

Univerzita Pardubice

Fakulta Chemicko-technologická

Tau-protein v patogenezi Alzheimerovy choroby

Kristýna Votočková

Bakalářská práce

2018

University of Pardubice

Faculty of Chemical Technology

Tau-protein in the pathogenesis of Alzheimer's disease

Kristýna Votočková

Bachelor work

2018

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Kristýna Votočková**
Osobní číslo: **C15299**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**
Název tématu: **Tau protein v patogenezi Alzheimerovy choroby**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Vypracovat teoretickou rešerši týkající se role tau proteinu v patogenezi Alzheimerovy choroby.
2. V úvodu krátce popsat charakteristiku Alzheimerovy choroby.
3. V další části se zaměřit na strukturu a funkce tau proteinu, jeho buněčnou lokalizaci a posttranslační modifikace.
4. V poslední části popsat souvislosti tau proteinu s rozvojem Alzheimerovy choroby.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Katarína Vorčáková, Ph.D.

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **27. listopadu 2017**

Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Cegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2018

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 24. 6. 2018

Kristýna Votočková

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych ráda poděkovala Mgr. Kataríně Vorčákové, Ph.D. a Mgr. Šárce Štěpánkové, Ph.D za odborný dohled, cenné rady a především za vstřícnost a trpělivost, které mi pomohly práci napsat.

ANOTACE

Bakalářská práce se věnuje z menší části Alzheimerově chorobě jako takové, více potom tau proteinu, okrajově fyziologickému významu, ale především jeho roli v patogenezi Alzheimerovy choroby. Práce je zaměřena jak na způsoby stanovení, tak i léčbu choroby s využitím tau-proteinu jako diagnostického markeru.

KLÍČOVÁ SLOVA

Alzheimerova choroba, tau-protein, demence, mozek

TITLE

Tau-protein in the pathogenesis of Alzheimer's disease

ANNOTATION

A smaller part of this bachelor work is about Alzheimer's disease, mainly about tau-protein, its physiological importance and especially its role in pathogenesis of Alzheimer's disease. The work focuses on methods of determination and treatment using tau-protein as a diagnostic marker.

KEYWORDS

Alzheimer's disease, tau-protein, dementia, brain

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Stavba mozku	17
Obrázek 2 Stavba neuronu	18
Obrázek 3 Synapse.....	18
Obrázek 4 Přehled oblastí tau-proteinu.....	23
Obrázek 5 Isoformy tau-proteinu.....	23

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Normy vyšetřovaných proteinů.....	27
Tabulka 2 Hodnocení ACH.....	28

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ACH	Alzheimerova choroba
ADRDA	asociace pro Alzheimerovu chorobu a příbuzné choroby (Alzheimer's Disease and Related Disorders Association)
CNS	centrální nervová soustava
CSF	mozkomíšní mok (Cerebrospinal Fluid)
EFNS	evropská organizace neurologických společností (European Federation of Neurological Societies)
ELISA	enzymatická imunosorbentní metoda (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
IDP	protein s vnitřní poruchou (Intrinsically Disorder Protein)
LMTB	leukomethylthionin dihydro-bromid
LMTM	leukomethylthionin bis(hydromethansulfonát)
MAP	proteiny přidružené k mikrotubulům (Microtubule Associated Proteins)
MCI	mírná kognitivní porucha (Mild Cognitive Impairment)
NFT	neurofibrilární spleti (Neurofibrillary Tangles)
NINCDS	národní institut neurologických a komunikačních poruch a mrtvice (National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke)
OGA	O-vázaná N-acetyl-beta-D-glukosaminidasa (O-linked N-acetyl-beta-D-glucosaminidase)
O-GlcNAcylyase	O-vázaná N-acetylglukosaminylyase (O-linked N-acetylglucosaminylation)
OGT	O-vázaná N-acetylglukosaminyltransferáza (O-linked N-acetylglucosaminyltransferase)
PAGE	gelová elektroforéza na polyakrylamidovém gelu (Polyacrylamid Gel Electrophoresis)
PHF	vlákna dvojšroubovice (Paired Helical Filaments)
PNS	periferní nervová soustava
PP2A	proteinová fosfatasa 2A (Protein Phosphatase 2A)
SDS	dodecylsulfát sodný (Sodium Dodecyl Sulfate)
US FDA	úřad pro kontrolu potravin a léků ve Spojených státech (Food and Drugs Administration of United States)

OBSAH

ÚVOD	12
1 HISTORIE	13
1.1 Demence	13
1.2 Alzheimerova choroba	13
2 MOZEK	15
2.1 Neuron	17
3 ALZHEIMEROVA CHOROBA	19
3.1 Charakteristika	19
3.2 Rizikové faktory	19
3.3 Příznaky	19
3.4 Diagnóza	20
3.5 Terapie	20
3.5.1 Biologická léčba	21
3.5.2 Nebiologická léčba	21
4 TAU-PROTEIN	22
4.1 Struktura a funkce	22
4.2 Post-translační modifikace	24
4.2.1 O-glykace	24
4.2.2 Fosforylace	24
4.3 Neuropatologie	25
4.3.1 Hyperfosforylace	25
4.3.2 Neurofibrilární spleti	26
5 DIAGNOSTIKA	27
5.1 Specifita a citlivost Tau-proteinu	29
5.2 Předanalytické faktory	29
5.3 Imunochemie	30

5.3.1	Protilátky	30
5.3.2	Metody stanovení	31
5.4	Neimunochemické metody stanovení	32
5.4.1	Elektroforetické metody	32
5.4.2	Kryoelektronová mikroskopie	33
5.4.3	Afinitní chromatografie	34
6	LÉČBA ALZHEIMEROVY CHOROBY	35
6.1	Imunoterapie	35
6.2	Stabilizace mikrotubulů	38
6.3	Zábrana beta-N-acetylglukosaminylace	38
6.4	Zábrana agregace tau-proteinu.....	39
7	ZÁVĚR.....	41
8	ZDROJE	42

ÚVOD

Demence je klinické neurodegenerativní onemocnění, které se projevuje zhoršením intelektuálních funkcí jako je paměť, řeč, orientace, schopnost úsudku a rozhodování nebo udržování pozornosti. Vyskytuje se především u lidí staršího věku, nezávisle na pohlaví. V současné době stárne světová populace velmi rychle, což je spojeno se zvyšujícím se počtem lidí trpících demencí [1].

Nejčastější příčinou demence je Alzheimerova choroba (ACH), onemocnění mozku, při kterém dochází nejen k odumírání nervových buněk nesoucích zodpovědnost za výše zmíněné kognitivní funkce, ale i ke ztrátě neuronů v jiných částech mozku. Přestože se problematikou léčby této choroby zabývá dnes celý svět, dosud nebyl nalezen způsob, jak ji vyléčit. Cílem léčby je zachycení již raných stádií nemoci a zamezení jejího rozšíření [2].

Tau-protein je mikrotubuly-vázající bílkovina lokalizovaná především v axonech, jenž má v mozku fyziologickou funkci, a to stabilizaci cytoskeletu neuronů. Při rozpadu nervových buněk se ve zvýšené míře uvolňuje do likvoru a je tak známkou neurodegenerativních onemocnění. Se zvyšující se mírou fosforylace tau-proteinu se snižuje jeho afinita k mikrotubulům a při hyperfosforylaci se stává neurotoxickým. Obě tyto formy tau-proteinu (spolu s beta-amyloidem) jsou důležitými markery při diagnostice Alzheimerovy choroby a jejího odlišení od jiných degenerativních onemocnění [3,4].

Ve své práci se okrajově věnuji ACH a její historii, konkrétněji pak tau-proteinu jak za fyziologických podmínek, tak jeho patogenezi u této choroby, diagnostice a léčbě se zaměřením na tento marker.

1 HISTORIE

1.1 Demence

Pojem demence byl poprvé formulován již ve starověkém Římě. Vychází z latinské předpony *de*, kterou se značí zápor a slova *mens* neboli mysl. V řecko-římském období byla demence popisována jako duševní poruchy ve stáří, ke kterým docházelo v důsledku primárního nebo sekundárního poškození mozku. Následující staletí se zájem o výzkum tohoto syndromu snížil, protože měla přednost jiná onemocnění, např. smrtelné epidemie ve středověku [5].

V průběhu 18. století byla demence brána jako získané intelektuální onemocnění nezávisle na věku, tedy každý člověk s vážnějším poraněním hlavy mohl být označen za člověka s demencí. Ke konci tohoto století francouzský lékař Philippe Pinel poprvé definoval demenci podrobněji a rozlišil ji od jiných skupin duševních poruch, jako jsou melancholie, mánie a mentální retardace. Na něj navázal jeho student Jean Etienne Esquirol, který rozdělil demenci do tří kategorií: akutní, chronická a senilní. Senilní demenci potom popsal jako „mozkovou chorobu charakterizovanou poruchou citlivosti, inteligence a vůle“. Navíc odlišil syndrom demence od amence či idiotství [5,6].

1.2 Alzheimerova choroba

Alois Alzheimer byl německý neuropatolog a psychiatr žijící v letech 1864-1915. Jeho nejvýznamnějším případem byla paní Auguste Deter, která byla hospitalizována ve Frankfurtu na základě jejích dlouhodobých problémů se špatnou pamětí, slabostí, nespavostí a mánií. Alzheimer posoudil její stav a stanovil diagnózu jako „arteriosklerotickou mozkovou atrofii“. O pár let později po její smrti prozkoumal Alzheimer podrobně její mozek a popsal histologické změny jako přítomnost amyloidových plaků a neurofibrilárních spletek (NFT) a celkový úbytek neuronů. Tyto vlastnosti jsou dnes běžně spojovány s Alzheimerovou chorobou [5,7].

Termín Alzheimerova choroba však poprvé použil až Alzheimerův kolega Emil Kraepelin, kterému se podařilo odlišit jí od běžné senilní demence. V knize *Handbook of Psychiatry* uvedl, že na rozdíl od té se ACH vyskytuje již po 40. roku života [5].

Od objevu Aloise Alzheimerera v roce 1906 byla potvrzena přítomnost amyloidových plaků a NFT u ACH několika výzkumy a dnes se již berou jako hlavní ukazatele tohoto onemocnění. V druhé polovině 20. století bylo zjištěno, že tyto NFT jsou tvořeny vlákny dvojšroubovice, tzv. PHF (paired helical filaments) a o více jak dvacet let později byl díky imunochemii nalezen protein tau jakožto jejich hlavní složka. Ještě tentýž rok se ukázalo, že v případě ACH dochází k hyperfosforylaci tau proteinu, která je často označována jako taupatologie [8].

Přestože se vědci zabývají tau-proteinem již několik desítek let, podařilo se teprve v roce 2017 poprvé zobrazit atomovou strukturu tau-proteinu v lidském mozku, a to díky kryo-elektronovému mikroskopu, který je schopný nahlížet do nitra buněk. Tento objev znamená velký krok dopředu ve vývinu léčiv pro léčbu ACH, ale i jiných neurodegenerativních onemocnění [9].

2 MOZEK

Mozek neboli *encefalon*, tvoří spolu s míchou centrální nervovou soustavu (CNS), která za pomoci periferní nervové soustavy (PNS) řídí fungování celého těla. Je to měkký orgán oválného tvaru a šedé barvy. Nachází se v dutině lebeční, kde je obklopen tekutinou zvanou likvor. Tak je chráněn před otřesy, nárazy a jiným mechanickým poškozením. Jeho velikost i hmotnost závisí na mnoha faktorech, především na pohlaví a věku, průměrná váha lidského mozku je 1300–1400 gramů a jeho objem činí asi 1500 m³ [10-12].

Z hlediska evoluce se lidský mozek dá považovat za vrchol. Základem pro jeho vývin je neuroektoderm strunatců neboli nervová ploténka. Oproti primátům, mají lidé mozek několikanásobně větší k poměru těla [13].

Výše zmíněný likvor je známý také jako mozkomíšní mok (CSF). Jedná se o bezbarvou, průhlednou tekutinu tvořenou v postranních komorách, ze kterých potom cirkuluje do dalších částí mozku. Jeho celkový objem v mozku je asi 120 ml, přičemž se tvoří kontinuálně a je obměněn každé čtyři hodiny. Za běžných fyziologických podmínek obsahuje CSF buňky jako lymfocyty, monocyty a mohou být přítomny i pláсты arachnoideálních buněk. Množství proteinů je oproti plazmě nízké, a to v rozmezí 400 g/l v lumbální části až 100 g/l v obou komorách. Stejně tak je zde nižší koncentrace vápníku, lipidů a cukrů, chloridové a hořečnaté ionty jsou naopak vyšší. Hodnota pH CSF se pohybuje okolo 7,33 a je stabilní i v případě, že dochází k výkyvům u pH plazmy. Tlak CSF není stálý – vsedě je jeho hodnota dvojnásobná oproti tlaku vleže, čehož se využívá při lumbální punkci. Funkcí CSF je ochraňovat mozek před mechanickým poškozením a pomoci stabilizovat nervové struktury. Navíc má transportní a vylučovací funkci. Ve studiích o ACH je velmi důležitý, protože se z něho získává celý diagnostický triplet celkového a fosforylovaného tau-proteinu a beta-amyloidu [14,15].

Samotný lidský mozek se skládá z několika částí. Největší z nich je velký nebo také koncový mozek (*telencefalon*). Je tvořen dvěma polovinami: pravou a levou hemisférou, které jsou odděleny zářezem a spojeny bílou hmotou. Obě hemisféry se liší svými funkcemi [12,16].

Povrch hemisfér pokrývá mozková kůra (*cerebral cortex*), tvořená shluky neuronů velkých cca 2-4 mm. Většinu zaujímá šedá kůra mozková (*neocortex*), jež je členěna na čtyři laloky: frontální, temporální, parietální a okcipitální. Jejich hranice

můžeme rozlišit pomocí tzv. gyrů, tedy závitů, které vznikly ohýbáním kůry během vývoje a díky nimž se zvyšuje její plocha. Jednotlivé gyry jsou pak odděleny menšími zářezy (sulky). Mozková kůra je sídlem veškerého vědomého jednání, vyšších mozkových funkcí jako je paměť, řeč nebo učení [12,17,18].

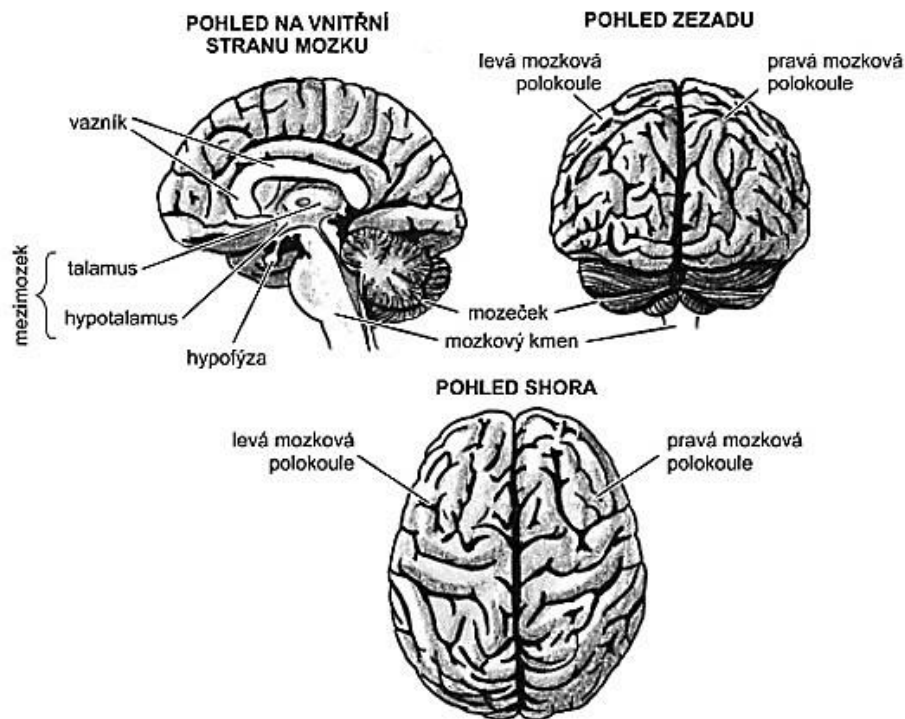
Neokortex můžeme rozčlenit na několik oblastí podle funkce. Z oblastí motorických je nejvýznamnější primární motorická oblast, která pokračuje pyramidovou dráhou do mozku a míchy. Před ní se nachází premotorická oblast, k jejíž stimulaci je však nutné silnějšího podnětu. Další oblasti jsou oblasti projekční, ve kterých končí sensorická nervová vlákna (např. zraková či sluchová) a oblasti asociační, které kontrolují funkci CNS. Poškozením asociačních oblastí může dojít k vážnému narušení osobnosti a myšlení člověka. Pod mozkovou kůrou se v bílé hmotě nachází bazální ganglia. Právě mozková kůra jakožto sídlo kognitivních funkcí je místo, kde se vytváří NFT a amyloidové plaky, které jsou typickým patologickým znakem ACH [12,17,19].

Další částí mozku, která je při ACH poškozena nejdříve je hypokampus. V každé hemisféře se nachází jeden. Leží pod mozkovou kůrou ve střední části temporálního laloku a pojmenován je po svém tvaru, kterým připomíná mořského koníka. Hypokampus je funkčně velmi podobný mozkové kůře – je to sídlo paměti, ovládá emoce, zajišťuje prostorové vnímání a slouží pro vytváření (nikoliv však pro ukládání) nových dlouhodobých vzpomínek. K jeho poškození dochází nejčastěji při poranění temporálního laloku a dochází při něm ke ztrátě pouze nově vytvořených vzpomínek. Starší vzpomínky zůstávají obvykle nedotčené, stejně jako krátkodobá paměť. V současné době vědci pracují na vývoji hypokampální protézy, která by byla schopná plně nahradit lidský hypokampus a navrátit alespoň část ztracených kognitivních funkcí mozku, což by bylo velkým pokrokem při léčbě ACH [20-22].

Dalšími třemi částmi mozku je mozeček, mezimozek a mozkový kmen, což je spojení zadního a středního mozku se stavbou shodnou s míchou. Zadní mozek je tvořen prodlouženou míchou a Varolovým mostem. Na prodlouženou míchu navazuje Varolův most (*pons Varoli*). Je jejím funkčním pokračováním a zároveň spojovacím článkem s mozečkem. Střední mozek následuje hned za [12,17,19].

Mozeček (*cerebellum*) je miniaturní, velmi lehký útvar nacházející se mezi spojením míchy a koncového mozku. Funkcí mozečku je regulace svalového tonu, ovládání tělesné motoriky (hlavně jemných pohybů), ale je i sídlem center pro rovnováhu a koordinaci [12,19].

Nad středním mozkem se nachází dvojitý útvar oválného tvaru, který se nazývá mezimozek (*diencefalon*) a je překryt hemisférami velkého mozku. Mezimozek má dvě součásti: talamus a hypotalamus. Talamus je tvořen dvěma útvary připomínající vejce a odpovídá za funkci motoriky, smyslového vnímání. Hypotalamus je k talamu připojen zesponu. Je centrem vegetativního nervstva a díky tomu řídí emoce, spánek, sexuální chování a má podíl na regulaci tělesné teploty. Zároveň prostřednictvím hypofýzy řídí endokrinní soustavu [12,19]. Obrázek 1 zobrazuje mozek z několika stran a jsou tak dobře viditelné jednotlivé části.

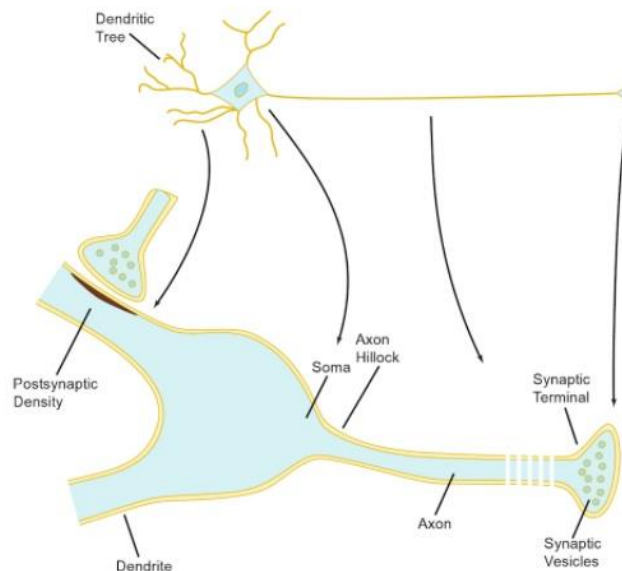


Obrázek 1 Stavba mozku [21]

2.1 Neuron

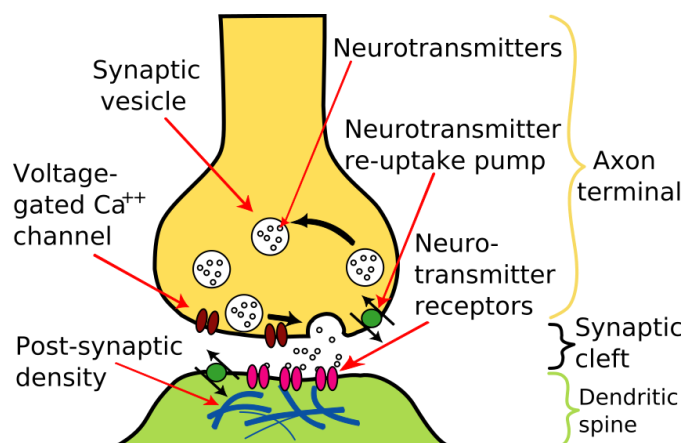
Základní stavební i funkční jednotkou nervového systému jsou neurony, nervové buňky zodpovídající za přenos vzruchu. Tělo neuronu neboli soma je obohaceno o krátké a dlouhé výběžky. Krátké výběžky (dendrity) přijímají signál ze sousedních buněk a dále ho vedou dlouhým výběžkem (axonem) k nervovému zakončení. Po axonu je vedení vzruchu urychleno myelinovými pochvami, které slouží jako izolant.

V případě CNS jsou tyto pochvy tvořeny oligodendrocyty, v případě PNS jde o Schwannovy buňky. Mezi myelinovými pochvami se nachází Ranvierovy zářezy, jejichž úkolem je taktéž urychlit vedení elektrického signálu [24,25]. Stavbu nervové buňky můžeme vidět na obrázku 2.



Obrázek 2 Stavba neuronu [24]

Nervovým zakončením se říká synapse a jejich úkolem je předávání signálu dalším neuronům. U člověka se vyskytují převážně synapse chemické, které pro přenos vzruchu využívají specializované mediátory, tzv. neurotransmitery. Jednotlivé části synapse můžeme vidět na obrázku 3. Mechanismus přenosu je následovný: Poté, co vzruch dosáhne presynaptického útvaru, dochází k aktivaci Ca^{2+} iontů a jejich vstupu do buňky. Tím je dosaženo depolarizace, a tedy vylití mediátoru ven z buňky do synaptické štěrbině. Zde se neurotransmitter váže na postsynaptický útvar, kde se opět otevírají iontové kanály a vzniká potenciál [24,25].



Obrázek 3: Synapse [26]

3 ALZHEIMEROVA CHOROBA

3.1 Charakteristika

Alzheimerova choroba je nejběžnějším typem demence. Jedná se o onemocnění, které způsobuje poškození korových funkcí mozku jako je paměť, myšlení, úsudek a celkový úpadek osobnosti. K postižení dochází především v důsledku zmenšování mozku a úbytku nervových buněk. Příčinou je ukládání β -amyloidu, který působí toxicky na tau-protein uvnitř neuronů a ty tak zanikají [27,28].

V roce 2015 byl společností Alzheimer Disease International celosvětově stanoven počet lidí žijících s demencí na necelých 47 milionů. Nejvíce postižených je však staršího věku – téměř čtvrtina světové populace nad 85 let trpí touto chorobou [29].

3.2 Rizikové faktory

Aby Alzheimerova choroba vznikla, musí se zapojit současně celá řada faktorů, z nichž některé působí zcela jistě, jiné pouze potenciálně:

- věk – nejvýznamnější faktor, zřídka se tato choroba objevuje před 60. rokem života,
- genetika – zvýšené riziko je prokázáno u příbuzných,
- genové mutace – nositelé ϵ -4 genu pro apolipoprotein E a lokus na 12. chromozomu,
- vzdělání – vyšší psychická aktivita v nižším věku předchází deprivaci a zvyšuje tak „mozkovou rezervu“,
- poranění hlavy.

Některé studie potvrzují vliv také kouření, alkoholu, protizánětlivých léků a neurotoxických prvků (hliník, zinek) [27,29].

3.3 Příznaky

Příznaky této nemoci není snadné zpočátku odlišit od klasického procesu stárnutí. První klinické příznaky se totiž objevují až po několika letech samotného vývoje choroby. V mírném stupni vývoje dochází nejprve k poruchám souvisejícím s vybavováním dat, která byla čerstvě uložena do paměti. Současně pacienti ztrácejí schopnost plánování a organizování běžných činností [28].

Přechod do středního stupně nemoci se vyznačuje začínajícím výskytem psychopatologických příznaků, nejčastěji depresí, dále se objevují agresivita, halucinace a poruchy spánku [28].

V pokročilém stádiu choroby nemocní nejsou schopni komunikovat s okolím ani poznávat své známé. Je nutná asistence, pokud se chtějí udržet vsedě, bývají němí a ve stavu apatie [28].

3.4 Diagnóza

Diagnóza Alzheimerovy nemoci se dělí na několik typů podle mezinárodně uznávaných kritérií skupiny NINCDS/ADRDA (National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke/Alzheimer's Disease and Related Disorders Association). Pravděpodobná diagnóza začíná mezi 40.–90. rokem života. Dochází k progresivní poruše kognitivních funkcí alespoň ve dvou doménách (např. zhoršení paměti a poznávání). Pacient však netrpí poruchou vědomí a není prokázána přítomnost jiného onemocnění s příznaky ukazujícími na syndrom demence. Pokud jsou příznaky atypické nebo se současně vyskytují i jiné systémové poruchy, jedná se o diagnózu možnou. Posledním stupněm je diagnóza definitivní. Pro její potvrzení je nutné splnění příznaků pravděpodobné diagnózy a histologické vyšetření [28,30].

V poslední době se ujala kritéria skupiny EFNS (European Federation of Neurological Societies), která jsou založena na stanovení biologických markerů, především beta-amyloidu, který se při ACH snižuje a tau-proteinu a fosforylovaného tau-proteinu, jejichž množství se naopak zvyšuje [30].

3.5 Terapie

Dosud není známo, jak Alzheimerovu chorobu vyléčit. Pokud se však podaří nemoc zachytit včas, je možné její vývoj značně zpomalit. Nejúčinnější je zahrnout jak farmakoterapii, tak i rehabilitaci a trénink kognitivních funkcí. Velmi důležitá je psychosocioterapie. Pacientovi je nutné se věnovat ve zvýšené míře a dohlédnout, aby se zapojil do společnosti [28,31].

3.5.1 Biologická léčba

Primárně se snažíme o zlepšení kognitivních funkcí pacienta. Významnou skupinou látek, jsou tzv. kognitiva, která působí pozitivně na acetylcholinergní systém především dvěma způsoby:

- inhibice acetylcholinesterázy, která katalyzuje odbourávání acetylcholinu,
- náhrada acetylcholinu za jeho prekurzory.

Dalšími možnostmi kognitivní léčby je použití léků na snížení neuronálního metabolismu nebo zabránění tvorby patoproteinů [28,30].

Na druhé straně je nutné se zaměřit na další příznaky, které se u ACH mohou objevit, například poruchy spánku a psychiky (deprese, úzkost, agresivita) [28].

3.5.2 Nebiologická léčba

Základem tohoto typu léčby je nejen přístup lékařů a pečovatelů, ale i samotných blízkých pacienta. Vedle skupinových terapií, které jsou obvykle zaměřeny na nácvik paměti a orientace, je třeba dbát na to, aby se pacient pohyboval mezi lidmi, komunikoval a zapojoval se dle možností do běžných činností [28,31].

4 TAU-PROTEIN

Název tau-protein je zkratkou z anglického „*tubulin associated protein*“, neboli protein asociovaný s tubulinem a to proto, že patří do rodiny proteinů asociovaných s mikrotubuly (MAP – mikrotubule associated proteins). Mikrotubuly tvoří součást mitotického vřetena v cytoskeletonu buňky, a kromě dalších buněčných funkcí vytváří dráhu pro mezibuněčný transport na delší vzdálenosti. Jsou to polymery skládající se z několika tubulinových podjednotek a přidružených proteinů, které se nacházejí podél celé délky mikrotubulů, nebo specificky označují jejich konce. MAP se váží na tubulin a jejich funkce je rozmanitá. Některé zajišťují pohyb po mikrotubulech, úkolem jiných je stabilizace, podpora polymerace nebo inhibice depolymerace. Další z nich mohou naopak zabráňovat sestavení mikrotubulů a snižovat jejich stabilitu [32,33].

Tau-protein je velmi dobře rozpustný a tepelně odolný protein. Nalézt ho můžeme v mnoha živočišných druzích, u lidí potom především v neuronech. Stopové množství se však nachází i ve svalích a životně důležitých orgánech jako je srdce, ledviny či slinivka [33].

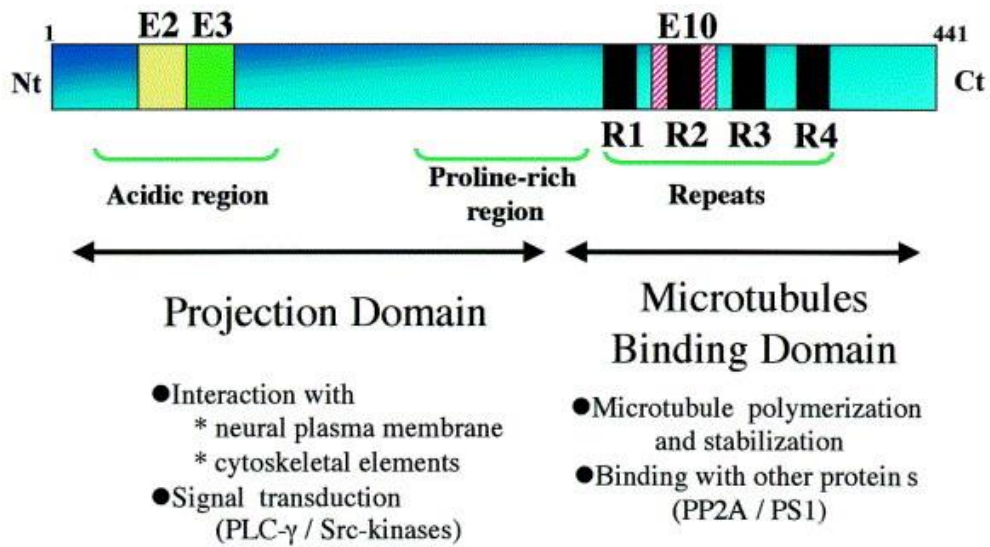
4.1 Struktura a funkce

Tau-protein je nesourodý a prodloužený polypeptid. Je kódován unikátním genem, který se u lidí nachází na dlouhém raménku 17. chromosomu a pomocí transkripce je prepisován do jaderné RNA [34].

V lidském mozku poskytuje šest různých isoform, obsahujících 352-441 aminokyselinových zbytků a lišících se tzv. alternativním sestřihem neboli sekvencí kódování exonu 2, 3 a 10. Bylo popsáno, že exony 2 a 3 mohou mít roli při asociaci tau-proteinu s proteiny buněčné membrány, jako jsou např. apolipoprotein ApoA1 nebo synaptofyzin [32,35,36].

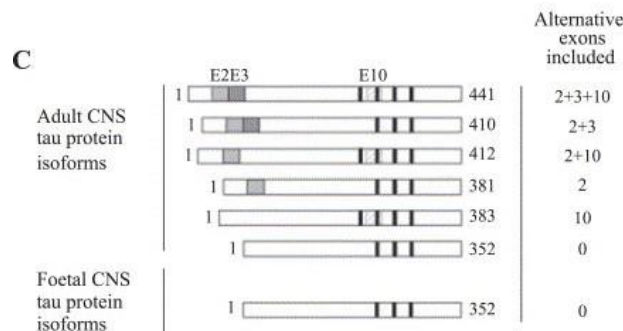
Jak můžeme vidět na obrázku 4, tau-protein je tvořen N-terminální (aminoterminální) částí, známou také jako projekční doména, která zahrnuje kyselou oblast a oblast bohatou na prolin. Díky N-terminální oblasti jsou tau-proteiny schopny propojit mikrotubuly s cytoskeletem a omezit tak jejich pružnost. Výzkumy dokázaly i to, že projekční oblast může interagovat s buněčnými organelami a zajistit vazbu

s mitochondriemi. Na ní navazuje bazická C-terminální (karboxyterminální) oblast, která má význam při polymeraci mikrotubulů [35-37].



Obrázek 4 Přehled oblastí tau-proteinu [37]

Jednotlivé isoformy mají rozdílný počet opakujících se vazebných domén k tubulinu v karboxylové části molekuly – buď tři (3R) nebo čtyři (4R). Tyto domény jsou tvořeny opakováním 18 konzervovaných aminokyselin, která jsou vzájemně oddělena méně konzervovanými částmi. Isoformy 4R se vyznačují přítomností exonu 10, isoformy 3R nikoliv. Funkcí tohoto konce je transport axonů, regulace rychlosti polymerace mikrotubulů a inhibice jejich depolymerace. Na aminokonci se potom nachází jeden (1N), dva (2N) nebo žádný (0N) insert tvořený 29 aminokyselinami [32,35-37]. Přehled jednotlivých isoformů můžeme vidět na obrázku 5.



Obrázek 5 Isoformy tau-proteinu [32]

Každá isoforma je dominantní v jiném stupni vývoje a zastává specifickou fyziologickou funkci. Například pouze jediná isoforma (3R a 0N) se vyskytuje u plodu, ostatní isoformy jsou přítomny v dospělosti [32,36].

Co se týče sekundární struktury, patří tau-protein mezi tzv. proteiny s vnitřní poruchou (IDP – intrinsically disorder protein). To znamená, že postrádá dobře definovanou sekundární strukturu a v nativním stavu ji má pouze malý obsah [35].

4.2 Post-translační modifikace

Velmi častým jevem u primární struktury tau-proteinu je ztráta C-koncových nebo N-koncových oblastí a důležitým rysem jsou posttranslační modifikace různých zbytků. Může jít o acetylaci, deamidaci, O-glykaci či metylaci, avšak nejvýznamnější je u tau-proteinu jeho fosforylace, která má fyziologickou i patologickou funkci [35].

4.2.1 O-glykace

O-glykace je posttranslační úprava, jež se vyznačuje přidáním O-vázaného N-acetylglukosaminového zbytku na serin nebo threonin. Význam této modifikace není dosud plně znám, je však známo, že souvisí s transkripcí, buněčným cyklem a aktivací buněk. Svou roli hraje také při subcelulární lokalizaci a při degradaci tau-proteinu. Tento děj je často spojen s fosforylací, ale počet o-glykačních míst je u tau-proteinu nižší než fosforylačních [36].

4.2.2 Fosforylace

Fosforylace znamená připojení fosfátové skupiny na molekulu proteinu. Nejdelší isoforma tau-proteinu (441 aminokyselin) se vyznačuje 79 fosforylačními místy na serinu a threoninu. Většina těchto míst se nachází mimo tubulin vázající domény [36].

Fosforylace je výsledkem aktivity specifických kináz a fosfatáz. Kinázy zapojené do tohoto procesu jsou řízené prolinem a patří mezi ně např. mitogenem aktivovaná proteinkináza, glykogensyntáza kináza, tau-tubulin kináza a cyklin-dependentní kinázy. Aktivita těchto proteinkináz může být indukovaná stresem způsobeným tepelným šokem nebo naopak studenou vodou. Fosfatázy vyvažují působení kináz a zajišťují v mozku rychlou defosforylací [36].

Tato posttranslační úprava zastává různé role ve funkci tau-proteinu. Jak již bylo zmíněno výše, jedním z úkolů tau-proteinu je stimulovat polymeraci mikrotubulů. To však značně závisí na stupni fosforylace, protože fosforylované tau-proteiny nejsou tolik účinné [36].

Je dokázáno, že fosforylace závisí na stupni vývoje. U plodu je fosforylace tau-proteinu výrazně vyšší než u dospělých jedinců, protože k aktivaci fosfatáz dochází až ve vyšším věku [36].

4.3 Neuropatologie

Přestože je tau-protein fyziologicky důležitý, narušením jeho struktury se mění i jeho funkce. Hlavním problémem bývá hyperfosforylace a abnormální fosforylace, které vedou k tvorbě NFT, jejichž výskyt v mozku je jedním z určujících znaků ACH i jiných demencí [38].

4.3.1 Hyperfosforylace

V normálním lidském mozku se nachází dva až tři moly fosfátu na jeden mol tau-proteinu. U jedinců trpících ACH byla zjištěna úroveň fosforylace až čtyřikrát vyšší a v současné době je u nich známo přes 40 fosforylačních míst [39].

Fosforylace na různých místech tau-proteinu splňuje rozdílnou funkci ať už fyziologickou nebo patologickou. Na některých místech dochází různou měrou k inhibici vazby na mikrotubuly, na jiných pak k podpoře samovolné agregace do PHF neboli zdvojených šroubovicových vláken, o kterých bude více rozepsáno níže. V případě fosforylace na tzv. kritických místech (např. serin199, serin202, threonin205, threonin212, threonin231) funguje tau-protein jako inhibiční molekula, která odděluje MAP z mikrotubulů. U tau fosforylace v oblasti bohaté na prolin dochází pouze z malé části k podpoře agregace i inhibice aktivity tau-proteinu. Dojde-li naopak k fosforylaci na C-koncové části, jsou oba tyto jevy výrazné a narušují mikrotubuly [39].

Přestože hyperfosforylace mění fyziologickou funkci tau, nemusí nutně vést k degradaci mikrotubulů, protože většinu škod lze napravit enzymatickou defosforylací. Naproti tomu abnormální fosforylací získává tau-protein toxickou funkci, jež z pravidla vede k zániku mikrotubulů. Příčina fosforylace tau-proteinu v nadměrné míře není doposud objasněna [39].

4.3.2 Neurofibrilární spleti

Je dokázáno, že hyperfosforylovaný a abnormálně fosforylovaný tau-protein je hlavní součástí PHF. Jde o zakroucená vlákna široká cca 10–22 nm, která svým tvarem připomínají dva spojené prameny. Pomocí elektronové difrakce bylo zjištěno, že jejich struktura je tvořena několika příčnými podjednotkami tau-proteinu. U PHF izolovaných z mozku pacienta s ACH je však část filament nezkroucená a obě vlákna běží paralelně vedle sebe [38,39]. Tato helikální vlákna mohou akumulovat, vytvářet klubka a být tak základem pro tvorbu NFT. Ty se vyskytují v perikaryální cytoplasmě buňky buď samostatně, nebo obalují beta-amyloidové plaky. Jejich výskyt v mozku souvisí s dysfunkcí nervových buněk v důsledku degenerace tau-proteinu a podle jejich počtu lze dnes určit stupeň demence [42,43].

Existují tři morfologická stádia: pre-NFT, zralé NFT a extraneuronální NFT. Pre-NFT se vyznačují zachovanými dendrity a centrováním jádrem. V jejich cytoplasmě se nachází bodový tau-protein. Zralé (intraneuronální) NFT jsou složeny z PHF a charakteristicky vytlačují jádro k okraji těla neuronu. Bývají rozloženy na dendrity a proximální část axonu. Po smrti neuronů z nich vznikají extracelulární (tzv. Ghost) NFT, kterým již chybí jádro a cytoplazma [42-44].

5 DIAGNOSTIKA

Tau-protein se stal jedním z nejdůležitějších biomarkerů ACH. Na rozdíl od beta-amyloidu, který se u této choroby vyskytuje ve snížených koncentracích, nacházíme hodnoty tau-proteinu až několikanásobně zvýšené. Při diagnostických vyšetřeních se stanovuje jak zvýšená míra celkového, tak i fosforylovaného tau-proteinu především v CSF, jehož výhodou je, že je v kontaktu s extracelulární tekutinou. Metody vyšetření krve se stále teprve zdokonalují. Oproti zdravému mozku byla u pacientů postižených ACH stanovena hladina celkového tau-proteinu o 200 % a fosforylovaného tau-proteinu až o 300 % vyšší [45].

Zvýšení celkového tau-proteinu ukazuje obecně na poškození axonů v neokortexu, což není charakteristické pouze pro ACH, ale i mrtvici, mozkové trauma nebo Creutzfeldt-Jakobovu chorobu [46].

Přestože samotné pozitivní stanovení jen jednoho z těchto analytů nevylučuje jiná neurodegenerativní onemocnění, společně poskytují 85–95% jistotu, že se jedná o ACH. Podle hodnot, které můžeme vidět v tabulce 1 a 2, lze dojít k jednomu ze tří závěrů. V případě, že jsou všechny proteiny patologické, nebo alespoň jeden protein a jeden nespecifický marker, jde o pravděpodobnou diagnózu ACH. Pokud jsou hodnoty hraniční a patologii vykazuje pouze jeden specifický marker, jedná se o diagnózu možnou. O nepravděpodobné diagnóze pak mluvíme tehdy, jsou-li všechny biomarkery v normě, nebo je pouze jeden nespecifický marker patologický. Cílem diagnostiky je odlišit ACH od procesu stárnutí a jiných onemocnění vyznačující se demencí, např. mírné kognitivní poruchy (MCI – mild cognitive impairment) [45-47].

Tabulka 1 Normy vyšetřovaných proteinů [47]

H-tau	21-50 let	<300 ng/l
	51-70 let	<450 ng/l
	71-93 let	<500 ng/l
P-tau		<60 ng/l
A β 42		>500 ng/l

Tabulka 2 Hodnocení ACH [47]

Pozitivní	↑H-tau + ↑P-tau + ↓Aβ42 ↑H-tau + ↑P-tau ↑H-tau + ↓Aβ42 ↑P-tau + ↓Aβ42
Hraniční	↓Aβ42 ↑P-tau
Negativní	↑H-tau

Stanovení tau-proteinu v CSF je složitější. Komplikací je jednak jeho výskyt v šesti různých isoformách a různých modifikacích a jednak to, že jeho koncentrace v CSF jsou velmi nízké – cca 300 ng/l u zdravých jedinců a až 900 ng/l u pacientů s ACH. Získávání CSF je navíc velmi invazivní proces [46].

Spolu s objevováním nových možností léčby ACH dochází k tomu, že lidé vyhledávají lékařskou pomoc již v dřívějších stádiích onemocnění. U mnoha z nich se neobjevují znaky závažnější ACH, ale pouze lehké poruchy paměti bez demence. Kromě klinického sledování doposud neexistuje žádná metoda, kterou by bylo možné stanovit, zda se onemocnění rozvine do ACH s demencí, nebo ne [48].

Neurodegenerativní proces začíná již 20-30 let před tím, než se objeví klinické známky onemocnění. Postupně vznikají plaky a spletnice a až na určité prahové úrovni se objevují první příznaky. Doposud nebylo dokázáno, že se rychlost tvorby plaků a neuronální degenerace během procesu nemoci mění [48].

Diagnostické markery pro ACH lze rozdělit do dvou skupin na stavové a stádiové markery. Stádiové markery určují, jak daleko pokračuje degenerativní proces. Mezi takové patří například atrofie hipokampu nebo stupnice kritérií, podle kterých se hodnotí pokles kognitivních funkcí. Beta-amyloid i tau-protein patří mezi markery stavové a odrážejí intenzitu procesu onemocnění. Právě tyto stavové markery vykazují největší diagnostický potenciál pro prognózu u počínající ACH. Problémem při sledování markerů v CSF je to, že pouze u malého procenta lidí se mírná kognitivní porucha vyvine v ACH. Je tedy třeba více jak pěti let pozorování, aby bylo možné potvrdit, že MIC je stabilní [48].

K navýšení koncentrace celkového tau-proteinu navíc dochází přechodně i u akutních poruch (srdeční infarkt) a nejvyšší nárůst se objevuje u onemocnění, při kterých dochází k intenzivní degeneraci neuronů - příkladem může být Creutzfeldt-Jakobova choroba. U ACH je zvýšení pouze mírné. Hladina fosforylovaného tau-proteinu však v těchto případech nenarůstá a lze říci, že nesvědčí pouze o poškození neuronů, ale odráží celkový stav fosforylace mozku, tedy tvorbu spleti a rozvoj ACH [48].

5.1 Specifita a citlivost Tau-proteinu

Specifita tau-proteinu není dokonalá především z důvodu, že se jeho vysoké koncentrace vyskytují i u jiných onemocnění souvisejících s demencí (již bylo zmíněno výše). Existují však i případy, které jsou sporné. Například u vaskulární demence byl v některých studiích nárůst koncentrace tau-proteinu u mnoha pacientů vysoký, v jiných naopak téměř žádný. Při frontotemporální demenci dochází u některých k mírnému až střednímu zvýšení koncentrace tau-proteinu. To by mohlo být vysvětleno souběžně se rozvíjející ACH [48].

Citlivost tau-proteinu závisí na zvolené metodě. U celkového tau-proteinu vykazuje metoda ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) v 36 studiích specifitu 90 % a střední citlivost 81 %. U pěti studií s metodou Athena byla specifita stejná, ale střední citlivost výrazně nižší. U fosforylovaného tau-proteinu se citlivost pohybuje mezi 79-80 % různými metodami ELISA. Jeho specifita je ovšem značně vyšší než u celkového tau-proteinu, protože není znám výskyt jeho vyšších koncentrací u jiných chorob [48].

Omezením zůstává to, že všechna data pocházejí od klinicky diagnostikovaných pacientů a existuje tak riziko tzv. kruhového důkazu: výkon markerů nesmí být vyšší než daná diagnostická kritéria. Někteří pacienti s ACH současně trpí i jinou poruchou, která se s ACH překrývá. Několik studií dokázalo, že ACH velmi často doprovází vaskulární demence nebo demence s Lewyho tělísky. Proto může být obtížné posoudit, zda je příčinou suboptimální specifčnosti a citlivosti nedostatek markerů nebo studovaných pacientů a kontrol [48].

5.2 Předanalytické faktory

Analytický výsledek je ovlivňován mnoha faktory. Stejně jako beta-amyloid se tau-protein drží na stěnách zkumavek z tvrdého plastu a skla, což může vést k falešně

nízkým až negativním výsledkům. CSF by se měl proto uchovávat ve zkumavkách z polypropylenu. Vzorky jsou stabilní při 4 °C po dobu tří dnů, ale v laboratořích se běžně uchovávají zmrazeny. Stejně tak je třeba brát v úvahu změny koncentrací tau-proteinu během rozvoje onemocnění v CSF. U celkového ani fosforylovaného tau-proteinu nedochází k výrazným změnám do jednoho až dvou let, a to jak u ACH, tak MCI. Po překročení této doby dochází k poklesu koncentrací v obou případech. Jiná studie však dokázala, že po šesti letech klesá koncentrace fosforylovaného tau-proteinu u pacientů s ACH, ale stoupá u osob trpících MCI [48].

5.3 Imunochemie

K měření koncentrace tau-proteinu se stejně jako u ostatních bílkovin používá velká škála metod, jako jsou elektroforéza, chromatografie nebo v poslední době i elektronová mikroskopie. Největší význam má ale vyšetřování pomocí imunochemických metod [49].

5.3.1 Protilátky

Existuje velké množství anti-tau protilátek, které jsou převážně monoklonálního původu. Každá z nich je závislá na fosforylaci či acetylaci a rozeznává jiný typ epitopu s odlišnou aminokyselinovou sekvencí [47]. Níže se zaměřím na některé z nich.

Protilátka Tau-66 proti rekombinantnímu tau-proteinu rozpoznává epitop ze zbytků aminokyselin 155-208 a 305-314. Pomocí ní lze nalézt somatické neuronální skvrny v horním temporálním gyru, které jsou frekventovanější u mozku s ACH než ve zdravém mozku. Podobný nález se vyskytuje i v hipokampu, kde jsou však obarveny přednostně. V případě lehčích forem ACH nejsou skvrny v hipokampu dostatečně zřetelné a označují se jako difúzní síťové plaky. Pomocí testu ELISA byla dokázána vysoká specifita Tau-66, protože nereaguje s jinými mikrotubuly vázajícím protein ani s tubulinem. Ve stejném testu je Tau-66 citlivý na pufr a teplotu a jeho reaktivita může být silně ovlivněna SDS (sodium dodecyl sulfate). Jeho velkou nevýhodou je to, že ho nelze použít při Western-blottingu [49,50].

PHF-1 je protilátka připravená imunizací PHF a některé epitopy má shodné s normálním tau-proteinem. Liší se však nižší pohyblivostí v polyakrylamidovém gelu a izoelektrickým nábojem. Rozeznává fosforylaci na zbytku serinu396 a threoninu404. Pozitivního výsledku můžeme dosáhnout, pokud je fosforylovaný alespoň jeden ze jmenovaných zbytků. Nedávná studie však potvrdila, že v případě fosforylace obou zbytků naráz dochází až k desetinásobnému zvýšení citlivosti měření. Epitopy, které lze

rozpoznat pomocí této protilátky jsou citlivé na alkalickou fosfatázu, proto je vhodné ji použít pro studium abnormální fosforylace tau-proteinu [51,52].

Velmi používanými protilátkami jsou Tau-1 a AT8. Tau-1 se využívá k barvení fyziologického tau-proteinu a jeho defosforylované formy izolované z mozku pacientů s ACH. Protilátka vnímá epitopy s aminokyselinami 192-204. AT8 rozpoznává stejnou oblast proteinu ve fosforylované formě a bylo dokázáno, že tato protilátka vyžaduje současně fosforylaci tau-proteinu jak na serinu202, tak i threoninu205 [53].

5.3.2 Metody stanovení

ELISA neboli enzymová imunosorbentní metoda patří mezi imunoanalytické metody s indikátory. Je nejběžnější metodou pro stanovování bílkovin včetně tau-proteinu. Principem je to, že jedna z reagujících látek (antigen či protilátka) je navázána na pevnou fázi. Po přidání druhé reagensie vzniká imunokomplex, pro jehož kvantifikaci se využívá buď tzv. sekundární protilátky, která nese indikátor (např. enzym, radionuklid, luminiscenční částice), nebo je jedna z reagensií již indikátorem značená [54].

Rozlišujeme dva druhy ELISA metod:

- **Kompetitivní ELISA** – stanovovaný antigen soutěží o vazebné místo na protilátce s antigenem, který je označený indikátorem. Po zreagování a promytí se měří signál, který je nepřímo úměrný hledané koncentraci [52].
- **Sendvičová ELISA** – Jednotlivé kroky jsou časově odděleny promýváním. Stanovovaný antigen nejdříve vytvoří imunokomplex s protilátkou a na ten je až v dalším kroku navázána sekundární protilátka s indikátorem. Výsledný signál je přímo úměrný koncentraci a lze ho zviditelnit přidáním substrátu, který vyvolá barevnou změnu [54].

Pro potvrzení reprodukovatelnosti této metody se používají vždy dvě kontroly, jejichž přijatelná odchylka nesmí být více než 15 % [48].

Western-blotting nebo také imunoblotting je metoda, které se využívá pro měření předem elektroforézou rozdělených proteinů (viz níže). Jejich vzor je z gelové destičky přenesen na membránu buď prostou difúzí, nebo příčnou elektroforézou. Na membráně následně dochází k imunochemickým reakcím: inkubace a reakce antigenu s protilátkou. Navázanou protilátku lze pak snímat pomocí sekundárních činidel

s použitím ELISA metody. Kvantifikace pak opět probíhá pomocí barevných změn – využívají se tedy techniky jako denzitometrie a spektrofotometrie [55].

Další metodou, kterou bych ráda zmínila, je imunoelektroforéza, která kombinuje elektroforetické dělení bílkovin s imunochemickými reakcemi [54]. Více se na tuto metodu zaměřím v kapitole o elektroforéze.

5.4 Neimunochemické metody stanovení

5.4.1 Elektroforetické metody

Elektroforéza je jednou z nejrozšířenějších metod v imunochemii pro stanovení proteinů. Často doplňuje nebo se vyskytuje v kombinaci s jinými metodami. Jde o techniku s vysokým rozlišením a využívá se v případech, kdy chceme zjistit molekulovou hmotnost, náboj, informace o podjednotkách nebo čistotu přípravku [56].

Při této technice dochází k separaci a analýze proteinu v elektrickém poli. Principem je rozdělení náboje mezi povrchem částice a tekutinou, která ho obklopuje. Vložené elektrické pole působí na výslednou hustotu náboje a na tok tekutiny, přičemž celý proces musí probíhat na vhodném nosiči, kterými jsou v dnešní době agarózový či polyakryamidový gel [57].

- **Kapilární elektroforéza**

Tato metoda je vhodná i pro malé objemy vzorků a probíhá v kapiláře, která je ponořená do elektrolytu s elektrodami. Ty slouží jako zdroj vysokého napětí. Z jednoho konce se do kapiláry dávkuje vzorek, který je snímán detektorem na druhé straně. Vyhodnocujeme výsledný signál, který dostaneme v podobě elektroforeogramu [57].

- **Imunoelektroforéza**

Imunoelektroforéza využívá kromě separace bílkovin na základě povrchových nábojů i reakci protilátky s antigenem v podobě imunoprecipitace. Proteiny a protilátky jsou na agarovém gelu odděleně v malých jamkách. Prostou difúzí dochází k interakci těchto molekul a vzniku srážecí linie specifického tvaru. V případě přítomnosti patologie dochází ke změně tvaru a intenzity zbarvení precipitačních linií. Tato metoda je časově zdlouhavá a automatizace je náročná, proto je často nahrazovaná imunofixací [54,58,59].

- **SDS-PAGE** (gelová elektroforéza na polyakrylamidovém gelu s přítomností dodecylsulfátu sodného)

SDS-PAGE je další technikou s velkým výkonem, která se využívá mimo jiné pro svoji jednoduchost. Někdy bývá označována jako elektroforéza s denaturací. Proteiny jsou zde separovány na základě jejich molekulové hmotnosti [60].

V prvním kroku reaguje stanovovaný protein s SDS, který ničí jeho terciární strukturu a dochází tak k denaturaci. SDS se váže jak na hydrofilní, tak hydrofobní části rozvinutého polypeptidového řetězce – tím vzniká záporně nabitá molekula komplexu SDS-protein. Takto vzniklé komplexy se nadále dělí do jednotlivých skupin polypeptidů. Zde se využívá polyakrylamidového nosiče, který je ve výsledné formě polymerizován a obsahuje velké množství trojrozměrných pórů. Jejich velikost závisí na koncentraci zesítovacího činidla a akrylamidu ve směsi [60].

Důležité je však to, že velikost pórů je srovnatelná s velikostí proteinových molekul. V případě vložení elektrického pole na záporný náboj komplexů dochází k migraci molekul proteinu směrem k anodě. Větší molekuly migrují pomaleji, než menší, které se dostávají rychleji skrze póry. Po skončení elektroforézy jsou jednotlivé proteiny rozděleny podle jejich molekulové hmotnosti – menší molekuly se dostanou dále než velké, které se sekávají s větším odporem [60].

Konečná analýza se může provádět několika způsoby. Jedním z nich je stanovení Western-blottingem, jindy se využívá hmotnostní spektrofotometrie. Proteiny lze také obarvit stříbrem nebo dle Coomassie a porovnat se sadou standardů. Díky kombinaci SDS a polyakrylamidové matrice jako síta je dosaženo extrémně vysokého rozlišení separace oproti jiným metodám založeným na stejných principech [61].

Elektroforetické metody (především SDS-PAGE) jsou dnes pro svoji rychlost, jednoduchost a dobrou reprodukovatelnost řazeny mezi běžně se provádějící laboratorní metody související se stanovením tau-proteinu [61].

5.4.2 Kryoelektronová mikroskopie

Elektronová mikroskopie se značně využívá pro studium biomolekul a určení jejich struktur. Před samotným mikroskopováním je nutné vzorek rozpustit v pufru a následně zmrazit kapalným ethanem. Tím docílíme toho, že se nestihnou vytvořit ledové krystaly, které by rušili prohlížení, ale voda zůstane v amorfním sklovitém stavu. Abychom tento stav udrželi, nesmí teplota stoupnout nad 100 K. Poté se vzorek zobrazuje při destruktivním elektronovém paprsku. Snímky jsou pak vytvořeny právě

těmito elektrony a fázovým kontrastem. Protože je při elektronové mikroskopii cílem rozpoznat rozdíly v rozsahu jednoho coulombu mezi atomy s větším rozptylem (uhlík, dusík, síra apod.) a lehčími atomy okolního prostředí (tedy vodíku a kyslíku) mají snímky velmi malý kontrast [62].

To je důvodem, proč elektronová mikroskopie přináší několik omezení. Především je nutné, aby studované molekuly měly dostatečnou velikost a byly tak rozlišitelné na snímcích s malým kontrastem. Zvolený limit pro tuto velikost je 100 kDa, který však bývá v praxi často překračován. Svou roli hraje i složení pufru. Pokud pufr obsahuje vyšší koncentraci rozpuštěné látky jako např. sůl nebo glycerol, mohou jeho molekuly rozptylovat atomy stejně jako stanovovaná biomolekula. Může tak dojít ke ztrátě požadovaného kontrastu a zkreslení samotného stanovení [63].

Protože je tau stejně jako jiné proteiny náchylný na mnoho vnějších vlivů a je nutné zvolit takové podmínky, aby nedošlo k denaturaci a zároveň byly splněny výše uvedené faktory, bývá tato metoda zkoumání zdlouhavá a náročná. Na druhou stranu je tato metoda zatím jediná, kterou se podařilo zobrazit strukturu tau-proteinu v lidském mozku [9,62].

5.4.3 Afinitní chromatografie

Afinitní chromatografie je metoda nejvíce používaná pro čištění neboli purifikaci tau-proteinu. Dá se říci, že ve svém využití předběhla i hmotnostní spektrofotometrii. Biologické extrakty totiž často obsahují nadměrné množství proteinů, což je komplikace, se kterou si hmotnostní spektrofotometrie neumí poradit [63].

Obecným principem chromatografie je separace látek na základě jejich rozdílných vlastností jako je velikost, náboj, hydrofilita nebo naopak hydrofobicita aj. Mnoho molekul má však podobné i tyto vlastnosti [63].

Vlastností, kterou se zabývá afinitní chromatografie, je afinita a zaměřuje se tedy na struktury jednotlivých molekul. Proto dokáže odlišit i molekuly s podobnými obecnými vlastnostmi a je velmi ceněná [63].

Tato metoda využívá interakce mezi imobilizovaným ligandem a stanovovaným analytem. V případě proteinů se jako ligand často používají protilátky proti konkrétnímu proteinu. Dochází tak ke specifické reakci, kdy je cílová molekula navázána na ligand a nežádoucí molekuly tak mohou být odstraněny. Celý proces lze provést v jediném kroku a dosáhnout tak najednou celkové purifikace [64].

6 LÉČBA ALZHEIMEROVY CHOROBY

U ACH je kladen především veliký důraz na prevenci. Pokud však člověk ACH již trpí, osvědčily se změny v životním stylu a příjem určitých živin. Léčivých přípravků jako takových bohužel mnoho není – pro léčbu ACH jich bylo US FDA (úřad pro kontrolu potravin a léků ve Spojených státech) schváleno pouze pár. Patří mezi ně donepezil, rivastigmin, galantamin a memantin. Problém u všech metod léčení je ten, že jsou založeny pouze na léčení symptomů a zmírnění příznaků jako jsou změny v chování a pokles kognitivních funkcí. Zájem o ně navíc není příliš velký, protože všechny fungují pouze dočasně a vyskytuje se u nich řada vedlejších účinků [65,66].

V roce 2017 byly objeveny nové poznatky v neuropatologii, které se zaměřují na zábranu základních patologií ACH, tedy tvorbu beta-amyloidových plaků a neurofibrilárních spleť [66,67].

Na tau-protein je kladen poněkud větší důraz, než na beta-amyloid hlavně proto, že se jeho zvýšená koncentrace vyskytuje nejen u ACH, ale i jiných neurodegenerativních poruch. Mezi terapeutické postupy patří imunoterapie, zábrana agregace tau-proteinu, stabilizace mikrotubulů a zábrana tzv. O-vázané beta-N-acetylglukosaminylace (O-GlcNAcylyace) [66].

6.1 Imunoterapie

Imunoterapeutické metody jsou velice slibné z pohledu léčby transformující nemoc. Hlavní strategií při použití terapeutických protilátek je to, že by měly být schopny prostoupit skrze hematoencefalickou bariéru do mozku a navázat se na patologické formy tau-proteinu. Existují dvě vzájemně se doplňující hypotézy – spolupráce s extracelulárními nebo intracelulárními formami tau-proteinu (či v ideálním případě obojí najednou). Všechny protilátky používané pro terapii tauopatií by měly být schopny vazby na shluky tau mimo buňky a tím zabránit jejich šíření do sousedních neuronů. Podle dosud zjištěných údajů se předpokládá, že fagocytóza komplexu protilátka – tau-protein je závislá na konkrétním izotypu imunoglobulinu G, který by tak mohl hrát roli v clearance tau-proteinu. Také bylo zjištěno, že extracelulární nebo tau-protein spojený se synaptickou membránou může mít špatný vliv na neuronální funkci. Neutralizace pomocí protilátky by pak mohla mít symptomatické účinky [68].

Studie zkoumající intracelulární oddělení tau-proteinu říkají, že protilátky vstupují do mozku z periferie v modelech transgenních patologií a jsou vycytávány neurony. Dosud není plně objasněno, co se s protilátkou děje po vstupu do neuronu, ale

ví se, že se nachází v lysosomovém systému, který je spojen se shluky tau. To nás vede k tomu, že protilátka pravděpodobně napomáhá likvidovat tau-protein tím, že rozkládá tau agregáty a usnadňuje tak přístup lysosomovému systému. Proniknutí protilátky do neuronu může navíc zabraňovat sekreci tau-proteinu ven z neuronu a jeho šíření v mozku [68].

Současné studie jsou zaměřeny vždy na určitý typ tau-proteinu jako je celkový, hyperfosforylovaný a multimerický tau-protein a specifické konformace tau-proteinu. Každý však přináší své výhody a nevýhody. Hyperfosforylovaný tau-protein je významný v tom smyslu, že fosforylace na různých zbytcích tau-proteinu je specifická pro určitou patologii. Má ale to negativum, že místa fosforylace závisí na stupni onemocnění a v malé míře i na tom, o jakou část mozku se jedná. Výhoda celkového tau-proteinu je, že představuje větší rezervu a dá se s ním tak snadněji pracovat. Jeho zásoba ve stárnoucím mozku však často obsahuje různorodou směs fosforylovaného a nefosforylovaného tau a jeho fragmentů, což je nežádoucím jevem. Co se týče zaměření na multimerický tau-protein a jeho různé konformace je zde velkou výhodou jejich specifita vůči jednotlivým patologiím. Na rozdíl od hyperfosforylovaného tau-proteinu však nejsou v tomto případě dosud plně charakterizovány. Tyto protilátky mohou rozeznávat i podobné konformace u jiných agregátů proteinů týkajících se ACH, což jejich účinnost zvyšuje. Na druhou stranu mají často nižší afinitu a tím naopak účinnost nižší. Dalším problémem je to, že reagují s beta-skládaným listem normálních proteinů a mohou tak vyvolat nepříznivé účinky [68].

Byla vyvinuta aktivní vakcína v podobě syntetického peptidu AADvac1, která byla testována v prvním stádiu ACH Novákem a spol. v letech 2013-2015. Tato vakcína obsahuje peptidový fragment tau294-305, který je přes N-koncový cystein napojený na hemocyanin a jako pomocné adjuvanc se podává alhydrogel. Při jejím vývoji byla použita protilátka DC8E8, která je schopna odlišit fyziologický tau-protein od patologického a současně zabraňuje oligomerizaci tau-proteinu *in vivo* a *in vitro*. Nemocní s mírnou až středně těžkou ACH byli očkováni třemi až šesti imunizačními dávkami. Studie byly úspěšné v tom směru, že vakcína vyvolala u pacientů vysoké titry protilátek téměř ve všech případech. To vedlo skupinu vědců k tomu, že začali vakcínu zkoumat i v druhém stupni choroby [66,68].

Aktivní imunizace je umožněna také vakcínou ACI-35, jejíž hlavní částí je liposom a zaměřuje se proti patologicky fosforylovaným tau-proteinům. Jedná se o 16-aminokyselinový peptid, který velmi rychle reaguje proti antigenu a snižuje tak

hyperfosforylaci tau-proteinu. V souvislosti s jejími účinky nebyly zaznamenány žádné zánětlivé ani jiné nežádoucí reakce, proto se předpokládá bezpečnost při použití u lidí. Zaměřuje se na pacienty s mírnou až střední ACH. Její vývoj však zatím není plně dokončen [66,68].

V současné době probíhají i některé časné studie pro vývin pasivních protilátek. Společnost AC Immune spolu s firmou Genetech provádí studii na myši monoklonální protilátku proti tau-fosfoserinu409. Přestože o této protilátce není známé mnoho, dostupné informace uvádějí, že byla izolována z myši imunizovanými aktivní vakcínou ACI-35 [68].

Roger Nitsche se svou skupinou v Curychu izoloval autoprottilátky proti tau-proteinu od starších jedinců, kteří nevykazovali žádné známky patologie. Jeho přístup je poněkud netradiční, ale má velkou výhodu v tom, že oproti běžným postupům s myšimi protilátkami pracuje přímo s lidskými. Podařilo se tak získat několik protilátek pomocí nejdelšího rekombinantního tau-proteinu, který posloužil jako návnada. Všechny pak byly zkoumány pro jejich schopnost rozlišovat patologické tau izoláty od zdravých. U olovených protilátek 4E4, 3A4 a 24B2 bylo zjištěno, že rozpoznávají aminokyseliny v C-koncové části, jež váže mikrotubuly, ale nevykazují žádnou specifitu týkající se fosforylace [68].

Jiná skupina z Washingtonské univerzity kolem Davida Holtzmana a Randala Batemana vyvinula ve spolupráci se společností Marc Diamond pět protilátek proti myšimu a osm proti lidskému tau-proteinu. Z nich byly vybrány tři: HJ9.3, HJ9.4 a HJ8.5, z nichž HJ8.5 je specifická pro člověka. Všechny vedou ke snížení koncentrace hyperfosforylovaného tau-proteinu, ale jsou významné také pro jejich schopnost bránit přenosu patologie v procesu trans-buněčného přenosu [68].

Peter Davis a kolektiv nesou zásluhu na vývoji archeprotilátek, které prvně sloužily jako diagnostické nástroje, ale později se ukázalo, že mají i terapeutický účinek. Protilátka PHF1 rozeznává lineární epitop fosforylovaného tau-proteinu, zatímco protilátka MC1 rozlišuje strukturální epitop, který požaduje dvě různé lineární sekvence – epitop mezi zbytky 46-202 a C-koncovou část mezi zbytky 312-342 [68]. Imunoterapie zabývající se léčbou ACH se v současné době snaží zaměřit i na beta-amyloid, který je dalším z významných diagnostických markerů. Informace o jeho farmakokinetice a farmakodynamice jsou však méně dostupné, než údaje o tau-proteinu. Navíc bylo zjištěno, že tau-protein se podstatně liší od beta-amyloidu svým biologickým poločasem. Poločas tau-proteinu v intersticiální tekutině je přibližně

jedenáct dní, kdežto u beta-amyloidu pouze jeden až dvě hodiny. Proto je snazší získat vyšší celkový záběr a clearance pro terapeutickou tau protilátku než protilátku proti beta-amyloidu [66,68].

6.2 Stabilizace mikrotubulů

Jak již bylo několikrát zmíněno, hlavní funkcí tau-proteinu je vázat se s mikrotubuly a tím zajišťovat jejich stabilitu. Jednou z možností léčby tauopatií je tedy snaha o nahrazení tau-proteinu v této funkci jinými malými molekulami. Příkladem je epotilon D, který snižuje poškození axonů, a naopak zvyšuje četnost axonálních mikrotubulů u starších mozků [66,69].

Další látkou, která proniká mozkem a může být použita jako stabilizátor je diktyostatin. Při studiích byla opět zjištěna zvýšená hustota mikrotubulů a výskyt patologického tau-proteinu v menší míře. Ve vysokých dávkách má však diktyostatin nepříznivé vedlejší účinky, především gastrointestinální potíže [66,69].

V poslední době několik studií potvrdilo, že i některé imidazoly mají v případě mikrotubulů stabilizační účinky [66,70].

6.3 Zábřana beta-N-acetylglukosaminylace

O-vázaná beta-N-acetylglukosaminylace je proces týkající se proteinů v jádrech a cytosolu buněk. Patří mezi vratné posttranslační modifikace, jejichž úkolem je kontrolovat aktivitu buněk a dostupnost glukózy. U více jak tisíce proteinů kontrolují adici N-acetylglukosaminu (nebo naopak jeho odstranění) ze zbytků serinu a threoninu dva enzymy: OGT (O-vázaná N-acetylglukosaminyltransferasa) a OGA (O-vázaná N-acetyl-beta-D-glukosaminidasa) [66].

Změny tohoto procesu mají spojitost s ACH i jinými mozkovými poruchami. Bylo dokázáno, že O-GlcNAcylace ovlivňuje jak agregaci tau-proteinu, tak i destabilizaci mikrotubulů. Je proto jedním z cílů současných studií týkajících se terapie ACH, protože díky inhibitorům O-GlcNAcylace by mohlo být dosaženo zpomalení tvorby NFT a progresu samotné nemoci. Dosud bylo nalezeno několik velmi účinných inhibitorů [66].

Prvním je velice silný inhibitor PUGNAc. Jeho nevýhodou je, že inhibuje ostatní glykosidové hydrolázy [66].

GlcNAcstatin G je vítán díky své selektivitě vůči beta-hexosaaminidase, ale je velmi málo rozpustný ve vodě, což omezuje jeho použití *in vivo* [66].

Téměř dokonalou selektivitu však vykazuje thiamet G, který má navíc to plus, že snadno proniká hematoencefalickou bariérou a nabízí se tak jeho využití pro neurodegenerativní poruchy. Byl použit pro zvýšení GlcNAcylyace u ACH a tím bylo úspěšně dosaženo snížení agregace tau-proteinu a projevů celé nemoci [66].

6.4 Zábřana agregace tau-proteinu

Existují tři hlavní způsoby, jak zabřánit agregaci tau-proteinu: inhibice kináz, aktivace fosfatáz a prostřednictvím tzv. přímých inhibitorů [66].

Na fosforylaci tau-proteinu se nejvýznamněji podílí kinása GSK3 β a pro zábřanu její funkce bylo vyvinuto několik inhibitorů jak pro preklinickou, tak klinickou fázi ACH [66, 71].

Většinu aktivity mozkové fosfatasy na serotoninu nebo threoninu zajišťuje skupina enzymů, která se nazývá proteinová fosfatasa 2A (PP2A). Části mozku postižené ACH se vyznačují jistými změnami těchto enzymů, jako jsou metylace či fosforylace (či obojí naráz), katalytická aktivita, změny v regulátorech či exprese podjednotek. Tyto poruchy byly spojeny s typickými patologiemi ACH včetně hyperfosforylací tau-proteinu [66,71].

Prvním přímým inhibitorem shromaždění tau-proteinu je methylenová modř patřící mezi fenotiaziny, kterou jako první identifikovala skupina kolem pana Wischika. Schopnost zabraňovat agregaci tau-proteinu vykazují i jiné látky z této skupiny. Methylenová modř je v oxidované podobě heterocyklickou iontovou sloučeninou, která se však v závislosti na podmínkách může přeměňovat na svou bezbarvou redukovanou formu leukomethylthionin. Toho se využívá při terapii, protože právě tato redukovaná forma přechází přes hematoencefalickou bariéru a může působit v mozku [66,71,72].

Několika studii bylo prokázáno, že pro první pozitivní výsledky byla nutná doba působení 24 týdnů a minimální dávka methylenové modři 134 g denně. Kationtová forma methylenové modři působí pouze jako prekurzor, u kterého je nutné aktivní snížení, jenž není stálé. Proto nemají určité dávky žádný nebo jen velmi mírný účinek a byly vynalezeny salifikované formy: LMTM (leukomethylthionin bis(hydromethansulfonát)) a LMTB (leukomethylthionin dihydro-bromid). Ty mají již stejný účinek jako samotná methylenová modř *in vivo* a *in vitro* [66,72].

Akoury a kolektiv přišli s výsledky studií, které popisují mechanismus působení methylenové modři na základě oxidace cysteinových zbytků. Cystein291 a cystein322 se podílejí na tvorbě vláken, a právě tyto oblasti tau-proteinu byly nejvíce změněny

vlivem působením methylenové modři. Tak dospěli k závěru, že thiazonové jádro methylenové modři je schopno vyvolat redoxní reakce, zajišťuje tak inhibiční aktivitu této sloučeniny a udržuje tau-protein v monomerní podobě. V současné době představuje methylenová modř (včetně jejích derivátů) nejvíce perspektivní látku v oblasti léčby ACH [66,72].

Vědci zkoumají velké množství dalších sloučenin pomocí screeningů a hodnotí jejich schopnost bránit agregaci tau-proteinu. Jako poslední předložil v roce 2009 Crowe a spol. skupinu aminothienopyridazinů k 77 doposud známým chemickým látkám, jejichž účinnost byla klasifikovaná jako vysoká. Struktury jednotlivých látek se však velmi liší, proto není lehké určit jednoznačnou souvislost mezi strukturou látky a její aktivitou. Podle mechanismu působení lze však rozlišit dva základní inhibitory: kovalentní a nekovalentní. Mezi kovalentní patří například oleocanthal. Aldehyd přirozeně se vyskytující v olivovém oleji, který reaguje se zbytkem lysinu. Vznikají tak iminy, které zabraňují fibrilizaci a tím i shromažďování tau-proteinu. Aminothienopyridaziny fungují stejně jako methylenová modř a v důsledku jejich působení dochází k oxidaci cysteinových zbytků. Odlišný mechanismus působení mají i polyfenoly, na kterých můžeme nalézt elektrofilní místa jako následek oxidace. Proto se můžou nukleofilně vázat se zbytky cysteinu, které se pak nemohou účastnit tau agregace [66,71,72].

Nekovalentní inhibitory zasahují především do různých částí fibrilizace. Příkladem je CLR1, který díky reakci s lysinem zabraňuje tvorbě fibril nejen u tau-proteinu, ale všech amyloidních proteinů obecně. Principem účinku ftalocynin-tetrasulfonátu je potom vytvoření rozpustné oligomerní struktury, ve které je tau-protein zablokován [66,71].

Předpokládá se, že vývoj inhibitorů agregace tau-proteinu bude v dalších letech pokračovat velmi slibně. Význam má především možnost využití tau-agregačních modelů, které se dají použít pro screening velkého množství látek. Pouplana a kolektiv nedávno předložili model zaměřený na agregaci beta-amyloidu, jehož principem je jeho barvení v intaktních buňkách *Escherichia coli*. Výhodami této metody jsou její rychlost, nenáročnost, jednoduchost a v neposlední řadě cena. Navíc se dá aplikovat nejen na beta-amyloid, ale i na ostatní amyloidové proteiny včetně tau. Propojením několika modelů by postupem času mohlo dojít k pochopení jak ACH na molekulární úrovni, tak i k vývoji léků a bylo by možné zjednodušit poskytování názoru u předklinických případů [66,71,72].

7 ZÁVĚR

Ve své práci jsem se zabývala tau-proteinem a jeho rolí v Alzheimerově chorobě. Zaměřila jsem se na stručnou historii, fyziologické působení tau-proteinu v mozku, neuropatologii, a především na jeho diagnostiku a metody léčby Alzheimerovy choroby spojené s tímto proteinem.

Alzheimerova choroba je onemocnění mozku vyskytující se hlavně u lidí staršího věku, které se vyznačuje především poklesem kognitivních funkcí jako je paměť, rozhodování, orientace a schopnost učit se.

Tuto chorobu poprvé popsal pan Alois Alzheimer v roce 1906, kdy poprvé určil neurologické změny v mozku, které jsou dnes brány jako hlavní znaky tohoto onemocnění – beta-amyloidové plaky a tvorbu neurofibrilárních spleť.

Tau-protein je polypeptid, který se v lidském mozku vyskytuje v šesti různých isoformách. Ty se liší jednak počtem vazebných míst k tubulinu na karboxylové části a počtem insertů na aminovém konci molekuly. Patří mezi tzv. mikrotubuly-vázající proteiny a jeho hlavní funkcí je vázat se na tubulin, čímž napomáhá stabilizovat neurony. Tau-protein může i za fyziologických podmínek podléhat několika modifikacím. Vedle acetylce, metylace, deamidace či o-glykace je dozajista nejvýznamnější fosforylace. Míra a způsob fosforylace totiž zásadně ovlivňuje funkci tau-proteinu. Hyperfosforylace a abnormální fosforylace vede k tvorbě tzv. dvojšroubovicových vláken, která jsou základem neurofibrilárních spleť.

Právě proto, že je jeden z hlavních elementů týkajících se patologie Alzheimerovy choroby je tau-protein i důležitým diagnostickým markerem a v současné době i jeden z hlavních objektů, kterými se zabývají studie zaměřené na léčbu této nemoci. Spolu s beta-amyloidem vytváří celkový a hyperfosforylovaný tau-protein diagnostický triplet, který se získává z mozkomíšního moku. Metody léčby spojené s tau-proteinem jsou imunoterapeutického charakteru, dále pak spojené se snahou stabilizovat mikrotubuly, zabránit agregaci tau-proteinu a inhibovat tzv. beta-N-acetylglukosaminylici.

Alzheimerova choroba se v současnosti stává v souvislosti se stárnutím populace stále větším problémem. Proto je na metody diagnostiky i její léčby kladen velký důraz.

8 ZDROJE

- [1] KOROLEV, I. Alzheimer's Disease: A Clinical and Basic Science Review. *Medical Student Research Journal*, 2014 [cit. 8.3.2018]. Dostupné z: <http://msrj.chm.msu.edu/wp-content/uploads/2014/12/Fall-2014-Alzheimers-Disease.pdf>
- [2] 2017 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia* [online]. 2017, 13(4), 325-373 [cit. 2018-03-16]. DOI: 10.1016/j.jalz.2017.02.001. ISSN 15525260. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1552526017300511>
- [3] BUÉE, L., DELACOURTE, A. Tau Phosphorylation. *Functional Neurobiology of Aging* [online]. Elsevier, 2001, 2001, s. 315-332 [cit. 2018-03-08]. DOI: 10.1016/B978-012351830-9/50023-8. ISBN 9780123518309. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123518309500238>
- [4] GARG, R. K., MALHOTRA, H. S. a KUMAR, N. Pathophysiology of Acute Disseminated Encephalomyelitis. *Multiple Sclerosis* [online]. Elsevier, 2016, 2016, s. 201-248 [cit. 2018-03-08]. DOI: 10.1016/B978-0-12-800763-1.00010-5. ISBN 9780128007631. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128007631000105>
- [5] CIPRIANI, G., DOLCIOTTI, C., PICCHI, L. a BONUCCELLI, U. Alzheimer and his disease: a brief history. *Neurological Sciences* [online]. 2011, 32(2), 275-279 [cit. 2018-03-16]. DOI: 10.1007/s10072-010-0454-7. ISSN 1590-1874. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10072-010-0454-7>
- [6] BOLLER, F. History of Dementia. *Dementias* [online]. Elsevier, 2008, 2008, s. 3-13 [cit. 2018-03-16]. Handbook of Clinical Neurology. DOI: 10.1016/S0072-9752(07)01201-8. ISBN 9780444518989. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0072975207012018>
- [7] TOODAYAN, N. Professor Alois Alzheimer (1864–1915): Lest we forget. *Journal of Clinical Neuroscience* [online]. 2016, 31, 47-55 [cit. 2018-03-16]. DOI: 10.1016/j.jocn.2015.12.032. ISSN 09675868. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0967586816300029>

- [8] GOEDERT, M., SPILLANTINI, M. G. a CROWTHER, R. A. A Brief History of Tau. *Clinical Chemistry* [online]. 2015, 61(11), 1417-1418 [cit. 2018-03-16]. DOI: 10.1373/clinchem.2015.245142. ISSN 0009-9147. Dostupné z: <http://www.clinchem.org/cgi/doi/10.1373/clinchem.2015.245142>
- [9] FITZPATRICK, A. W. P., FALCON, B., HE, S, et al. Cryo-EM structures of tau filaments from Alzheimer's disease. *Nature*[online]. 2017, 547(7662), 185-190 [cit. 2018-03-18]. DOI: 10.1038/nature23002. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/doi/10.1038/nature23002>
- [10] NAŇKA, O., ELIŠKOVÁ, M. a ELIŠKA, O. *Přehled anatomie. 2., dopl. a přeprac. vyd.* Praha: Galén, c2009. ISBN 978-802-4617-176. (str. 265-274)
- [11] GRIM, M., NAŇKA, O. a HELEKAL, I. *Atlas anatomie člověka.* Praha: Grada, 2017. ISBN 9788024741567. (str. 248-282)
- [12] LOVE, R. J. a WEBB, W. G. *Mozek a řeč: neurologie nejen pro logopedy.* Praha: Portál, 2009. ISBN 9788073674649. (str. 31-54)
- [13] ROČEK Z. *Obecná morfologie živočichů, Kapitola 3 Embryonální původ orgánových soustav a tělních dutin* [online]. Dostupné online z: <http://rocek.gli.cas.cz/Courses/Microsoft%20Word%20-%20Morfologie3.pdf>
- [14] VERNAU, W., VERNAU, K. A. a SUE BAILEY, C. Cerebrospinal Fluid. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals* [online]. Elsevier, 2008, 2008, s. 769-819 [cit. 2018-06-10]. DOI: 10.1016/B978-0-12-370491-7.00026-X. ISBN 9780123704917. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012370491700026X>
- [15] LANGMEIER, M. *Základy lékařské fyziologie.* Praha: Grada, 2009. ISBN 9788024725260. (str. 51-53)
- [16] HAINES, D.E. a MIHAILOFF, G.A. The Telencephalon. *Fundamental Neuroscience for Basic and Clinical Applications* [online]. Elsevier, 2018, 2018, 225-240.e1 [cit. 2018-04-01]. DOI: 10.1016/B978-0-323-39632-5.00016-5. ISBN 9780323396325. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323396325000165>
- [17] SILBERNAGL, S. a DESPOPOULOS, A. *Atlas fyziologie člověka.* 6. vyd., zcela přeprac. a rozš., Vyd. 3. české. Praha: Grada, 2004. ISBN 802470630x. (str. 310)

- [18] GROW, W.A. The Cerebral Cortex. *Fundamental Neuroscience for Basic and Clinical Applications* [online]. Elsevier, 2018, 2018, 468-479.e1 [cit. 2018-04-01]. DOI: 10.1016/B978-0-323-39632-5.00032-3. ISBN 9780323396325. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323396325000323>
- [19] ROKYTA, R., MAREŠOVÁ, D. a TURKOVÁ, Z. *Somatologie: učebnice*. 6. vyd. Praha: Wolters Kluwer, 2014. ISBN 978-80-7357-454-3. (str. 95-101)
- [20] JEFFERY, K. J. The Hippocampus: From Memory, to Map, to Memory Map. *Trends in Neurosciences* [online]. 2018, 41(2), 64-66 [cit. 2018-04-23]. DOI: 10.1016/j.tins.2017.12.004. ISSN 01662236. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166223617302382>
- [21] TAUPIN, P. *The hippocampus: neurotransmission and plasticity in the nervous system*. New York: Nova Biomedical Books, c2007. ISBN 9781600219146. (str. 3)
- [22] BERGER, T. W., SONG, D., H. M. CHAN, R., et al. A Hippocampal Cognitive Prosthesis: Multi-Input, Multi-Output Nonlinear Modeling and VLSI Implementation. *IEEE Transactions on Neural Systems and Rehabilitation Engineering* [online]. 2012, 20(2), 198-211 [cit. 2018-04-23]. DOI:10.1109/TNSRE.2012.2189133. ISSN 1534-4320. Dostupné z: <http://ieeexplore.ieee.org/document/6171067/>
- [23] OREL, M. a PROCHÁZKA, R. *Vyšetření a výzkum mozku: pro psychology, pedagogy a další nelékařské obory*. Praha: Grada, 2017. Psyché (Grada). ISBN 9788024755397. (str. 28)
- [24] LEVITAN, I. B. a KACZMAREK, L. K. *The neuron: cell and molecular biology*. Fourth edition. New York: Oxford University Press, 2015. ISBN 9780199773893. (str. 8-15)
- [25] MIHAILOFF, G.A. a HAINES, D.E. The Cell Biology of Neurons and Glia. *Fundamental Neuroscience for Basic and Clinical Applications*[online]. Elsevier, 2018, 2018, 15-33.e1 [cit. 2018-04-01]. DOI: 10.1016/B978-0-323-39632-5.00002-5. ISBN 9780323396325. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323396325000025>

- [26] JULIEN, R. M. (2005). The neuron, synaptic transmission, and neurotransmitters. In R. M. Julien, *A primer of drug action: A comprehensive guide to the actions, uses, and side effects of psychoactive drugs* (pp. 60-88). New York, NY, USA: Worth Publishers
- [27] HEJNAROVÁ, E. a SLEZÁKOVÁ, L. *Ošetřovatelství pro střední zdravotnické školy*. 2., dopl. vyd. Praha: Grada, 2012. Sestra (Grada). ISBN 9788024736013. (str. 152)
- [28] KOUKOLÍK, F. a JIRÁK, R. *Alzheimerova nemoc a další demence*. Praha: Grada, 1998. ISBN 80-7169-615-3. (str. 89-117, 213-225)
- [29] *Zpráva o stavu demence*. Praha: Česká Alzheimerovská společnost, 2014. ISBN 978-80-86541-50-1. (str. 9)
- [30] RABOCH, J. a PAVLOVSKÝ, P. *Psychiatrie*. Praha: Karolinum, 2012. ISBN 9788024619859. (str. 175–178)
- [31] DUŠEK, K. a VEČEŘOVÁ-PROCHÁZKOVÁ, A. *Diagnostika a terapie duševních poruch*. Praha: Grada, 2010. Psyché (Grada). ISBN 8024716208. (str. 184-186)
- [32] STRAUBE, A. Microtubules and Microtubule-Associated Proteins (MAPs). *Encyclopedia of Cell Biology* [online]. Elsevier, 2016, 2016, s. 539-547 [cit. 2018-04-17]. DOI: 10.1016/B978-0-12-394447-4.20054-0. ISBN 9780123947963. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123944474200540>
- [33] CASSIMERIS, L. Microtubule Associated Proteins in Neurons. *Encyclopedia of Neuroscience* [online]. Elsevier, 2009, 2009, s. 865-870 [cit. 2018-04-17]. DOI: 10.1016/B978-008045046-9.00725-7. ISBN 9780080450469. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780080450469007257>
- [34] SERGEANT, N., DELACOURTE, A. a BUÉE, L. Tau protein as a differential biomarker of tauopathies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* [online]. 2005, 1739(2-3), 179-197 [cit. 2018-04-17]. DOI: 10.1016/j.bbadis.2004.06.020. ISSN 09254439. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925443904001127>

- [35] AVILA, J., JIMÉNEZ, J. S., SAYAS, C. L., BOLÓS, M., ZABALA, J. C., RIVAS, G. a HERNÁNDEZ, F. Tau Structures. *Frontiers in Aging Neuroscience* [online]. 2016, 8, - [cit. 2018-04-17]. DOI: 10.3389/fnagi.2016.00262. ISSN 1663-4365. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnagi.2016.00262/full>
- [36] BUÉE, L., BUSSIÈRE, T., BUÉE-SCHERRER, V., DELACOURTE, A. a R. HOF, P. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Research Reviews* [online]. 2000, 33(1), 95-130 [cit. 2018-04-19]. DOI: 10.1016/S0165-0173(00)00019-9. ISSN 01650173. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165017300000199>
- [37] KOLAROVA, M., GARCÍA-SIERRA, F., BARTOS, A., RICNY, J. a RIPOVA, D. Structure and Pathology of Tau Protein in Alzheimer Disease. *International Journal of Alzheimer's Disease* [online]. 2012, 2012, 1-13 [cit. 2018-04-17]. DOI: 10.1155/2012/731526. ISSN 2090-8024. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/ijad/2012/731526/>
- [38] TOLNAY, M. a PROBST A. REVIEW: tau protein pathology in Alzheimer's disease and related disorders. *Neuropathology and Applied Neurobiology* [online]. 1999, 25(3), 171-187 [cit. 2018-04-28]. DOI: 10.1046/j.1365-2990.1999.00182.x. ISSN 0305-1846. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2990.1999.00182.x>
- [39] GONG, C.-X. a IQBAL K. Hyperphosphorylation of Microtubule-Associated Protein Tau: A Promising Therapeutic Target for Alzheimer Disease. *Current Medicinal Chemistry* [online]. 2008, 15(23), 2321-2328 [cit. 2018-05-07]. DOI: 10.2174/092986708785909111. ISSN 09298673. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2656563/>
- [40] FRIEDHOFF, P., VON BERGEN, M., MANDELKOW, E.-M. a MANDELKOW, E. Structure of tau protein and assembly into paired helical filaments. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* [online]. 2000, 1502(1), 122-132 [cit. 2018-05-07]. DOI: 10.1016/S0925-4439(00)00038-7. ISSN 09254439. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925443900000387>
- [41] ŠIMIC, G., BABIĆ LEKO, M., WRAY, S. et al. Tau Protein Hyperphosphorylation and Aggregation in Alzheimer's Disease and Other

- Tauopathies, and Possible Neuroprotective Strategies. *Biomolecules* [online]. 2016, 6(1), 6- [cit. 2018-05-07]. DOI: 10.3390/biom6010006. ISSN 2218-273X. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2218-273X/6/1/6>
- [42] BRION, J.-P. Neurofibrillary Tangles and Alzheimer's Disease. *European Neurology* [online]. 1998, 40(3), 130-140 [cit. 2018-05-07]. DOI: 10.1159/000007969. ISSN 0014-3022. Dostupné z: <https://www.karger.com/Article/FullText/7969>
- [43] PERL, D. P. Neuropathology of Alzheimer's Disease. *Mount Sinai Journal of Medicine: A Journal of Translational and Personalized Medicine* [online]. 2010, 77(1), 32-42 [cit. 2018-05-09]. DOI: 10.1002/msj.20157. ISSN 00272507. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/msj.20157>
- [44] SERRANO-POZO, A., FROSCH, M. P., MASLIAH, E. a HYMAN, B. T. Neuropathological Alternations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor Perspective in Medicine*. 2011, 1-23. Dostupné z: <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/content/1/1/a006189.full>
- [45] FORLENZA, O. V., RADANOVIC, M., TALIB, L. L., APRAHAMIAN, I., DINIZ, B. S., ZETTERBERG, H. a GATTAZ, W. F.. Cerebrospinal fluid biomarkers in Alzheimer's disease: Diagnostic accuracy and prediction of dementia. *Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring* [online]. 2015, 1(4), 455-463 [cit. 2018-05-09]. DOI: 10.1016/j.dadm.2015.09.003. ISSN 23528729. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352872915000731>
- [46] HAMPEL, H., BLENNOW, K., SHAW, L. M., HOESSLER, Y. C., ZETTERBERG, H. a TROJANOWSKI, J. Q. Total and phosphorylated tau protein as biological markers of Alzheimer's disease. *Experimental Gerontology* [online]. 2010, 45(1), 30-40 [cit. 2018-05-09]. DOI: 10.1016/j.exger.2009.10.010. ISSN 05315565. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0531556509002071>
- [47] KOUDELKOVÁ M., Diagnostika Alzheimerovy demence prostřednictvím proteinu tau, fosfo-tau a beta-amyloidu v mozkomíšním moku. *Laboratoř pro likvorologii a neuroimunologii, Topalex s.r.o., expertní pracoviště SEKK,*

- Ústřední vojenská nemocnice Praha, 2010 [cit. 9.5.2018]. Dostupné online z: <http://objednavky.roche-diagnostics.cz/download/la/0210/Alzheimer.pdf>
- [48] BLENNOW, K. a HAMPEL, H. CSF markers for incipient Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology* [online]. 2003, 2(10), 605-613 [cit. 2018-05-31]. DOI: 10.1016/S1474-4422(03)00530-1. ISSN 14744422. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1474442203005301>
- [49] GIBBONS, G. S, BANKS, R. A., KIM, B., et al. Detection of Alzheimer Disease (AD)-Specific Tau Pathology in AD and NonAD Tauopathies by Immunohistochemistry With Novel Conformation-Selective Tau Antibodies. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* [online]. 2018, 77(3), 216-228 [cit. 2018-06-01]. DOI: 10.1093/jnen/nly010. ISSN 0022-3069. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jnen/article/77/3/216/4839220>
- [50] GHOSHAL, N., GARCÍA-SIERRA, F., FU, Y., BECKETT, L. A., MUFSON, E. J., KURET, J., BERRY, R. W. a BINDER, L. I. Tau-66: evidence for a novel tau conformation in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry* [online]. 2001, 77(5), 1372-1385 [cit. 2018-06-01]. DOI: 10.1046/j.1471-4159.2001.00346.x. ISSN 00223042. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1471-4159.2001.00346.x>
- [51] LICHTENBERG-KRAAG, B., MANDELKOW, E. M., BIERNAT, J., STEINER, B., SCHROTER, C., GUSTKE, N., MEYER, H. E. a MANDELKOW, E. Phosphorylation-dependent epitopes of neurofilament antibodies on tau protein and relationship with Alzheimer tau. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 1992, 89(12), 5384-5388 [cit. 2018-06-01]. DOI: 10.1073/pnas.89.12.5384. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.89.12.5384>
- [52] MERCKEN, M., VANDERMEEREN, M., LÜBKE, U., SIX, J., BOONS, J., VAN DE VOORDE, A., MARTIN, J.-J. a GHEUENS, J. Monoclonal antibodies with selective specificity for Alzheimer Tau are directed against phosphatase-sensitive epitopes. *Acta Neuropathologica* [online]. 1992, 84(3), 265-272 [cit. 2018-06-01]. DOI: 10.1007/BF00227819. ISSN 0001-6322. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00227819>

- [53] SZENDREI, G. I., LEE, V. M.-Y. a OTVOS, L. Recognition of the minimal epitope of monoclonal antibody Tau-1 depends upon the presence of a phosphate group but not its location. *Journal of Neuroscience Research* [online]. 1993, 34(2), 243-249 [cit. 2018-06-01]. DOI: 10.1002/jnr.490340212. ISSN 0360-4012. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jnr.490340212>
- [54] SLOVÁKOVÁ, M., BÍLKOVÁ, Z. a KORECKÁ, L. *Vybraná laboratorní cvičení z imunoanalytických metod*. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2013. ISBN 978-80-7395-610-3. (str. 79-83)
- [55] TOWBIN, H. Western Blotting. *Encyclopedia of Immunology* [online]. Elsevier, 1998, 1998, s. 2503-2507 [cit. 2018-06-01]. DOI: 10.1006/rwei.1999.0633. ISBN 9780122267659. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B0122267656006496>
- [56] BOOTHROYD, P. a PHẠM, X. N. *Socioeconomic renovation in Viet Nam: the origin, evolution, and impact of doi moi*. Singapore: Institute of Southeast Asian Studies, 2000.
- [57] BARTŮŇKOVÁ, J. a PAULÍK, M. *Vyšetřovací metody v imunologii*. 2., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2011. ISBN 9788024735337. (str. 41-44)
- [58] LAURELL, A.-B. Immunoelectrophoresis. *Encyclopedia of Immunology* [online]. Elsevier, 1998, 1998, s. 1292-1297 [cit. 2018-06-06]. DOI: 10.1006/rwei.1999.0332. ISBN 9780122267659. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B0122267656003443>
- [59] LAMPREAVE, F., PINEIROÑEIRO, M. CARMONA, S. a ALAVA, M.A. ELECTROPHORESIS – Immunoelectrophoresis. *Encyclopedia of Separation Science* [online]. Elsevier, 2000, 2000, s. 1257-1263 [cit. 2018-06-06]. DOI: 10.1016/B0-12-226770-2/03641-3. ISBN 9780122267703. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B0122267702036413>
- [60] BANGA, J. P. SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-Page). *Encyclopedia of Immunology* [online]. Elsevier, 1998, 1998, s. 2143-2144 [cit. 2018-06-06]. DOI: 10.1006/rwei.1999.0541. ISBN 9780122267659. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B0122267656005570>

- [61] LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* [online]. 1970, 227(5259), 680-685 [cit. 2018-06-06]. DOI: 10.1038/227680a0. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/227680a0>
- [62] THONGHIN, N., KARGAS, V., CLEWS, J. a FORD, R. C. Cryo-electron microscopy of membrane proteins. *Methods* [online]. 2018, - [cit. 2018-06-08]. DOI: 10.1016/j.ymeth.2018.04.018. ISSN 10462023. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046202317303742>
- [63] REGNIER, F. E. a CHO, W. Affinity Targeting Schemes for Biomarker Research. *Proteomic and Metabolomic Approaches to Biomarker Discovery* [online]. Elsevier, 2013, 2013, s. 197-224 [cit. 2018-06-08]. DOI: 10.1016/B978-0-12-394446-7.00013-3. ISBN 9780123944467. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123944467000133>
- [64] HERMANSON, G. T. Immobilization of Ligands on Chromatography Supports. *Bioconjugate Techniques* [online]. Elsevier, 2013, 2013, s. 589-740 [cit. 2018-06-08]. DOI: 10.1016/B978-0-12-382239-0.00015-7. ISBN 9780123822390. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123822390000157>
- [65] BREWER, G. J. Treatment of Alzheimer's Disease. *Environmental Causes and Prevention Measures for Alzheimer's Disease* [online]. Elsevier, 2018, 2018, s. 119-126 [cit. 2018-06-14]. DOI: 10.1016/B978-0-12-811162-8.00013-5. ISBN 9780128111628. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128111628000135>
- [66] JOUANNE, M., RAULT, S. a VOISIN-CHIRET, A.-S. Tau protein aggregation in Alzheimer's disease: An attractive target for the development of novel therapeutic agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2017, 139, 153-167 [cit. 2018-06-14]. DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.07.070. ISSN 02235234. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0223523417305925>
- [67] JAZVINŠČAK JEMBREK, M., SLADE, N., HOF, P. R. a ŠIMIĆ, G. The interactions of p53 with tau and A β as potential therapeutic targets for Alzheimer's disease. *Progress in Neurobiology* [online]. 2018, - [cit. 2018-06-14]. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2018.05.001. ISSN 03010082. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301008217301880>

- [68] PEDERSEN, J. T. a SIGURDSSON, E. M. Tau immunotherapy for Alzheimer's disease. *Trends in Molecular Medicine* [online]. 2015, 21(6), 394-402 [cit. 2018-06-22]. DOI: 10.1016/j.molmed.2015.03.003. ISSN 14714914. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471491415000581>
- [69] BAAS, P. W. Microtubule Stability in the Axon: New Answers to an Old Mystery. *Neuron* [online]. 2013, 78(1), 3-5 [cit. 2018-06-24]. DOI: 10.1016/j.neuron.2013.03.012. ISSN 08966273. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627313002596>
- [70] SHORT, B. Bringing stability to microtubules. *The Journal of Cell Biology* [online]. 2009, 185(7), 1130.1-1130 [cit. 2018-06-24]. DOI: 10.1083/jcb.1857iti1. ISSN 0021-9525. Dostupné z: <http://www.jcb.org/lookup/doi/10.1083/jcb.1857iti1>
- [71] BULIC, B., PICKHARDT, M., MANDELKOW, E.-M. a MANDELKOW, E. Tau protein and tau aggregation inhibitors. *Neuropharmacology* [online]. 2010, 59(4-5), 276-289 [cit. 2018-06-24]. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2010.01.016. ISSN 00283908. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0028390810000304>
- [72] WISCHIK, C. M., HARRINGTON, C. R. a STOREY, J. M. D. Tau-aggregation inhibitor therapy for Alzheimer's disease. *Biochemical Pharmacology* [online]. 2014, 88(4), 529-539 [cit. 2018-06-24]. DOI: 10.1016/j.bcp.2013.12.008. ISSN 00062952. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006295213007612>