Molekulovo-genetické aspekty Alzheimerovej choroby

Mgr. Katarína Kolejáková

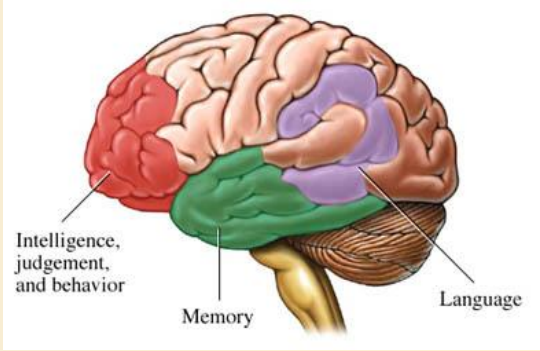
I. Neurologická klinika LF UK a FNsP Bratislava

Centrum lekárskej genetiky FNsP Bratislava

Školiteľ: prof. MUDr. Peter Turčáni, PhD.

Školiteľ špecialista: doc. MUDr. Ján Chandoga, CSc.

Alzheimerova choroba (ACH)



- 1x opísal v roku 1907 Alois Alzheimer
- ireverzibilné, neurodegeneratívne ochorenie
- najčastejšia príčina demencie (50 % – 60 %)
- geneticky heterogénne a multifaktoriálne ochorenie

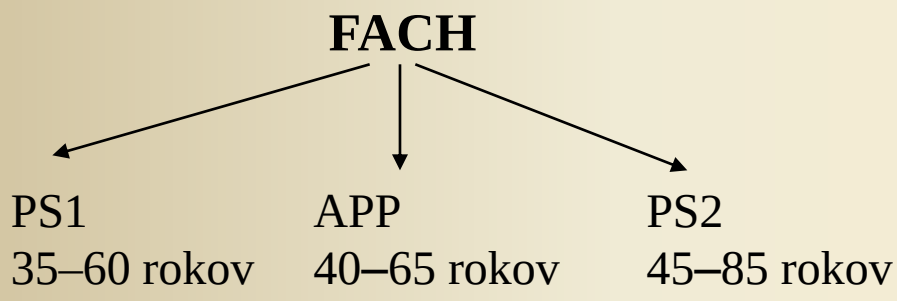
- presenilná forma (do 65) a senilná (po 65)
- familiárna a sporadická forma

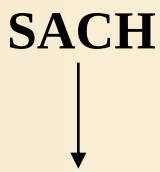
Familiárna forma (FACH) so skorým nástupom

- monogénna forma ACH s autozómovo dominantnou dedičnosťou a vysokou penetranciou
- mutácie v génoch APP, PS1, PS2
- **20 – 70 % mutácie v PS1**
- **10 – 15 % v APP**
- **< 5 % v PS2**

Sporadická forma (SACH)

- vek, faktory prostredia, iné rizikové faktory, gény?
- asociovaná s apolipoproteínom E (APOE), s alelou ε4





Epidemiológia a rizikové faktory

Prevalencia ACH

- **4 % vo veku 65 – 74**
- **20 % vo veku 75– 84**
- **45 % vo veku nad 85**

Rizikové faktory

- **vek**
- **pozitívna rodinná anamnéza**
- **genetické faktory**
- **pohlavie**
- **vzdelanie**
- **faktory životosprávy, metabolické**
- **↓ mentálna a fyzická aktivita**

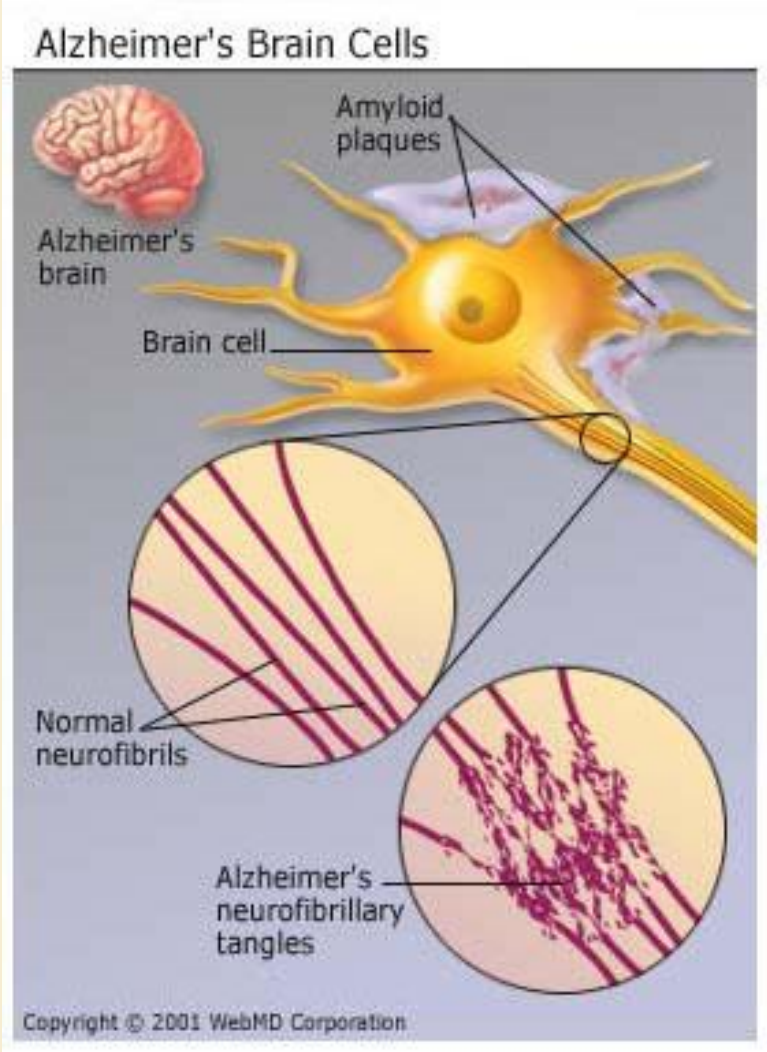
Patogenéza

▪ patologickou abnormalitou je nahromadenie dvoch fibrilárnych proteínov v mozgu

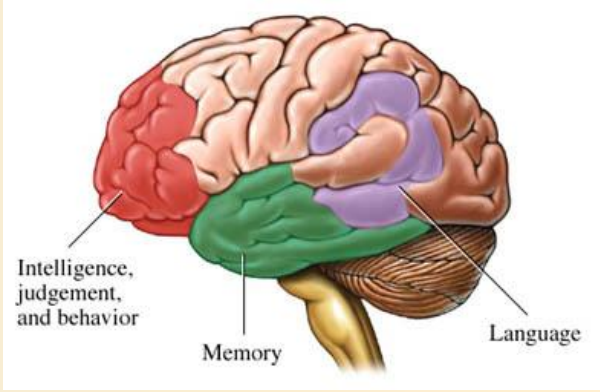
ß-amyloidového peptidu (Aß) a **proteínu tau**

▪ Aß peptid vzniká po úprave amyloidového prekurzorového proteínu a vytvára v extracelulárnych priestoroch mozgu amyloidové a senilné plaky

▪ hyperfosforylovaný tau vytvára v neurónoch mozgu neurofibrilárne splete

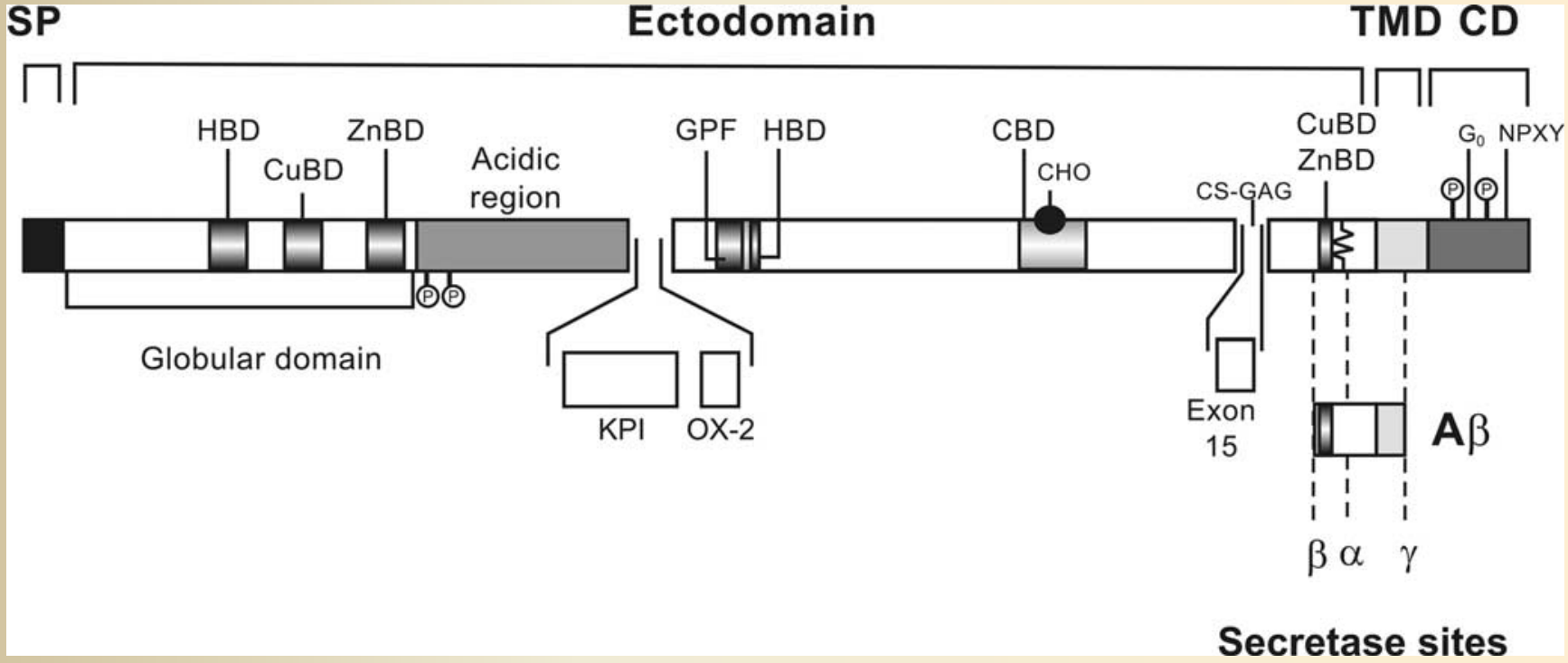


Amyloidový prekurzorový protein (APP)

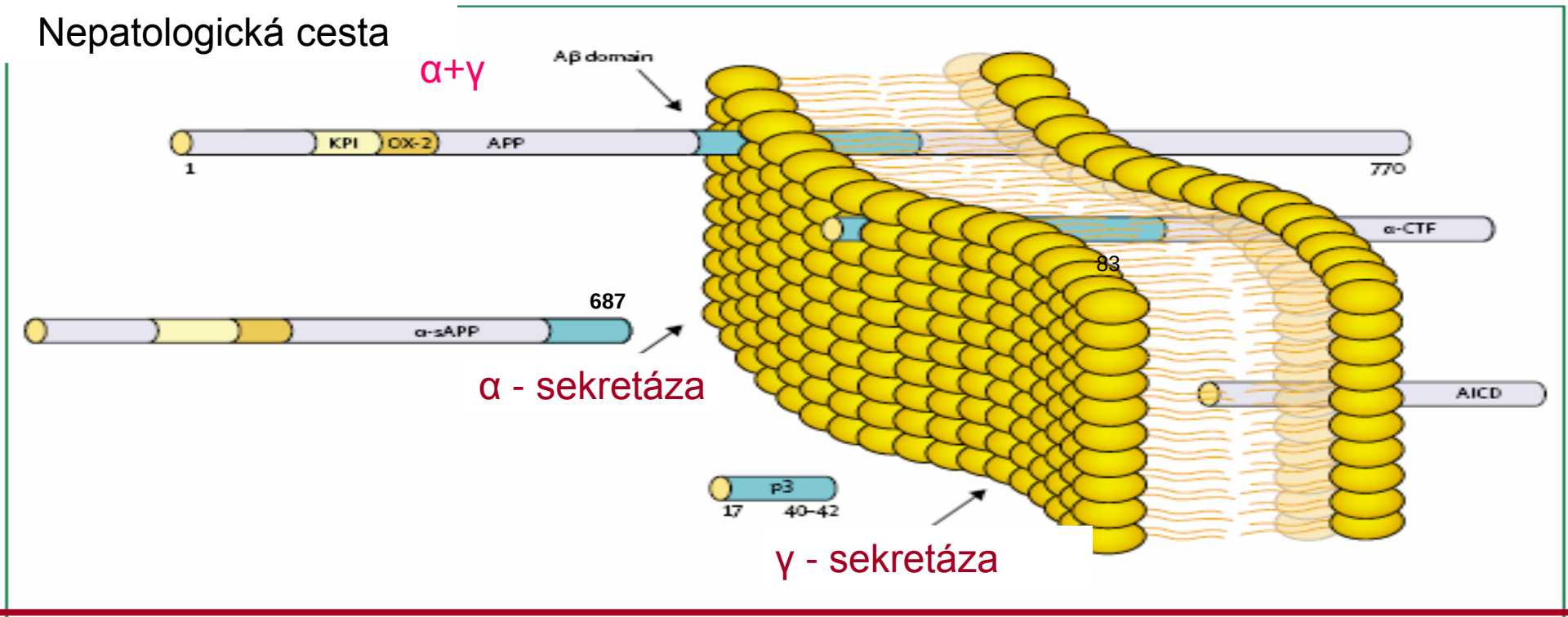


- **APP gén** lokalizovaný na 21. chromozóme (21q21.2-3)
- pacienti s DS: neuropatologické príznaky ACH
- Exprimuje sa v rôznych typoch buniek a tkanív, ako aj v endotele, astrocytoch a neurónoch mozgu
- **APP proteín** zložený zo 563 - 770 amk
- podlieha alternatívnemu zostrihu (exón 7, 8, 15) za tvorby troch hlavných proteínových izomérov: APP_{770}, APP_{751} a APP_{695} (1:10:20 v mozgu)

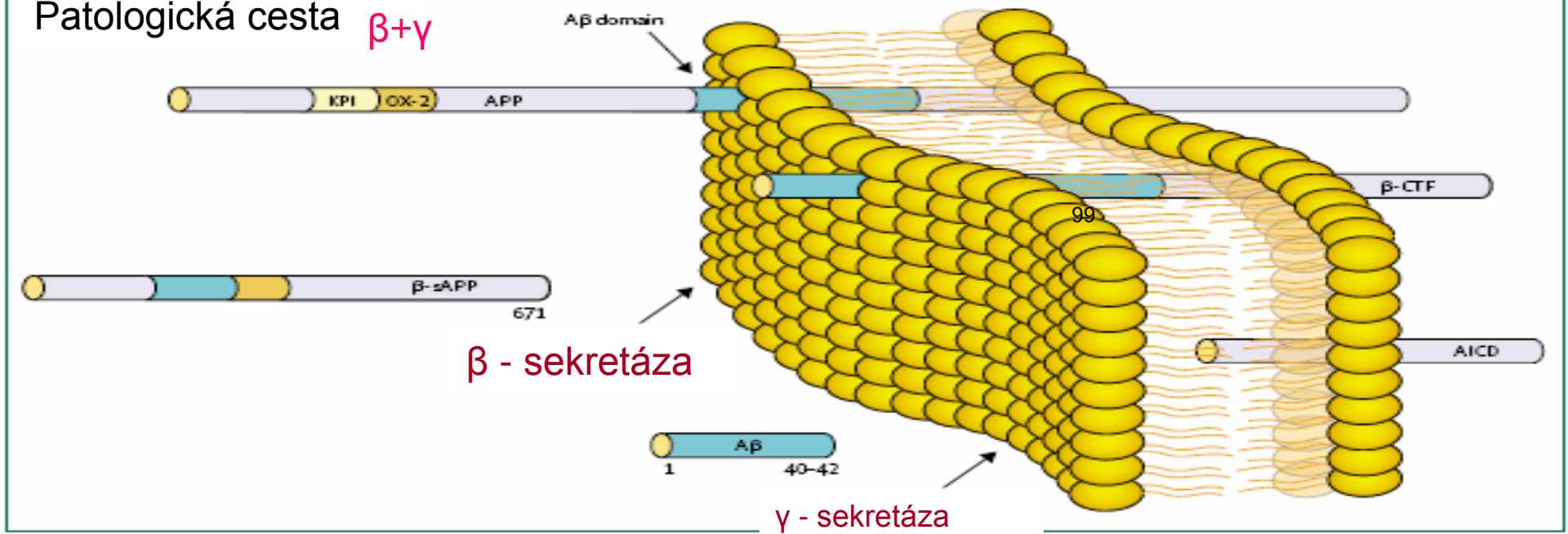
- APP je transmembránový proteín lokalizovaný v endozómoch, lyzozómoch, ER a GA
- zložený z dlhej hydrofilnej aminoterminálnej extracelulárnej domény, hydrofóbnej transmembránovej domény a krátkej karboxyterminálnej domény



Nepatologická cesta

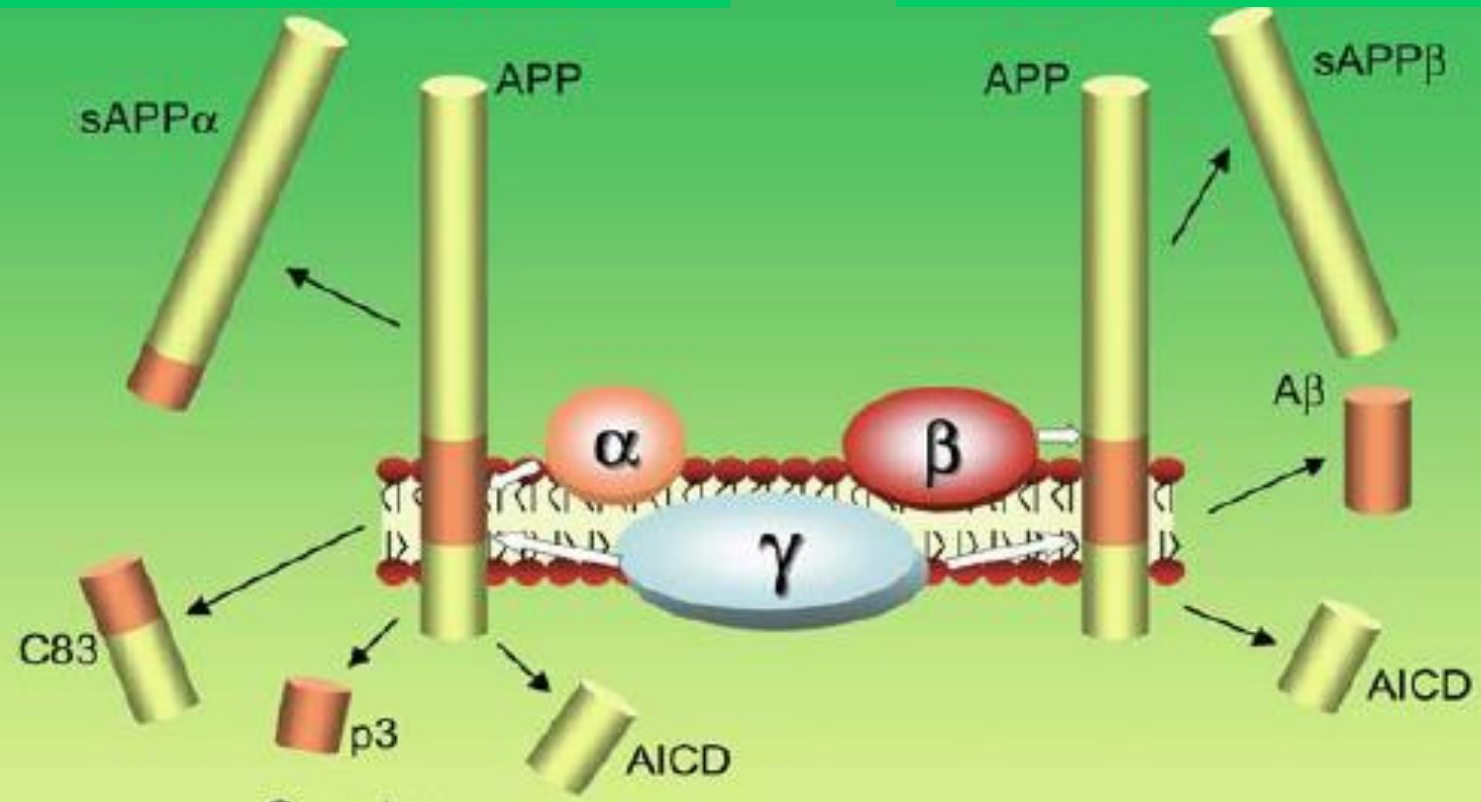


Patologická cesta



Nepatologická cesta

Patologická cesta



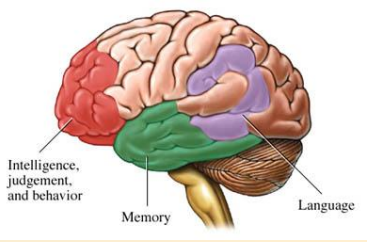
Secretases:

α — Most likely a disintegrin and metalloprotease, ADAM-10 (or -9 or -17)

β — BACE (Asp2, memapsin2), an aspartyl protease

γ — Protein complex of: presenilin, nicastrin, Aph-1 & Pen-2

Funkcia APP: ???

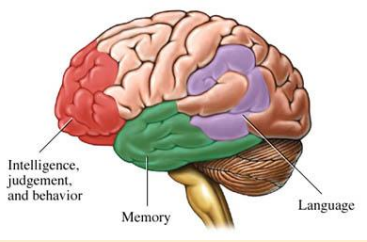


- G-proteínový receptor
- bunková adhézia, proliferácia
- zúčastňuje sa na homeostáze Cu
- signálna transdukcia
- neurotrofná, neuroprotektívna aktivita

Aβ (40-42):

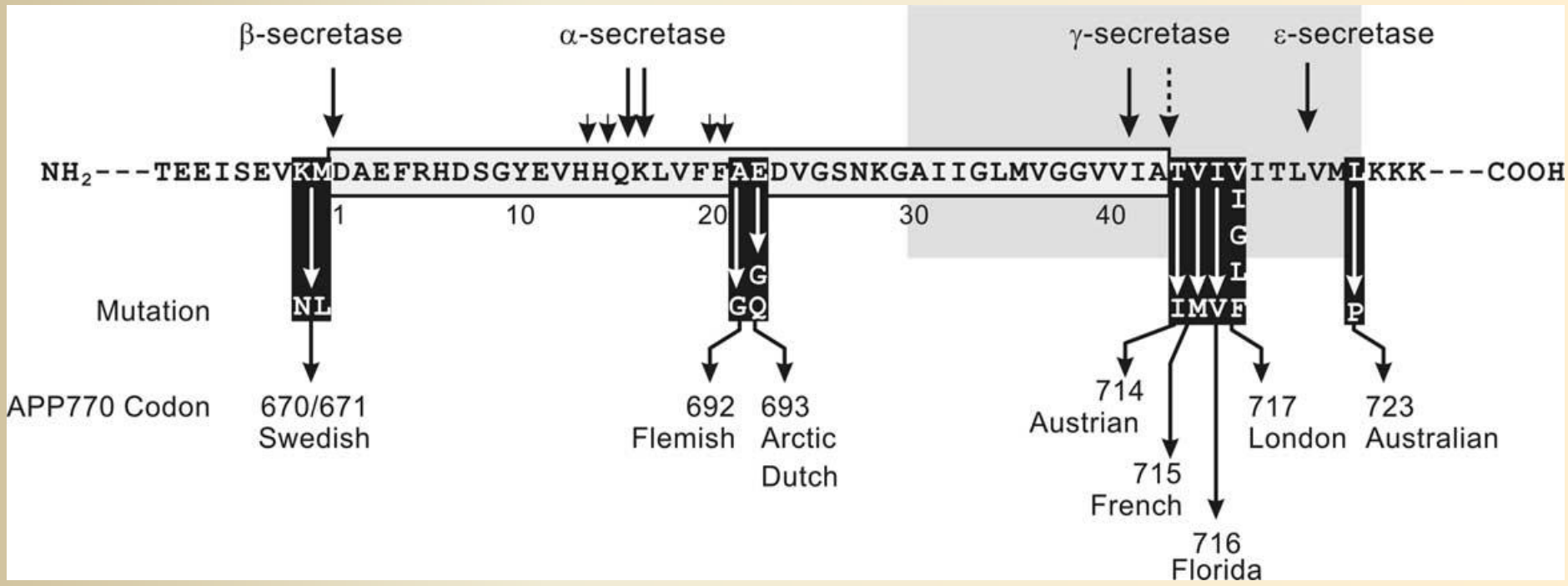
- produkovaný konštitutívne počas normálneho bunkového metabolizmu, je prítomný v malých množstvách ako solubilný monomér cirkulujúci v cerebrospinálnom moku a krvi
- Aβ degradujú: enzým degradujúci inzulín, neprilyzí a enzým konvertujúci endotelín
- mutácie v APP selektívne zvyšujú produkciu Aβ, nastáva nerovnováha medzi produkciou a degradáciou Aβ
- Aβ42 sa pokladá za najviac neurotoxický, fibrilogénny, má tendenciu sa zhlukovať, tvoriť senilné plaky

Mutácie v APP

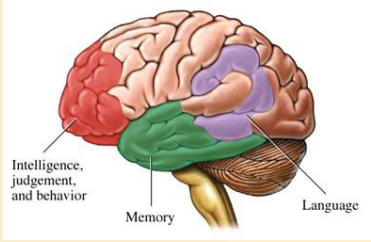


- výskyt v 16. a 17. exóne, missense mutácie (asi 30)

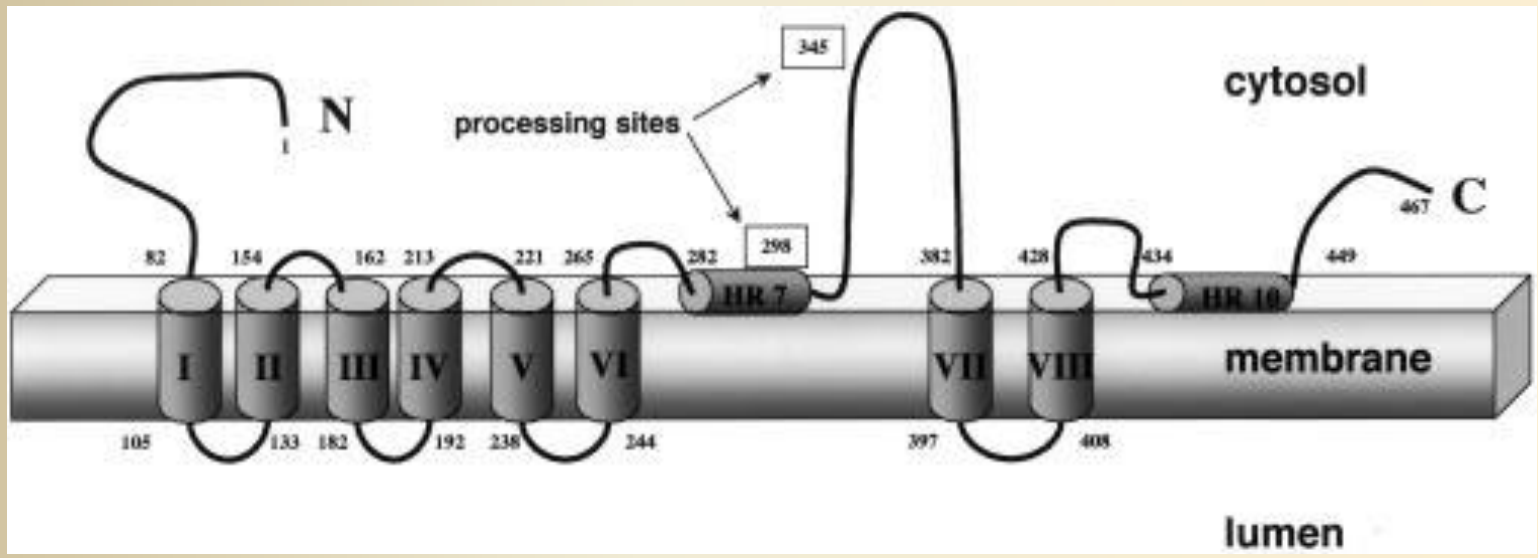
- Londýnska: Val717Ile (e17)
- Floridská: Ile716Val (e17)
- Švédska: Lys670Asn, Met671Leu (e16)
- Flámska: Ala692Gly (e17)
- Holandská: Glu693Gln (e17)



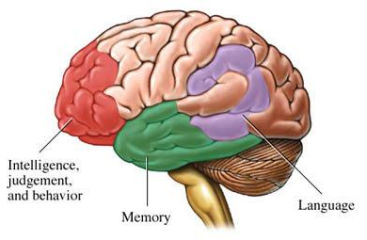
Presenilín 1, Presenilín 2 (PS1, PS2)



- **PS1 gén** lokalizovaný na 14q24.3, **PS2 gén** 1q42.1
- 67% aminokyselinová sekvenčná identita a až 90 % identita v TM doménach
- vysoko evolučne konzervované
- lokalizované v intracelulárnej membráne ER, GA, jadrovej membráne



- výskyt malého množstva holoproteínu → aktívne sa katabolizuje



Tri mechanizmy:

- **proteozóm**
- **fyziologické štiepenie v slučke TM6-7 za tvorby 20 - 35 kDa C- a N-terminálnych fragmentov**
- **kaspázou 3**
- holoproteín a fragmenty sú súčasťou vysokomolekulových multimérnych proteínových komplexov, čo umožňuje vykonávať ich biologickú funkciu

Funkcia:

- **γ-sekretázová aktivita/kofaktor pri γ-sekretázovej aktivite**
- **dva aspargínové zvyšky sú esenciálne pre tvorbu Aβ**
- **vývin a morfogenéza, signálna transdukcia, homeostáza Ca^{2+}**
- **normálna neurónogenéza a tvorba axiálnej kostry**

Substrates

APP
APLP1
APLP2
Notch
Jagged
Delta
ErbB-4
DCC
CD44
CD43
LRP
N-Cadherin
E-Cadherin
γ-protocadherins
Nectin-1α
Syndecan-1
p75
NRADD
Na channel β2-subunit
Tyrosinase
Tyrosinase-related proteins 1 and 2

Cell adhesion

E-Cadherin
N-Cadherin
CD44
α-catenin
β-catenin
δ-catenin
ICAM-5/telencephalin
PBP/MOCA

Other interactors

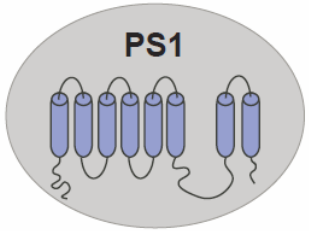
Tau
BACE1
GSK3β
PKA
PSAP
DRAL
TPIP
QM/Jif-1
G-protein
Ubiquilin
PAMP
PAR
LMet1
GFAP splice variant
HC5 and zeta subunits of 20S proteosome
SEL-10 (*C. elegans*)

CD147

γ-secretase

PS1
Nicastrin
PEN-2
APH-1

p23/TMP21



Apoptosis

Bcl-X_L
Bcl-2
FKBP38
PAG
Omi/HtrA2

Calcium homeostasis

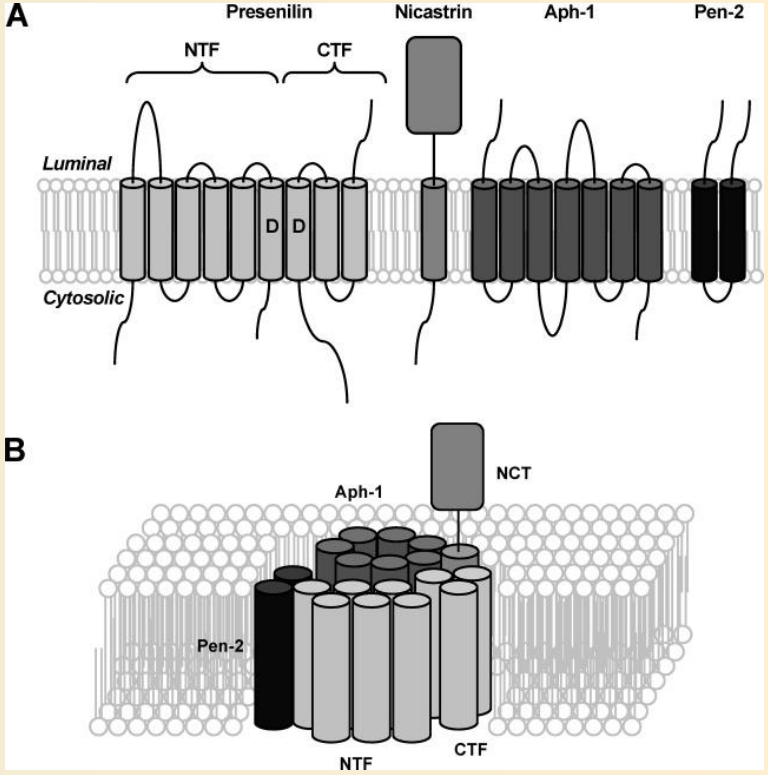
CALP/KChIP4
μ-calpain
Calsenilin
Calmyrin
Sorcin

Transport

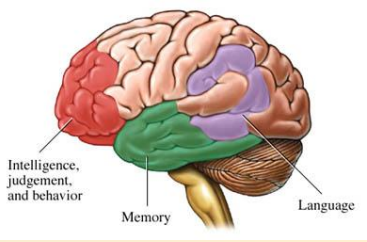
X11α
X11β
Rab6
Rab11
RabGDI
Syntaxin 1A
Syntaxin 5
p23/TMP21
PLD1
CLIP-170
Filamin

Trafficking/localization

APP
ICAM-5/telencephalin
TrkB
Tyrosinase
Caveolin
α-synuclein
β-synuclein
AchR



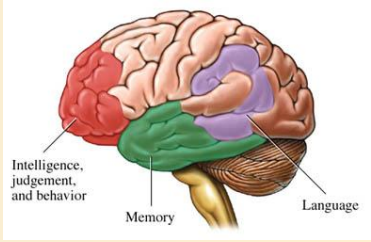
Mutácie v presenilínoch



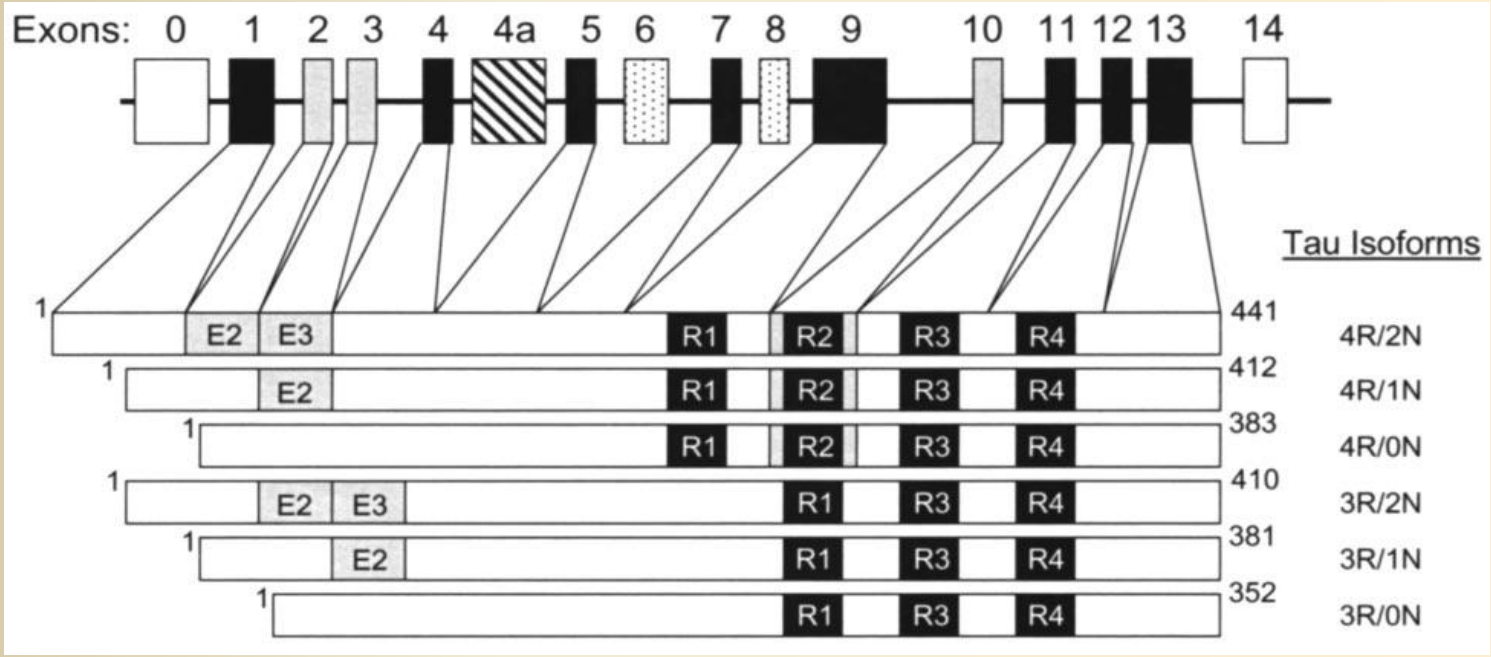
- 165 rôznych mutácií PS1, 11 mutácií v PS2

- mutantný PS1 má vplyv na γ-sekretázový procesing APP a uprednostňuje tvorbu $A\beta_{42}$ (mutácia typu **gain of function**)
- **Loss of function**: nevykonáva svoju fyziologickú funkciu
- PS1 za normálneho proteolytického štiepenia vykazuje antiapoptotický efekt
- mutantný PS1: **apoptosis promoting efekt**

Tau



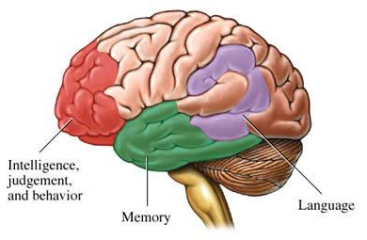
- gén lokalizovaný na chromozóme 17q21-22
- 16 exónov – 3 nie sú prítomné u ľudí (4A, 8, 16)
- exóny 2, 3, 10 sú alternatívne zostrihané a sú špecifické pre dospelý mozog



- **funkcia:** asemblácia mikrotubulov, reguluje stabilitu a orientáciu mikrotubulov v neurónoch, astrocytoch, udržovanie integrity neurónov, axónový transport

- Tau je fosfoproteín, de/fosforylácia sú regulované
- kinázy: Glykogén syntáza kináza 3 (GSK-3), cyklín dependentná kináza 2 (cdk2), cyklín dependentná kináza 5 (cdk5), cAMP dependentná kináza, Ca^{2+}/kalmodulín dependentná kináza, proteín kináza A (PKA), kináza regulujúca afinitu mikrotubulov (MAPK)
- fosfatázy: PP1, 2A, 2B, 2C

Mutácie v Tau

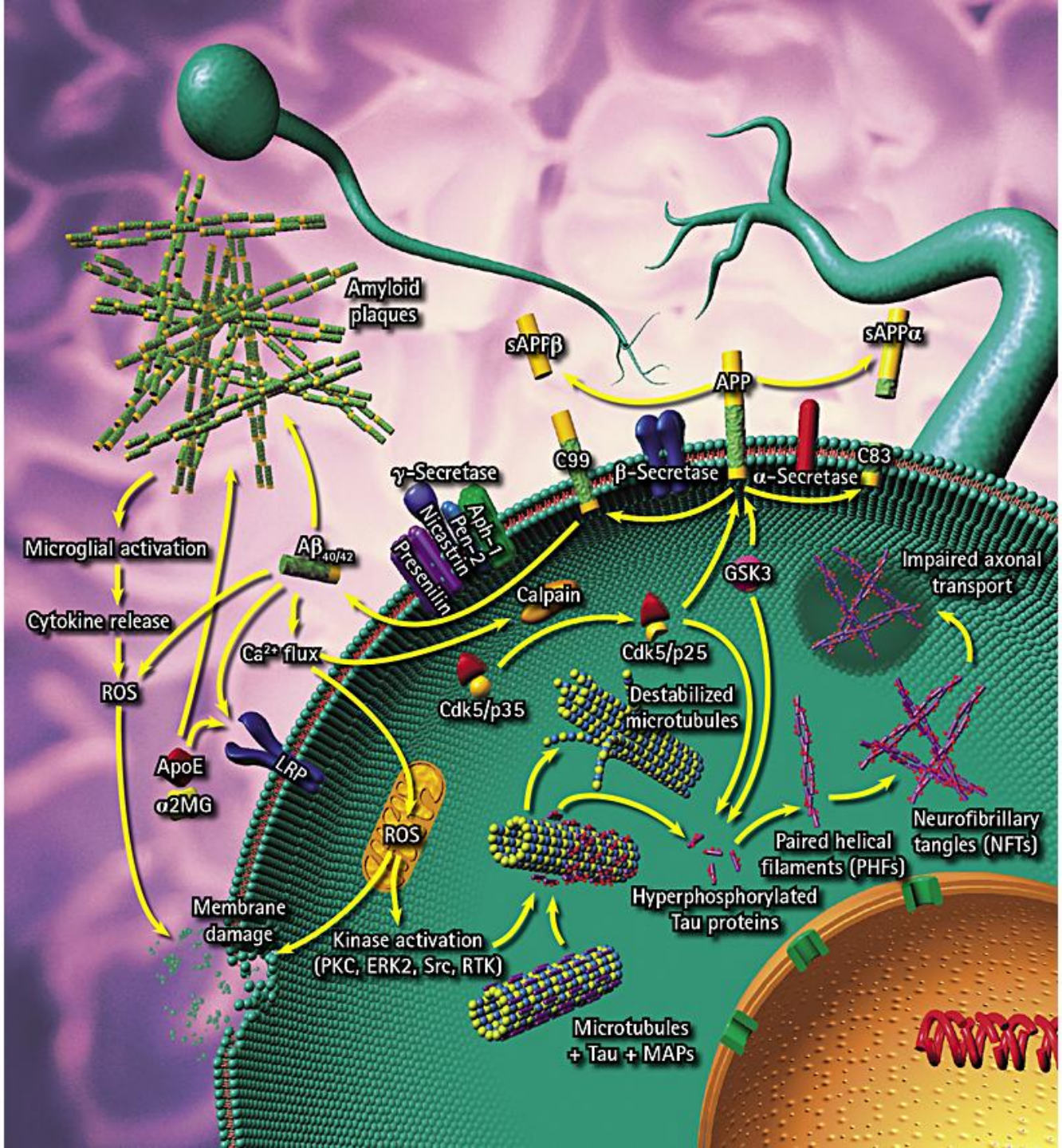


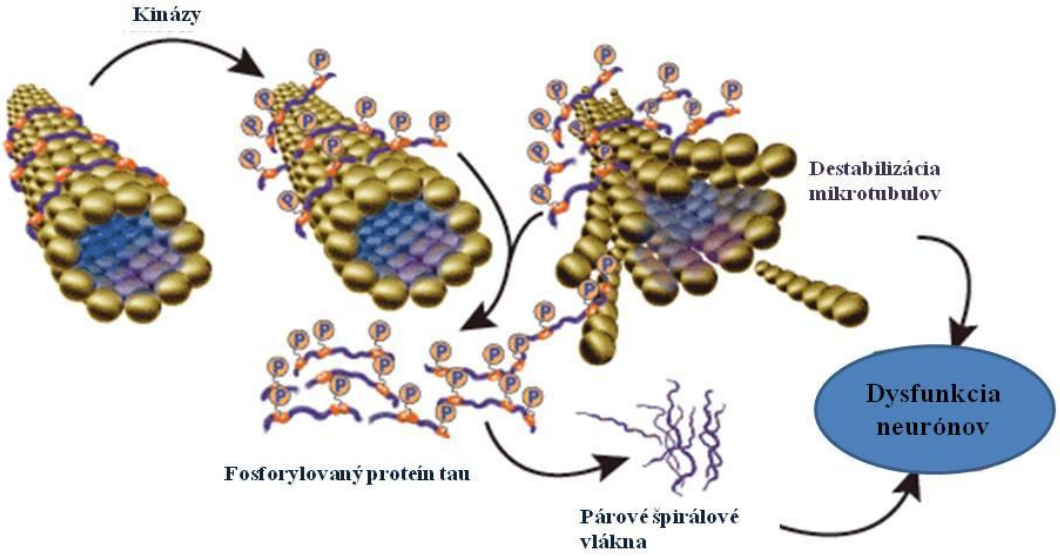
- sú základom autozómovo dominantnej frontotemporálnej demencie

TAU MUTATIONS IN FTDP-17

Mutation	Nucleotide Change	Disease/Syndrome	Location	Domain in Tau Protein
G272V	GGC ±GTC		E9	R1
N279K	AAT ± AAG	PPND	E10	IR1-2
D280K	AAG deletion		E10	IR1-2
L284L	CTT ± CTG		E10	Ir1-2
P301L	CCG ± CTG		E10	R2
S305N	AGT ± AAT		E10	IR2-3
V337M	GTG ± ATG	Settle A	E12	IR3-4
R406W	CGG ± TGG		E13	C-term
E10+3	g ± a	MSTD	I10	5′ splice site
E10+13	c ± t		I10	5′ splice site
E10+14	c ± t	DDPAC	I10	5′ splice site
E10+16	c ± t		I10	5′ splice site

Neurotoxický efekt





B

Normal tau protein

Kinases

Phosphatases

Abnormally hyperphosphorylated tau

Sequestration of tau, MAP1 and MAP2 by hyperphosphorylated tau

Tau polymerisation

Disassembly of microtubules

PHF/tangle formation

Disturbed axonal flow/transport

Ubiquitination

Neuronal/synaptic dysfunction with transmitter deficits

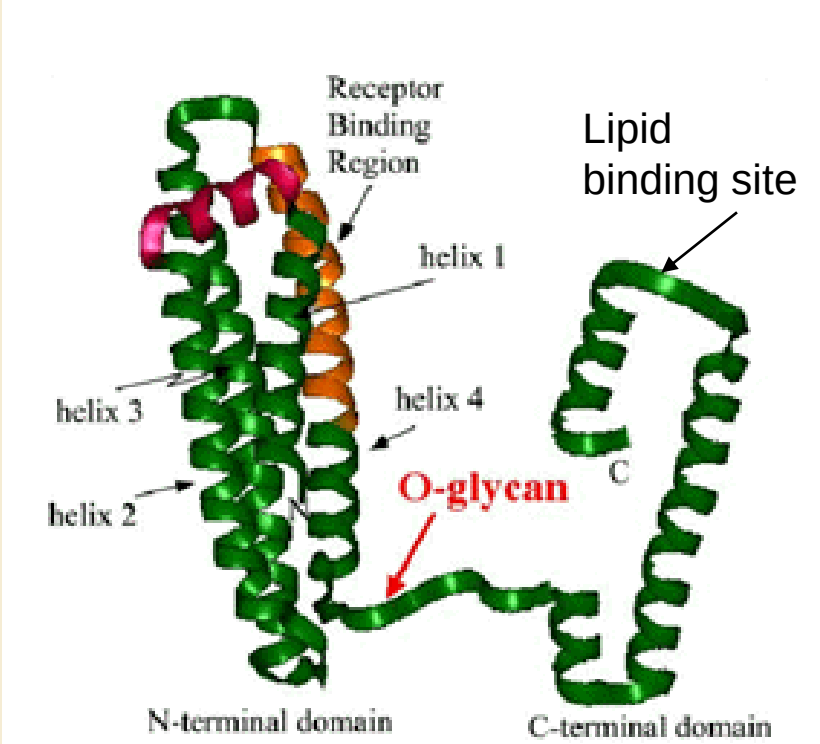
Neuronal death

DEMENTIA

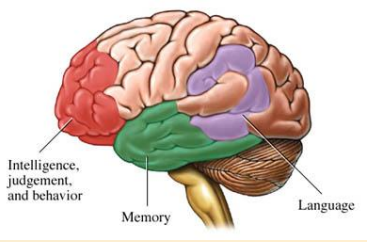
Apolipoproteín E

- gén pre APOE je lokalizovaný na chromozóme 19q13
- APOE je glykoproteín s molekulovou hmotnosťou 34 200

- APOE je zahrnutý do mobilizácie a redistribúcie cholesterolu počas rastu neurónov a po poranení, transport triacylglycerolov, iných lipidov, do regenerácie nervov, imunoregulácie a aktivácie lipolytických enzýmov, je komponent chylomikrónov, VLDL, andioxidatívny efekt

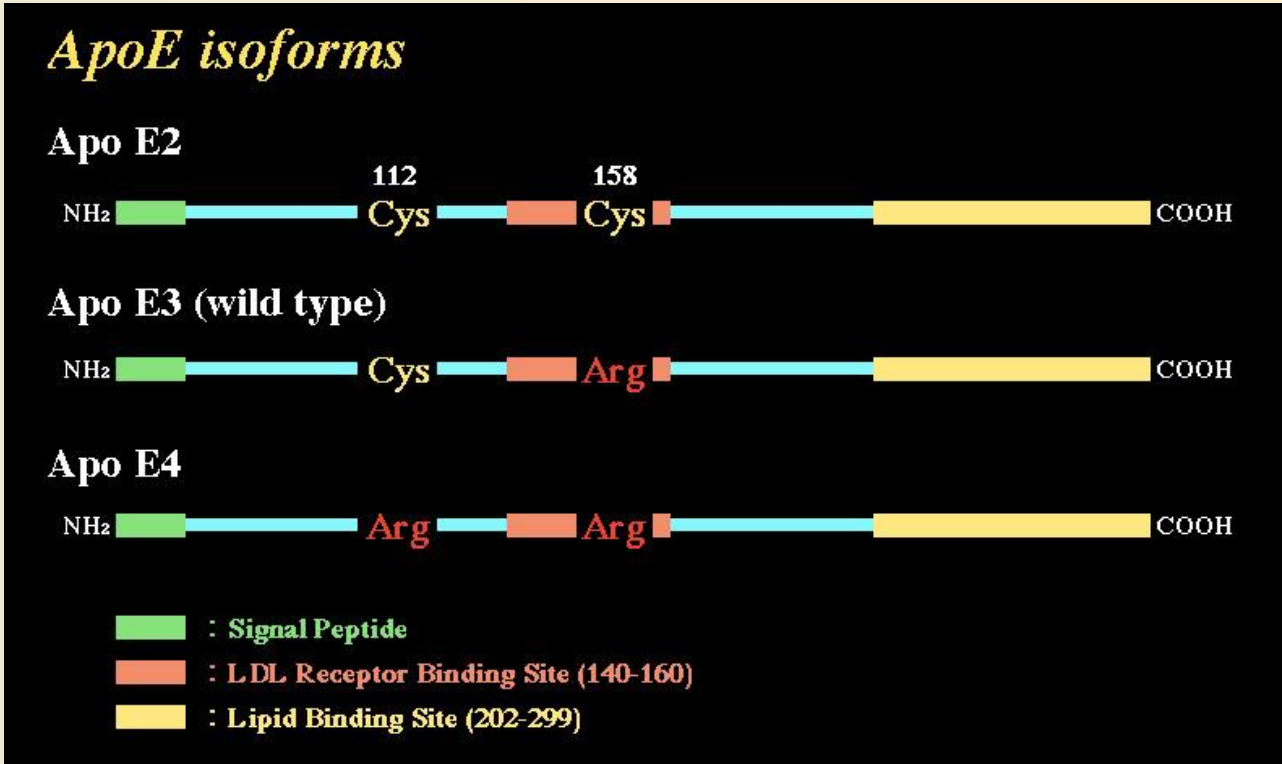


Model of human apolipoprotein E



- APOE sa vyskytuje v troch izoformách (E2, E3, E4)
- exprimované z jedného lokusu s tromi alelami (ε2, ε3, ε4)
- izoformy sa odlišujú v aminokyselinovej sekvencii na dvoch miestach
- najčastejší variant v populácií je alela ε3, s frekvenciou 72 %
- alela ε2 sa vyskytuje s frekvenciou 11 %
- alela ε4 sa vyskytuje s frekvenciou 17 %
- E2: protektívna pred

  ACH



APOE ε4

- genetický rizikový faktor v patogenéze ACH, sporadická forma ACH
- prítomnosť alely APOE ε4 zvyšuje riziko ochorenia 3-násobne u heterozygotov a 15-násobne u homozygotov
- alela APOE ε4 znižuje vek nástupu o 10 rokov
- alela ε4 chýba u 30 – 40 % pacientov s ACH a je prítomná u 30 % zdravých jedincov
- ε4 zrýchľuje tvorbu plakov a narúša reparačné mechanizmy neurónov, urýchľuje ukladanie Aβ a redukuje degradáciu Aβ, porucha cytoskeletu neurónov, neurodegenerácia
- ε4 sa viaže priamo na Aβ, efektívnejšie ako E2, E3
- pacienti ACH s ε4 viac depozitov, neuritických plakov

Ciele a riešenie projektu sú rozdelené do niekoľkých etáp

1. **Zistiť výskyt Alzheimerovej choroby u pacientov s demenciou medzi obyvateľmi domovov dôchodcov v určitých regiónoch Slovenska, spracovať zdravotnú dokumentáciu a identifikovať sporadický a familiárny výskyt.**
2. **Určiť frekvenciu alely ε4 apolipoproteínu E na kontrolnej vzorke zdravých jedincov a v súbore pacientov so sporadickým a familiárnym výskytom Alzheimerovej choroby.**
3. **Štandardizácia molekulovo – genetických metód na detekciu mutácií v génoch *APP, Psen 1, Psen 2, Tau*.**
4. **Identifikácia mutácii v cieľových génoch u pacientov s familiárnym výskytom AD pomocou sekvenčnej analýzy.**
5. **Zistiť zastúpenie mutácií v súbore slovenských pacientov s FAD a porovnať výsledky s údajmi z iných krajín.**
6. **Zhodnotenie asociácie rizikových genetických a environmentálnych faktorov s Alzheimerovou chorobou so sporadickým a familiárnym výskytom.**

Materiál a metódy

Molekulárno-genetická diagnostika:

- **PCR amplifikácia jednotlivých exónov kandidátnych génov** pre ACH: APP(e16, e17), PS1 (12exónov), PS2 (12 exónov), TAU (e9, e10, e11) u pacientov s podozrením na FACH

- **Sekvenčné analýzy** na identifikáciu mutácií v kandidátnych génoch

- Restrikčná analýza ApoE

Ďakujem