínovým (LDL — low density lipoprotein) receptorom a väzby s lipidovými časticami obsahujúcimi cholesterol (Gregg a spol., 1983; Wisgraber a spol., 1982). ApoE3 a ApoE4 majú vysokú afinitu pre LDL-receptor, kým ApoE2 má väzbovú afinitu veľmi nízku (približne len 1 % afinity ApoE3). Silná ateroskleróza je bežná u homozygotov ApoE2. Predpokladá sa, že je to v dôsledku nízkej endocytózy sprostredkovanej ApoE receptorom. ApoE sa viažu na povrchové bunkové receptory, vrátane proteínu podobného LDL-receptoru, tzv. veľmi nízko denzitnému lipoproteínovému receptoru (VLDLR — very low density lipoprotein receptor) a sú ich súčasťou (Mahley, 1988). Účinnosť, akou ApoE viažu fosfolipidové častice, je pri jednotlivých izoformách rozdielna. Apo E2 a Apo E3 sa viažu prednostne s vysoko denzitnými lipoproteínovými (HDL — high density lipoprotein) časticami, kým Apo E4 sa prednostne viaže s VLDL-časticami.

In situ hybridizačné štúdie mozgového tkaniva ukázali, že mRNA pre ApoE je prítomná len v astrocytoch a bunkách mikroglie. Nevyskytuje sa v neurónoch. O to väčšie prekvapenie priniesli imunohistochemické štúdie ľudských mozgových tkanív postihnutých

Alzheimerovou chorobou, poukazujúce na prítomnosť ApoE v neurónoch s neurofibrilárnymi kľbkami (NFK), ale aj v histologicky zdravých neurónoch. Tieto štúdie hovoria o možnej dôležitej úlohe ApoE v metabolizme neurónov a pri degeneračných a regeneračných procesoch v centrálnom nervovom systéme (Han a spol., 1994 a, b; Strittmatter a spol., 1993 a). Neskôr tá istá skupina pracovníkov detegovala v neurónoch hipokampu v 24 študovaných prípadoch ACh prítomnosť ApoE, bez ohľadu na to, aký bol ich ApoE genotyp. Len malá časť neurónov pozitívnych na ApoE obsahovala Alzheimerove neurofibrilárne kľbká (Han a spol., 1994 b; Namba a spol., 1991; Rebeck a spol., 1993). ApoE má dôležitú úlohu v regulácii metabolizmu lipidov pri poškodení axónov v periférnom a centrálnom nervovom systéme (Ignatius a spol., 1986; Poirier a spol., 1991). Pri poškodení nervov dôjde v dôsledku degenerácie myelínu k indukcii sekrecie ApoE z astrocytov, a tým k zvýšenému vychytaniu cholesterolu a jeho sekvestracii. Po internalizácii ApoE-lipoproteínových komplexov neurónmi sa vnútri bunky uvoľní cholesterol, ktorý sa pravdepodobne odtransportuje do nervových zakončení, kde sa využije na stavbu nových synapsí. Napriek prítomnosti ApoE vnútri neurónov nepoznáme mechanizmus jeho transportu do ich vnútra. Z hľadiska pochopenia distribučného mechanizmu a transportu ApoE do cytoplazmy nervových buniek sú nápomocné výsledky získané pri štúdiu pacientov so sporadickou, ako aj dedičnou formou myozitídy s inklúznymi telieskami (inclusion body myositis). Pozoruhodné na tomto ochorení je, že z hľadiska neuropatologických zmien, ku ktorým dochádza vo svalových bunkách, je veľmi podobné Alzheimerovej chorobe. Svalstvo myozitických pacientov obsahuje typické amyloidové fibrily, ktoré pozostávajú z toho istého stavebného prvku — β -amyloidu — ako vlákna pri ACh. Prítomné sú aj vlákna podobné párovým špirálovým vláknám pri ACh, ktoré pozostávajú opäť z toho istého stavebného materiálu ako pri ACh — hyperfosforylovaného proteínu tau. Podobnosť s ACh je úplná zistením prítomnosti ApoE v cytoplazme postihnutých svalových buniek, kde dekoruje párové špirálové vlákna. Doteraz však nemáme dôkaz, že svalové bunky sú schopné syntetizovať ApoE (Askanas a spol., 1993, 1994 a, b). Tieto dve podobnosti výskytu ApoE v bunkách, ktoré ho nie sú schopné syntetizovať (aspoň na základe prítomnosti príslušnej mRNA a imunohistochemických štúdií), pri dvoch úplne odlišných ochoreniach, poukazuje na možný spoločný mechanizmus zodpovedný za túto nefyziologickú distribúciu ApoE. Navyše tento mechanizmus by sa mohol vzťahovať aj na distribúciu β -amyloidu a do určitej miery aj tau-proteínu. Očakávanie odborníkov v oblasti výskumu ApoE vedie k tomu, že pochopenie distribučného mechanizmu na molekulovej úrovni by mohlo prispieť k novému terapeutickému neuroprotektívnemu prístupu u pacientov s neskorým typom ACh. Súčasný stav poznatkov o ApoE nám dovoľuje povedať, že lokus ApoE súvisí so začiatkom ACh a možno ho oprávnene považovať za rizikový faktor pri ACh. ApoE4 alela posúva začiatok ACh o niekoľko rokov dopredu. Naproti tomu ApoE3 a ApoE2 alely znižujú riziko vzniku ACh. Z toho vyplýva potreba dôkladného spoznania metabolizmu ApoE.

Chromozóm 14 a 1

Lokus pre rodinný výskyt ACh (FACH lokus) na chromozóme 14 prvýkrát opísali roku 1992 (Schellenberg a spol., 1992; St. George-Hyslop a spol., 1992). Na tomto chromozóme sa pôvodne zistila translokácia u pacientov s FACH, ako aj niekoľko génov, ktorých produkty súvisia s ACh. Konkrétne išlo o gény pre katepsín G a α_1 -antichymotrypsín, ktorých účasť na patologickom metabolizme β -APP pro-

teínu sa vzhľadom na ich prítomnosť v senilných plakoch predpokladala. Podrobná analýza chromozómu 14 a rodín s FACH ukázala, že tieto gény sa nenachádzajú vo FACH lokusoch. O to viac sa zvýšilo úsilie identifikovať gén, o ktorom sa vedelo, že je na tomto chromozóme a že s ním súvisí agresívna forma FACH skorého typu s nezriedkavým začiatkom pod vekovou hranicou 40 rokov. Niekoľko-ročné úsilie viedlo k objavu dvoch génov — presenilínu-1 a presenilínu-2, ktoré sa nachádzajú vo FACH lokuse chromozómu 14 (presenilín-1) a vo FACH lokuse chromozómu 1 (presenilín-2). Presenilín-1 bol objavený ako gén S-182 (Sherrington a spol., 1995), ktorý nesie zápis pre proteín dlhý 467 aminokyselinových jednotiek, a pretože prechádza 7-krát membránou bunky, niekoľko autorov ho pomenovalo aj ako STM-1 (seven transmembrane protein) (obr. 8). Práve v membránovom a perimembránovom úseku produktu génu pre presenilín-1, sa zistili bodové (radikálne) mutácie, ktoré mali za následok výmenu aminokyseliny a tým aj pravdepodobnú zmenu funkcie presenilínu-1. Ku dnešnému dňu ich zistili celkovo 22 u doteraz 40 vyšetrených FACH rodín (Broeckhoven, 1995). Tieto mutácie sa nenašli u zdravých jedincov. Vyskytli sa v tých polohách proteínového reťazca, ktorý je zachovaný z hľadiska výskytu tých istých aminokyselín v tej istej polohe u viacerých druhov zvierat, čo poukazuje na možnú patologickú úlohu týchto mutácií. Biologické funkcie presenilínov nie sú známe. Porovnávanie ich sekvencií s ostatnými proteínmi poukázalo na čiastočnú podobnosť so skupinou receptorových proteínov (tzv. Notch/Lin skupina receptorov), ktorých úlohou je bunkám počas embryonálneho vývinu „povedať“, kde je ich miesto (Levitan a Greenwald, 1995). Experimenty s transfekciami na eukaryotických bunkách ukázali, že presenilíny sa v bunke nachádzajú v endoplazmatickom retikule a v Golgiho komplexe (Kovacs a spol., 1996). Ak sa preukáže a potvrdí tento výsledok vo viacerých laboratóriách, bude možné začať úvahy o účasti presenilínov na transporte a metabolizme proteínov v sekrečných cestách bunky s priamou referenciou na opracovanie β APP a produkciu jeho amyloidogénneho fragmentu β -amyloidu. Na účasť presenilínu pri regulácii programovanej bunkovej smrti poukazuje ich ochranný efekt pri *in vitro* pokusoch s apoptózou (Vito a spol., 1996). Rýchle určenie funkcie proteínu PS-1 bude kľúčovým pre pochopenie patogenézy ACh. To, že práve FACH lokus chromozómu 14 zodpovedá až za 80 % všetkých FACH, čo predstavuje 8–10 % celkového počtu ACh, podčiarkuje urýchlenú potrebu analýzy funkcie presenilínu-1 (tab. 1).

Objav presenilínu-1 umožnil objav presenilínu-2 (STM2), pretože sa mu veľmi podobá, a tak jeho skutočná identifikácia bola po objave presenilínu-1 len otázkou času. Už dlhšie bol známy FACH lokus na chromozóme 1, gén sa však nepodarilo identifikovať. Až sondovanie tejto oblasti pomocou DNA presenilínu-1 ukázalo, že sa vo FACH lokuse na chromozóme 1 u tzv. volžských Nemcov nachádza veľmi podobná sekvencia DNA, ktorú identifikovali ako STM-2 gén (Levy-Lahad a spol., 1995; Rogaeve a spol., 1995; Li a spol., 1995) (aj jeho domény prechádzajú 7-krát cytoplazmatickou membránou bunky), neskôr premenovaný na presenilín-2. Oba gény nesú zápis pre veľmi podobné proteíny (obr. 5). K dnešnému dňu bolo u oboch génov identifikovaných spolu 25 dedičných mutácií, z toho 7 pripadá na presenilín-2 (Wasco a spol., 1995).

Oxidačný stres, vek a účasť imunitného systému pri Alzheimerovej chorobe

Vek ako jeden z hlavných rizikových faktorov pri ACh poukazoval na oxidačný stres ako na možného kandidáta pre účasť v patoge-

néze ACh už dávnejšie. Vznik voľných kyslíkových radikálov sa preukázal pri viacerých neurodegeneratívnych ochoreniach (Parkinsonova choroba, amyotropná laterálna skleróza) (Coyle a Puttfarcken, 1993; Brown, 1995). Zvýšená peroxidácia lipidov (Subbarao a spol., 1990), zvýšená karbonylová modifikácia bielkovín (Smith a spol., 1991) a zvýšená oxidácia mitochondriovej DNA (Mecocci a spol., 1994) poskytujú dôkaz o zvýšenom oxidačnom strese pri ACh. Analýza mitochondriových enzýmov ukázala vysoký počet závažných deficiencií pri ACh. Aj nízky metabolizmus glukózy v mozgovej kôre u tých istých pacientov poukazuje na poruchy energetického metabolizmu (Gabuzda a spol., 1994). Niektoré senilné plaky majú pokročilé glykozylačné zmeny, ktoré sú indukované oxidáciou, a majú za následok zvýšenú agregáciu β -amyloidového peptidu (Smith a spol., 1994; Vitek a spol., 1994). Podobné oxidačné zmeny pozorovali aj Smith a spol. (1995) v neurofibrilárnych kľbkách. Oxidačný stres považuje skupina prof. Mandelkova z Hamburgu (Schweers a spol., 1995) za kľúčový pre oxidáciu Cys-322, za bezpodmienečne potrebný krok na tvorbu Alzheimerových špirálových vlákien. Za potenciálny zdroj indukcie naprogramovanej bunkovej smrti neurónov sa považuje oxidačný stres pri ACh (Kane a spol., 1993; Greenlund a spol., 1995), ako aj pri Downovom syndróme (Mann a Esiri, 1989). Busciglio a Yanker (1995) zistili, že neuróny z mozgovej kôry týchto pacientov produkovali signifikantne zvýšené hladiny reaktívnych kyslíkových radikálov s následnou indukciou apoptózy. O zdroji oxidačného stresu pri ACh sa vedie veľa diskusií. β -amyloid sa napríklad považuje za možný zdroj (Hensley a spol., 1994). Ďalším možným zdrojom oxidačného stresu pri ACh je zápalová reakcia iniciovaná aktivovanou mikrogliou. V tesnej blízkosti amyloidových plakov sa zistili aktivované mikrogliové bunky s výraznou expresiou receptorov pre komplement a HLA-antigénov (McGeer a spol., 1994). V bunkových kultúrach *in vitro* aktivuje β -amyloid synergickým spôsobom spolu s interferónom-gama mikrogliu, čo má za následok tvorbu neurotoxických voľných radikálov dusíka (Meda a spol., 1995). Na možné negatívne účinky imunitných mechanizmov pri ACh poukazuje aj experimentálne zistenie aktivácie cytolytickej cesty komplementu β -amyloidom (Rogers a spol., 1992) a to, že v mozgu sa môžu syntetizovať všetky zložky komplementu (Morgan a Gasque, 1996). Predbežné výsledky z klinických pokusov s protizápalovými látkami ukazujú, že tieto znižovali rýchlosť kognitívneho úpadku u pacientov s ACh. Ide o inverzný vzťah medzi liečbou zápalu a ACh. Intímne prepojenie medzi nervovým a imunitným systémom potvrdzuje aj to, že vyvolanie zápalu na periférii súčasne zvyšuje produkciu APP v mozgu experimentálnych myši za súčasne zvýšenej produkcie cytokínov (Patterson, 1995). Podrobné vzájomné vzťahy medzi imunitným a nervovým systémom sú uvedené v prehľadnom článku Ferenčíka a spol. (1996). Periférna aplikácia lipopolysacharidu (Brugg a spol., 1995) spôsobila akútny zápal, ktorý sa odzrkadlil aj v CNS zvýšeným výskytom IL-1 β a IL-6 v mozgovej kôre a v mozochku experimentálnych zvierat. Toto zvýšenie zmenilo aj expresiu jednotlivých izoforiem β APP v centrálnom nervovom systéme. Po tomto výsledku by sa úvaha, že ACh môže mať svoj začiatok na periférii a len potom sa nasťahuje do mozgu, mohla posunúť na úroveň pracovnej hypotézy. Výsledky práce Brugga a spol. (1995) potvrdzujú nepriamo aj Del Bo a spol. (1995), ktorí zistili v primárnych kultúrach z mozgovej kôry potkanov, že IL-1 β a IL-6 zvyšujú expresiu mRNA pre β APP. V tom istom systéme *in vitro* inkubácia astrocytov s β -amyloidovým fragmentom zvyšuje v nich 25–35-krát produkciu IL-1 β . Výsledky imunocytochemickej analýzy senilných plakov

a ostatných neurofibrilárných zmien naznačujú, že tieto štruktúry obsahujú markery zápalu, vrátane komplementu a proteínov akútnej fázy zápalu, ako aj aktivovanú mikroglia (Eikelenboom a spol., 1995). Teraz je v popredí kľúčová otázka: predstavuje zápalová reakcia koncové štádium pri vzniku patomorfologických zmien pri ACh, alebo cytokíny sú rozhodujúce pri iniciácii týchto zmien, vrátane degenerácie neurónov spojených s demenciou? To, že čím sú patologickoanatomické zmeny staršie, tým je účasť aktivovanej mikroglie menšia, naznačuje, že poznanie interakcie imunitného systému s nervovým systémom vrátane stále ešte veľkej neznámej — mozgovocievnej bariéry — môže výrazne prispieť k objasneniu patogenézy ACh. To, že imunitný systém môže monitorovať aj stupeň demencie, vyplýva z merania hladín IL-6, ktoré korelujú s klinickou demenciou (Huell a spol., 1995). Tieto zistenia podporujú náš pracovný model, v ktorom sa zameriavame na skoré abnormálne formy tau-proteínov a štiepne produkty metabolizmu β APP proteínu ako hlavných induktorov aktívacie mikrogliev buniek. Súčasná produkcia cytokínov, či už mozgovými bunkami alebo infiltrujúcimi leukocytmi ďalej zvyšuje odpoveď mikroglie, ako aj tvorbu β APP a abnormálnych tau-proteínov. IL-1 a ďalšie cytokíny indukujú expresiu induktívnej NO-syntázy, ktorej aktivitou vznikajú veľké množstvá oxidu dusnatého, ktorý má spolu so súčasne vznikajúcimi reaktívnymi intermediátmi kyslíka významné cytotoxické účinky (Ferenčík a Štvrtinová, 1996). Výsledkom je degenerácia neurónov a ich deštrukcia. Bez experimentálneho overenia nezostane ani možná účasť buniek T, osobitne v smere ich cytotoxického pôsobenia vyvolaného možnou autoimunitnou odpoveďou. Celková analýza poznatkov dosiaľ získaných pri výskume ACh ukazuje, že medzi prvou aktiváciou neuroimunitnej patologicko-odpovede, počiatočnou neurodegeneráciou a ťlne rozvinutou Alzheimerovou chorobou je veľa bielych miest. Nesmierne zrýchlenie celého neuroimunologického výskumu ACh vo svete je zárukou, že s pribúdajúcimi výsledkami sa na horizonte budúcnosti bude čoraz zreteľnejšie čírať nádej materializovaná v podobe skorých diagnostických pomôcok a účinnej terapie proti tejto veľmi závažnej chorobe.

Literatúra

- Alonso A.C. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 1994, s. 5562—5566.
- Askanas V. et al.: Neurology, 43, 1993, s. 1265—1267.
- Askanas V. et al.: Amer. J. Pathol., 144, 1994 a, s. 177—187.
- Askanas V. et al.: Lancet, 343, 1994 b, s. 364—365.
- Alzheimer A.: All. Z. Psychiatr., 64, 1907, s. 46—148.
- Barrow C.J., Zagorski M.G.: Science, 253, 1991, s. 179—182.
- Bartus T.T. et al.: Science, 217, 1982, s. 408—414.
- Biernat J. et al.: Neuron, 11, 1993, s. 153—163.
- Blass J.P.: Neurology, 43, 1993, s. 525—538.
- Blessed G. et al.: Brit. J. Psychiatry, 114, 1968, s. 797—811.
- Bondareff W. et al.: Amer. J. Pathol., 137, 1990, s. 711—723.
- Bramblett G.T. et al.: Neuron, 10, 1993, s. 1089—1099.
- Breen K.C. et al.: J. Neurosci. Res., 28, 1991, s. 90—100.
- Broeckhoven A.: Nature Genetics, 11, 1995, s. 230—232.
- Brown R.H.: Cell, 80, 1995, s. 687—692.
- Brugg B. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 1995, s. 1609—1611.
- Burns A., Levy R.: Chapman and Hall Medical 1994.
- Busciglio J., Yankner B.A.: Nature, 378, 1995, s. 776—779.
- Busciglio J. et al.: Neurobiol. Aging, 13, 1992, s. 609—612.
- Busciglio J. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 1993 a, s. 2092—2096.
- Busciglio J. et al.: Neuron, 14, 1995, s. 879—888.
- Bush A.I. et al.: Science, 265, 1994, s. 1464—1467.
- Cai X.-D. et al.: Science, 259, 1993, s. 514—516.
- Caughey B., Race R.E.: J. Neurochem., 59, 1992, s. 768—771.
- Chen M., Yankner B.A.: Neurosci. Lett., 125, 1991, s. 223—226.
- Citron M. et al.: Nature, 360, 1992, s. 672—674.
- Corder E.H. et al.: Nature Genet., 7, 1994, s. 180—184.
- Coyle J.T., Puttfarcken P.: Science, 262, 1993, s. 689—695.
- Davies P., Maloney A.J.F.: Lancet, 2, 1976, s. 1403.
- Del Bo R. et al.: Neurosci. Lett., 188, 1995, s. 70—74.
- Dyrks T. et al.: J. Biol. Chem., 267, 1992, s. 18 210—18 217.
- Eikelenboom P. et al.: Trends Pharmacol. Sci., 15, 1994, s. 447—450.
- Esch F.S. et al.: Science, 248, 1990, s. 1122—1124.
- Fasman G.D. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 1995, s. 369—371.
- Ferenčík M., Štvrtinová V.: Klin. Imunol. Alergol., 6, 1996, č. 3, s. 16—22.
- Ferenčík M. et al.: Zápal – horúčka – bolesť. Bratislava, Slovart—G.T.G., Slovak Academic Press 1997.
- Fortoni G. et al.: Nature, 362, 1993 a, s. 543—546.
- Fortoni G. et al.: Neuroreport, 4, 1993 b, s. 523—526.
- Franceschi C. et al.: Immunology Today, 16, 1995, č. 1, s. 12—16.
- Fraser P.E. et al.: J. Neurochem., 59, 1992, s. 1531—1540.
- Frautschy S.A. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 1991, s. 8362—8366.
- Furukawa F. et al.: Nature, 379, 1996, s. 74—78.
- Gabuzda D. et al.: J. Biol. Chem., 269, 1994, s. 13623—13628.
- Games D. et al.: Nature, 373, 1995, s. 523—527.
- Giovanelli L. et al.: Neuroscience, 66, 1995, s. 781—792.
- Glenner G.G., Wong C.W.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 120, 1984, s. 885—890.
- Goate A. et al.: Nature, 349, 1991, s. 704—706.
- Goedert M. et al.: Neuron, 3, 1989 b, s. 519—526.
- Greenberg S.M. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 1994, s. 7104—7108.
- Greenlund L.J.S. et al.: Neuron, 14, 1995, s. 303—315.
- Gregg R.E. et al.: J. Clin. Endocrinol. Metab., 57, 1983, s. 969—974.
- Haass C. et al.: Nature, 359, 1992, s. 322—325.
- Harrington C.R. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 1991, s. 5842—5846.
- Han S.H. et al.: J. Neuropathol. Exp. Neurol., 53, 1994, s. 535—544.
- Han S.H. et al.: Exp. Neurol., 128, 1994 b, s. 13—26.
- Hensley K. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 1994, s. 3270—3274.
- Hayflick L.: Bio/Technology, 9, 1991, s. 823.
- Howlet D.R. et al.: Neurodegeneration, 4, 1995, s. 23—32.
- Huell M. et al.: Acta Neuropathol., 89, 1995, s. 544—551.
- Ignatius M.J. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 1986, s. 1125—1129.
- Iwatsubo T. et al.: Neuron, 13, 1994, s. 45—53.
- Jarret J.T., Lansbury P.T.: Cell, 73, 1993, s. 1055—1058.
- Kane D.J. et al.: Science, 262, 1993, s. 1274—1277.
- Kang J. et al.: Nature, 325, 1987, s. 733—736.
- Kibbey M.C. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 1993, s. 10150—10153.
- Kisilevsky R. et al.: Nature Med., 1, 1995, s. 143—148.
- Kitaguchi N. et al.: Nature, 331, 1988, s. 530—532.
- Koliatsos V.E. et al.: Ann. New York Acad. Sci., 640, 1991, s. 102—109.
- Kovacs D.M. et al.: Nature Med., 2, 1996, s. 224—229.
- Kowall N.W. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 1991, s. 7247—7251.
- Lamb B.T. et al.: Nature Genet., 5, 1993, s. 22—30.
- Levitan D., Greenwald I.: Nature, 377, 1995, s. 351—354.
- Levy E. et al.: Science, 248, 1990, s. 1124—1126.

74. **Levy-Lahad E.** et al.: *Science*, 269, 1995, s. 973–977.
75. **Li J., Ma J., Potter H.:** *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 92, 1995, s. 12180–12184.
76. **Loo D.T.** et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 90, 1993, s. 7951–7955.
77. **Lorenzo A., Yankner B.A.:** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 1994, s. 12 243–12 247.
78. **Lorenzo A.** et al.: *Nature*, 368, 1994, s. 756–760.
79. **Lu Q., Wood J.G.:** *J. Neurosci.*, 13, 1993, s. 508–515.
80. **Luo L.** et al.: *Neuron*, 9, 1992, s. 595–605.
81. **Ma J.** et al.: *Nature*, 372, 1994, s. 92–94.
82. **Maggio J.E.** et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 1992, s. 5462–5466.
83. **Mahley R.W.:** *Science*, 240, 1988, s. 622–630.
84. **Mandelkow E.M.** et al.: *TIBS*, 18, 1993, s. 480–483.
85. **Mann D.M.A., Esiri M.M.:** *J. Neurol. Sci.*, 89, 1989, s. 169–179.
86. **Mantyh P.W.** et al.: *J. Neurochem.*, 61, 1993, s. 1171–1174.
87. **Martin L.J.** et al.: *Amer. J. Pathol.*, 145, 1994, s. 1358–1381.
88. **Masters C.L.** et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 1985, s. 4245–4249.
89. **Mattson M.P.** et al.: *Neuron*, 10, 1993 a, s. 243–254.
90. **Mattson M.P.** et al.: *Brain Res.*, 621, 1993 b, s. 35–49.
91. **May P.C.** et al.: *Neurobiol. Aging*, 13, 1992, s. 605–607.
92. **May P.C.** et al.: *J. Neurochem.*, 61, 1993, s. 2330–2333.
93. **McGeer P.L.** et al.: *Alzheimer Dis. Ass. Disord.*, 8, 1994, s. 149–158.
94. **Mecocci P.** et al.: *Ann. Neurol.*, 36, 1994, s. 747–750.
95. **Meda L.** et al.: *Nature*, 374, 1995, s. 647–650.
96. **Milward E. A.** et al.: *Neuron*, 9, 1992, s. 129–137.
97. **Moran P.M.** et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 1995, s. 5341–5345.
98. **Morgan B.P., Gasque P.:** *Immunol Today*, 17, 1996, s. 461–465.
99. **Morris J.C.** et al.: *Neurology*, 41, 1991, s. 469–478.
100. **Mucke L.** et al.: *Brain Res.*, 666, 1994, s. 151–167.
101. **Mucke L.** et al.: *J. Exp. Med.*, 181, 1992, s. 1551–1556.
102. **Mukateova-Ladinska E.B.** et al.: *Dementia*, 3, 1992, s. 61–69.
103. **Mukateova-Ladinska E.B.** et al.: *Amer. J. Pathol.*, 143, 1993, č. 2, s. 565–578.
104. **Muller U.** et al.: *Cell*, 79, 1994, s. 755–765.
105. **Namba Y.** et al.: *Brain Res.*, 541, 1991, s. 163–166.
106. **Näslund J.** et al.: *Neuron*, 15, 1995, s. 219–228.
107. **Nelson P.T.** et al.: *Neurosci. Lett.*, 170, 1994, s. 187–190.
108. **Neve R.L.** et al.: *Mol. Brain. Res.*, 1, 1986, s. 271–280.
109. **Nishimoto I.** et al.: *Nature*, 362, 1993, s. 75–79.
110. **Novák M.:** *Acta Virol.*, 38, 1994, s. 173–189.
111. **Novák M.** et al.: *EMBO J.*, 12, 1993, s. 365–370.
112. **Novák M.** et al.: *Neurobiol. Aging*, 15, 1994, s. 21.
113. **Novák M.** et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 1991, s. 5837–5841.
114. **Novák M.** et al.: *Prog. Clin. Biol. Res.*, 317, 1989, s. 755–761.
115. **Patterson P.H.:** *Curr. Opin. Neurobiol.*, 5, 1995, s. 642–646.
116. **Pike C.J.** et al.: *Brain Res.*, 563, 1991, s. 311–314.
117. **Pike C.J.** et al.: *J. Neurosci.*, 13, 1993, s. 1676–1687.
118. **Podlisy M.B.** et al.: *Amer. J. Pathol.*, 142, 1993, s. 17–24.
119. **Podlisy M.B.** et al.: *J. Biol. Chem.*, 1995, s. 9564–9570.
120. **Poirier J.:** *Trends Neurosci.*, 17, 1994, s. 525–530.
121. **Pollack S.J.** et al.: *Neurosci. Lett.*, 184, 1995, s. 113–116.
122. **Polvikoski T.** et al.: *New Engl. J. Med.*, 333, 1995, s. 1242–1247.
123. **Ponte P.** et al.: *Nature*, 331, 1988, s. 525–527.
124. **Quon D.** et al.: *Nature*, 352, 1991, s. 239–241.
125. **Rebeck G.W.** et al.: *Neuron*, 11, 1993, s. 575–580.
126. **Rogaev E.I.** et al.: *Nature*, 376, 1995, s. 775–778.
127. **Rogers J.** et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 1992, s. 10 016–10 020.
128. **Roher A.E.** et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 174, 1991, s. 572–579.
129. **Roher A.E.** et al.: *J. Biol. Chem.*, 268, 1993, s. 3072–3083.
130. **Royston M.C.** et al.: *Neuroreport*, 5, 1994, s. 2583–2585.
131. **Rubén G.C.** et al.: *Brain Res.*, 675, 1995, s. 1–12.
132. **Saitoh T.** et al.: *Cell*, 58, 1989, s. 615–622.
133. **Sanan D.A.** et al.: *J. Clin. Invest.*, 94, 1994, s. 880–889.
134. **Schellenberg G.D.** et al.: *Science*, 258, 1992, s. 668–671.
135. **Schubert D., Behl C.:** *Brain Res.*, 629, 1993, s. 275–282.
136. **Schubert D.** et al.: *Neuron*, 3, 1989, s. 689–694.
137. **Schweers O.** et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 1995, s. 8463–8467.
138. **Selkoe D.J.:** *Ann. Rev. Cell Biol.*, 10, 1994, s. 373–403.
139. **Selkoe D.J.:** *Ann. Rev. Neurosci.*, 17, 1994, s. 489–517.
140. **Seubert P.** et al.: *Nature*, 359, 1992, s. 325–327.
141. **Sherrington R.** et al.: *Nature*, 375, 1995, s. 754–760.
142. **Shoji M.** et al.: *Science*, 258, 1992, s. 126–129.
143. **Sisodia S.S.** et al.: *Science*, 248, 1990, s. 492–495.
144. **Slunt H.H.** et al.: *J. Biol. Chem.*, 269, 1994, s. 2637–2644.
145. **Smith C.D.** et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 1991, s. 10 540–10 543.
146. **Smith M.A.** et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 1994, s. 5710–5714.
147. **Smith M.A.** et al.: *J. Neurochem.*, 64, 1995, s. 2660–2666.
148. **Snow A.D.** et al.: *Neuron*, 12, 1994, s. 219–234.
149. **St George-Hyslop P.** et al.: *Nature Genet.*, 2, 1992, s. 330–334.
150. **Strittmatter W.J.** et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 1993 a, s. 1977–1981.
151. **Strittmatter W.J.** et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 1993b, s. 8098–8102.
152. **Subbarao K.V.** et al.: *J. Neurochem.*, 55, 1990, s. 342–345.
153. **Suzuki N.** et al.: *Science*, 264, 1994, s. 1336–1340.
154. **Tanzi R.E.** et al.: *Nature*, 331, 1988, s. 528–530.
155. **Terry R.D.** et al.: *Ann. Neurol.*, 30, 1991, s. 572–580.
156. **Thinakaran G.** et al.: *J. Neurosci.*, 15, 1995, s. 6314–6326.
157. **Tuszynski M.H.** et al.: *Ann. Neurol.*, 30, 1991, s. 625–636.
158. **Urbányi Z.** et al.: *Europ. J. Pharm.*, 270, 1994, s. 375–378.
159. **Van Nostrand W.E.** et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 1992, s. 2551–2555.
160. **Vitek M.P.** et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 1994, s. 4766–4770.
161. **Vito P.** et al.: *Science*, 271, 1996, s. 521–525.
162. **Wasco W.** et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 1992, s. 10 758–10 762.
163. **Wasco W.** et al.: *Nature Genet.*, 5, 1993, s. 95–100.
164. **Wasco W.** et al.: *Nature Med.*, 1, 1995, s. 848.
165. **Weidemann A.** et al.: *Cell*, 57, 1989, s. 115–126.
166. **Weisgraber K.H.** et al.: *J. Biol. Chem.*, 257, 1982, s. 2518–2521.
167. **Whitehouse P.J.** et al.: *Science*, 215, 1982, s. 1237–1239.
168. **Wischik C.M.** et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 1988, s. 4506–4510.
169. **Wisniewski T., Frangione B.:** *Neurosci. Lett.*, 135, 1992, s. 235–238.
170. **Wisniewski T.** et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 179, 1991, s. 1247–1254.
171. **Wisniewski T.** et al.: *Amer. J. Pathol.*, 145, 1994, s. 1030–1034.
172. **Yamazaki T.** et al.: *Exp. Neurol.*, 51, 1992, s. 281–286.
173. **Yamazaki T.** et al.: *J. Cell Biol.*, 129, 1995, s. 431–442.
174. **Yan S.D.** et al.: *Nature*, 382, 1996, s. 685–700.
175. **Yankner B.A.** et al.: *Science*, 245, 1989, s. 417–429.
176. **Yankner B.A.** et al.: *Science*, 250, 1990 a, s. 279–282.
177. **Yankner B.A.** et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 1990 b, s. 9020–9023.
178. **Zheng H.** et al.: *Cell*, 81, 1995, s. 525–531.