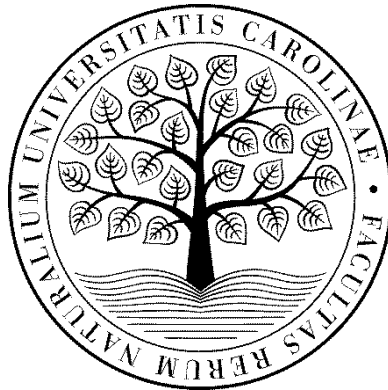


**UNIVERZITA KARLOVA**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Fyziologie živočichů



**Bc. Petra Pohanová**

**Úloha m<sup>6</sup>A dráhy v regulaci kognitivních funkcí u potkanů  
v modelech Alzheimerovy choroby a kalorické restrikce**

The role of m<sup>6</sup>A pathway in regulation of cognitive function  
in a rat model of Alzheimer's disease and caloric restriction

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Školitel: Mgr. Petr Telenský, Ph.D.

Praha 2019

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze 9. 8. 2019

.....

## **Poděkování**

Na tomto místě chci poděkovat Mgr. Petrovi Telenskému, PhD. Za vedení diplomového projektu a pracovníkům a studentům z jeho laboratoře, kteří věnovali svůj čas, aby mě naučili jednotlivé metody.

Také bych chtěla poděkovat celému týmu laboratoří RNDr. Jiřího Novotného, DSc., a MUDr. Karla Ježka, PhD. za možnost vypracování části projektu v zázemí jejich laboratoře.

V neposlední řadě patří dík i mé rodině a přátelům, kteří mě ve studiu podporovali.

## **Abstrakt**

Reverzibilní metylace adenosinu (N6-metyladenosin; m<sup>6</sup>A) na úrovni molekuly RNA byla popsána v souvislosti s regulací osudu mRNA. Dráha N6-metyladenosinu má význam pro kognitivní funkce a mechanismy spojené s pamětí, včetně regulace adultní neurogeneze a synaptické plasticity.

Cílem práce bylo ověřit hypotézu, že snížená funkce RNA-demetylázy FTO může být asociována se zlepšením kognitivních funkcí potkana. RNA-demetyláza FTO je významným regulátorem m<sup>6</sup>A dráhy. Inhibice FTO bylo v naší studii dosaženo podáváním farmakologického inhibitoru MO-I-500 transgenním potkanům TgF344-AD, které vedlo ke zlepšení v testech prostorové orientace. Dalším cílem experimentální práce bylo prozkoumat kognitivní enhancement navozený kalorickou restrikcí jako možný kompenzační mechanismus kognitivních poruch a jeho vliv na proteiny regulující dráhu N6-metyladenosinu. Kalorická restrikce navodila zlepšení kognitivních schopností a pozorované změny exprese hlavních proteinů regulujících m<sup>6</sup>A dráhu (FTO, METTL3) jsou v souladu s uvedenou hypotézou.

Přestože neznáme přesný mechanismus působení, tyto nálezy podporují hypotézu, že regulátory m<sup>6</sup>A dráhy např. protein demetyláza FTO mohou být potenciální molekulární cíl pro farmakologické ovlivnění kognitivních funkcí.

## **Klíčová slova**

Mozek, Alzheimerova choroba, FTO, transgenní model TgF344-AD, kalorická restrikce, N6-metyladenosin

## **Abstract**

Reversible adenosine methylation (N6-methylation; m<sup>6</sup>A) at the RNA level was described in connection to the regulation of RNA fate. The N6-methyladenosine pathway is important for cognitive function and mechanisms related to memory, including the regulation of adult neurogenesis and synaptic plasticity.

The objective of this study was to test the hypothesis that a decreased activity of the RNA-demethylase FTO is associated with improved cognitive function in rats. The RNA-demethylase FTO is a key regulator of the m<sup>6</sup>A pathway. In this study, we administered MO-I-500, a pharmacological inhibitor of FTO in TgF344-AD transgenic rats, which resulted in an improvement of spatial cognition. We further investigated the cognitive enhancement induced by a caloric restriction as a possible compensatory mechanism of cognitive disorders and its effect on the proteins regulating the N6-methyladenosine pathway. Long-term caloric restriction ameliorated cognitive functions and led to changes in the expression of the major proteins controlling the m<sup>6</sup>A pathway (FTO, METTL3) which are consistent with the aforementioned hypothesis.

Although we do not know the exact mechanism of action, these findings support the hypothesis that m<sup>6</sup>A pathway regulators, such as the FTO demethylase, may be a promising molecular target for pharmacological amelioration of cognitive function.

## **Key words**

Brain, Alzheimer disease, FTO, TgF344-AD rats, caloric restriction, N<sup>6</sup>-methyladenosine

# Obsah

## LITERÁRNÍ ČÁST

1 Úvod.....	1
2 m <sup>6</sup> A dráha v regulaci osudu RNA.....	2
2.1 Proteiny asociované s metyltransferázovou aktivitou.....	4
2.2 Proteiny s demetylázovou aktivitou.....	5
2.3 Proteiny rozpoznávající m <sup>6</sup> A modifikaci.....	6
3 Alzheimerova choroba.....	8
3.1 Molekulární podstata Alzheimerovy choroby.....	10
3.2 Animální modely AD.....	11
3.2.1 Vybrané animální transgenní modely AD.....	11
3.2.2 Vybrané animální modely s chemicky indukovanou AD.....	13
3.3 Souvislost mezi hladinou m <sup>6</sup> A a AD.....	14
4 Kalorická restrikce.....	15
5 Behaviorální úlohy zaměřené na testování deklarativní paměti u zvířat.....	16
5.1 Úloha aktivního vyhýbání se místu.....	16

## EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

6 Cíle experimentální práce.....	18
7 Materiál.....	19
7.1 Zvířata.....	19
7.2 Přístroje a nástroje.....	19
7.3 Chemikálie.....	20
7.4 Roztoky a pufry.....	20
7.5 Inhibitory.....	21
7.6 Protilátky.....	21
7.6.1 Primární.....	21
7.6.2 Sekundární.....	22
7.7 Software.....	22
8 Metodika.....	23
8.1 Ověření zrakových funkcí.....	23
8.2 Inhibice RNA-demetylázy FTO.....	24
8.3 Behaviorální úlohy.....	24
8.3.1 Test otevřeného pole.....	24
8.3.2 Vyvýšené kruhové bludiště.....	24
8.3.3 Aktivní vyhýbání se místu.....	25
8.3.4 Test nuceného plavání.....	25
8.4 Statistická analýza behaviorálních úloh.....	26
8.5 Model kalorické restrikce.....	26

8.6 Odběr tkání.....	26
8.7 Homogenizace .....	27
8.8 Stanovení koncentrace proteinů metodou BCA.....	27
8.9 Příprava vzorků .....	28
8.10 Rozdělení proteinů pomocí SDS-PAGE .....	28
8.11 Immunoblotting .....	29
8.12 Vyvolávání filmu .....	30
8.13 Opakované použití membrány.....	30
8.14 Softwarové vyhodnocení.....	30
8.15 Stanovení proteinové exprese.....	31
8.16 Statistická analýza proteinové exprese .....	31
9 Výsledky .....	32
9.1 Vliv aplikace MO-I-500 na chování a paměť v potkaním transgenním modelu Alzheimerovy choroby TgF344 AD .....	32
9.1.1 Vliv MO-I-500 v testu otevřeného pole u potkaních samců TgF344-AD .....	32
9.1.2 Vliv MO-I-500 v testu vyvýšeného kruhového bludiště u potkaních samců TgF344-AD.....	34
9.1.3 Vliv MO-I-500 v testu nuceného plavání u potkaních samců TgF344-AD .....	35
9.1.4 Vliv MO-I-500 v testu otevřeného pole u potkaních samic TgF344-AD .....	35
9.1.5 Vliv MO-I-500 v testu AAPA u potkaních samic TgF344-AD .....	37
9.1.6 Vliv MO-I-500 v testu AAPA u potkaních samic F344 .....	39
9.2 Vliv kalorické restrikce na chování a paměť v potkaním modelu F344 .....	40
9.2.1 Vliv kalorické restrikce v testu otevřeného pole u potkanů F344 .....	40
9.2.2 Vliv kalorické restrikce v testu AAPA u potkanů F344.....	42
9.3 Vliv kalorické restrikce na změny exprese proteinů m <sup>6</sup> A dráhy u potkanů F344 .....	44
9.3.1 Vliv kalorické restrikce na změny exprese FTO u potkanů F344 .....	44
9.3.2 Vliv kalorické restrikce na změny exprese METTL3 u potkanů F344 .....	45
9.3.3 Vliv kalorické restrikce na změny exprese YTHDF1 u potkanů F344 .....	45
10 Diskuze.....	47
10.1 Vliv inhibitoru MO-I-500 na chování v behaviorálních testech u potkanů TgF344-AD .....	47
10.2 Vliv kalorické restrikce na projevy potkanů F344 v behaviorálních testech.....	49
10.3 Vliv kalorické restrikce na změny exprese proteinů spřažených s m <sup>6</sup> A dráhou u F344 potkanů .....	50
11 Závěr .....	52
Přehled literatury.....	53
Primární zdroje .....	53
Sekundární zdroje .....	60
Seznam použitých zkratk.....	61

## LITERÁRNÍ PŘEHLED



# 1 Úvod

Klasický pohled na genetickou informaci v organismu zakódovanou v posloupnosti bází DNA reprezentovaný ústředním dogmatem molekulární genetiky byl v průběhu let rozšířen o další mechanismy. Modifikace chromozomů, které ovlivňují expresi genů, ale nejsou kódovány primární sekvencí DNA, se nazývají epigenetická regulace. K mechanismům epigenetické regulace patří např. metylace DNA či modifikace histonů.

Kromě epigenetiky ale existuje i další mechanismus, jak ovlivnit expresi proteinů nebo alternativní sestřih mRNA. Tím je epitranskriptomická regulace, neboli též RNA epigenetika (Schubert, 2019). Exprese proteinů je v tomto případě regulována pomocí postranskripčních modifikací bází na úrovni molekuly RNA.

Jednou z takovýchto významných epitranskriptomických regulací je dynamický proces metylace adenosinu za vzniku N6-metyladenosinu ( $m^6A$ ), který prostřednictvím RNA vázajících proteinů ovlivňuje další osud mRNA. Regulace pomocí N6-metyladenosinu se uplatňuje v mnoha procesech organismu od regulace buněčné diferenciaci, cirkadiánní rytmicity přes ovlivnění HPA osy až po regulaci energetického metabolismu. Za zmínku stojí i podíl na vývoji mozku, neurogenезi a v paměťových funkcích. Zájem o protein FTO, jeden z regulujících proteinů  $m^6A$  dráhy, zesílil po nález souvislosti mezi zvýšenou expresí tohoto proteinu a rizikem rozvoje obezity. Později bylo zjištěno, že se tato dráha může uplatňovat v etiologii poruch, jako jsou diabetes mellitus 2. typu, kardiovaskulární onemocnění, deprese či Alzheimerova choroba.

Především souvislost mezi  $m^6A$  drahou a Alzheimerovou chorobou by mohla být důležitá, protože i přes dlouholetý výzkum zaměřený především na metabolismus  $\beta$  amyloidu neexistuje dosud onemocnění modifikující léčba.  $m^6A$  dráha a proteiny spřažené s její regulací by mohly být vhodným cílem zájmu při hledání molekulárního cíle pro léčbu této choroby.

Ve své práci se zabývám vlivem  $m^6A$  dráhy na kognitivní funkce u potkaního modelu Alzheimerovy choroby a v modelu kalorické restrikce.

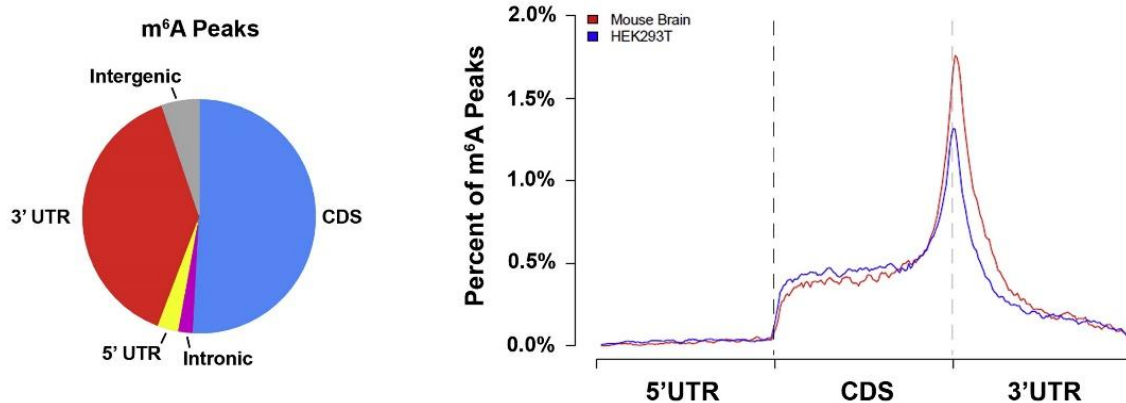
## 2 m<sup>6</sup>A dráha v regulaci osudu RNA

Na molekulární úrovni existuje několik způsobů, kterými může být regulována genová exprese, aniž by byla změněna primární sekvence genetické informace. Jedním z nich je regulace pomocí funkčních skupin, např. metylu či acetylu, které mohou být reverzibilně připojeny k molekule.

Mezi způsoby modulace DNA patří např. metylace DNA nebo fosforylace a acetylace histonů, které se projevují změnou dostupnosti sekvence bází v chromatinovém vlákne. Tímto mechanismem je řízena např. inaktivace chromozomu X v ženském organismu (Chow *et al.*, 2007).

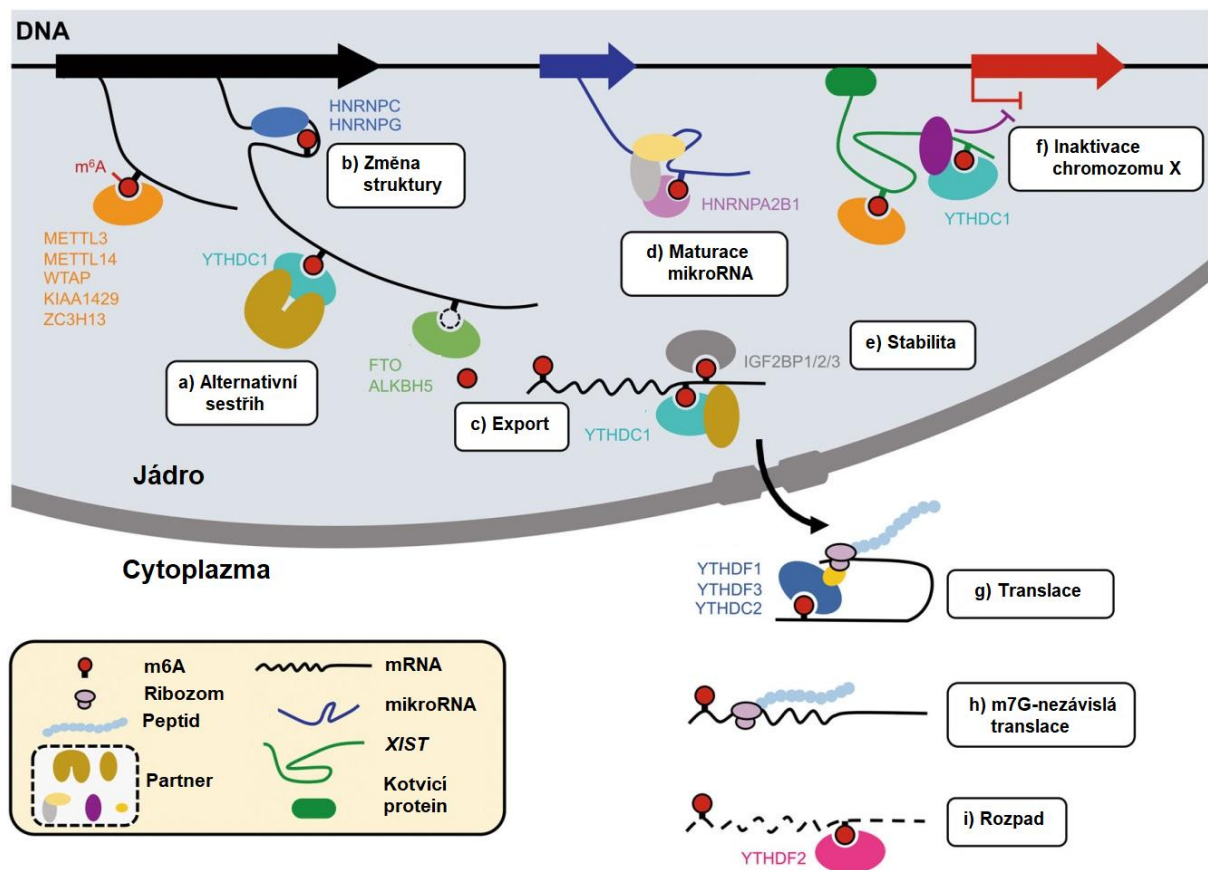
V rámci molekuly RNA je exprese genu ovlivněna epitranskriptomickými značkami, které jsou analogické k epigenetickým značkám na DNA. Mezi epitranskriptomické modifikace RNA patří nejčastěji metylace adenosinu na různých místech báze např. N6-metyladenosin (m<sup>6</sup>A; Wei *et al.*, 1975), N1-metyladenosin (m<sup>1</sup>A; Dominissini *et al.*, 2016), N6,2'-O-dimetyladenosin (m<sup>6</sup>Am; Linder *et al.*, 2015) nebo metylace cytosinu 5-metylcytosin (m<sup>5</sup>C; Desrosiers *et al.*, 1974) a jeho další přeměna na 5-hydroxymetylcytosin (hm<sup>5</sup>C; Fu *et al.*, 2014). Tyto a další modifikace se vyskytují u různých typů RNA (lncRNA, mRNA, tRNA, rRNA).

Methylace N6-metyladenosinu (m<sup>6</sup>A) na molekule mRNA je jedna z nejčastějších a nejdéle známých modifikací (Wei *et al.*, 1975). m<sup>6</sup>A se na molekule mRNA vyskytuje s největší pravděpodobností v okolí stop kodónů – na rozhraní mezi kódující oblastí a 3' nepřekládanou oblastí. Celkově lze nalézt největší množství m<sup>6</sup>A v kódujících oblastech viz obrázek 1 (Meyer *et al.*, 2012; Dominissini *et al.*, 2012).



**Obrázek 1. Distribuce m<sup>6</sup>A modifikace v mRNA.** Graf vlevo znázorňuje procentuální podíl výskytu m<sup>6</sup>A v transkriptu. 3' nepřekládaná oblast (3' UTR) je označena tmavě červenou barvou, kódující oblast (CDS) je vyznačena modrou barvou. Šedě jsou vyznačeny mezigenové oblasti (intergenic), žlutě je vyznačena 5' nepřekládaná oblast (5' UTR) a fialově introny (intronic). Vpravo je znázorněna míra obohacení úseku RNA o m<sup>6</sup>A. Červená čára značí data získaná analýzy myšního mozku, modrou barvou jsou zaneseny výsledky získané z buněk HEK293T. Na ose x jsou znázorněny úseky 5' UTR, CDS a 3' UTR. Upraveno podle Meyer *et al.* (2012).

m<sup>6</sup>A modifikace adenosinu je dynamicky regulována různými typy proteinů. Jsou to metyltransferázy např. METTL3 a METTL14, které katalyzují připojení metylové skupiny. Dalšími jsou demethylázy FTO a ALKBH5, které metylovou značku odstraňují. RNA obohacenou o m<sup>6</sup>A rozpoznávají i jiné proteiny a ribonukleoproteiny, které ovlivňují lokalizaci, stabilitu, translaci či degradaci mRNA (viz obrázek 2).



**Obrázek 2. Schéma regulace osudu mRNA m<sup>6</sup>A dráhou.** N6-metylce adenosinu je na obrázku znázorněna červeným kolečkem. Adenosin je k molekule mRNA připojován metyltransferázami (METTL3, METTL14, WTAP, KIAA1429, ZC3H13). Na jeho odstraňování se podílí FTO a ALKBH5. Metylovaný adenosin rozpoznávají čtecí proteiny s rozdílnými funkcemi např. jaderný YTHDC1 (viz 2a, 2c, 2f), HNRNPC a HNRNPG (viz 2b), HNRNPA2B1 (viz 2d), IGF2BP1 (viz 2e) nebo cytozolický YTHDF1, YTHDF3, YTHDC2 (viz 2g) a YTHDF2 (viz 2h, 2i). Upraveno podle Yang *et al.* (2018).

## 2.1 Proteiny asociované s metyltransferázovou aktivitou

Tvorbu N6-metyladenosinu na mRNA realizuje tzv. metyltransferázový komplex tvořený katalytickou podjednotkou - proteinem Methyltransferase Like 3 (METTL3) a regulačními podjednotkami Methyltransferase Like 14 (METTL14; Liu *et al.*, 2014), Wilms Tumor 1 Associated Protein (WTAP; Ping *et al.*, 2014) a KIAA1429 (Schwartz *et al.*, 2014).

Bylo prokázáno, že proteiny METTL3 i METTL14 vykazují samostatně slabou metyltransferázovou aktivitu *in vitro*. Pokud však tyto dva proteiny vytvoří komplex, katalytická aktivita METTL3 je proteinem METTL14 podpořena. METTL14 navíc pomáhá připojení komplexu k mRNA (J. Liu *et al.*, 2014).

Mezi regulační podjednotky metyltransferázového komplexu patří jaderný protein WTAP, který postrádá metyltransferázovou doménu, proto nevykazuje žádnou katalytickou aktivitu na m<sup>6</sup>A. Úlohou proteinu WTAP je navést metyltransferázový komplex

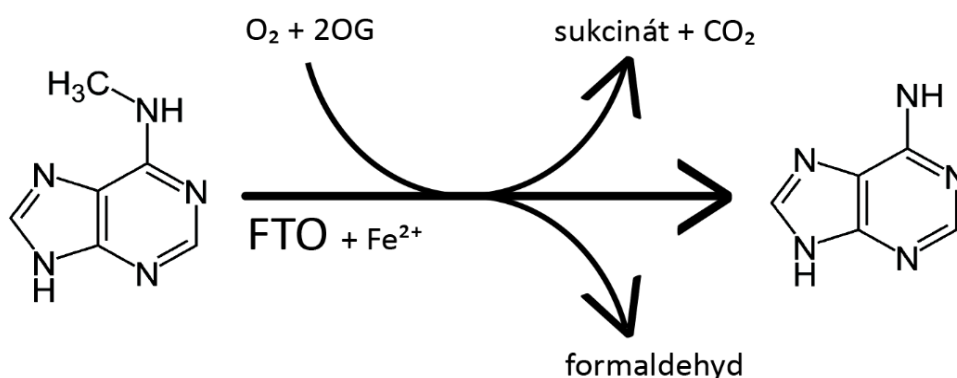
do tzv. jaderných skvrn a napomoci vazbě RNA ke komplexu METTL3/METTL14. Tyto skvrny se nachází v buněčném jádře a slouží ke shlukování faktorů nutných pro alternativní sestřih intronů. Regulace alternativního sestřihu pre-mRNA je zároveň další z funkcí dráhy m<sup>6</sup>A (viz obrázek 2) (Ping *et al.*, 2014; J. Liu *et al.*, 2014).

Další regulační podjednotkou je protein KIAA1429. Ten se podílí spolu s WTAP na alternativním sestřihu pre-mRNA, jak bylo dokázáno u *Drosophila melanogaster* (Ortega *et al.*, 2003). Podjednotka KIAA1429 je pro správnou funkci metyltransferázového komplexu velmi důležitá, protože navádí metyltransferázový komplex do metylovaných míst na mRNA (Yue *et al.*, 2018) a bez její aktivity se podíl m<sup>6</sup>A modifikací v transkriptomu až 4krát snižuje (Schwartz *et al.*, 2014).

## 2.2 Proteiny s demethylázovou aktivitou

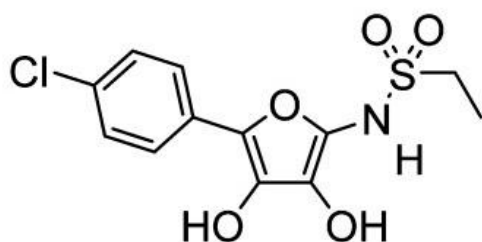
Proteiny, které odstraňují metylaci m<sup>6</sup>A z mRNA se nazývají demethylázy. Patří mezi ně RNA-demethyláza FTO (FTO) nebo protein ALKBH5.

RNA-demethyláza FTO (fat mass and obesity associated protein; protein FTO) působí se svou demethylázovou aktivitou primárně na m<sup>6</sup>A modifikaci molekuly mRNA. Tento protein patří do rodiny 2-oxoglutarát dependentních dioxygenáz. Ke své funkci (viz obrázek 3) využívá FTO železnatého kationtu jako kofaktoru a za přítomnosti kyslíku a 2-oxoglutarátu odstraňuje metylový zbytek z molekuly. Výsledkem reakce je adenosin a molekula sukcinátu, oxidu uhličitého a formaldehydu (Jia *et al.* 2011).



**Obrázek 3. Demethylázová reakce katalyzovaná FTO.** Vlevo je molekula metylovaného adeninu na funkční skupině šestého uhlíku (m<sup>6</sup>A), vpravo je výsledný produkt reakce – adenin. FTO pracuje spolu s kofaktorem železnatého kationtu (Fe<sup>2+</sup>) a za přítomnosti kyslíku (O<sub>2</sub>) a 2-oxoglutarátu (2OG). Kromě adeninu vystupují z reakce sukcinát a oxid uhličitý (CO<sub>2</sub>) a formaldehyd.

RNA-demetyláza FTO může být farmakologicky inhibována. Jednou z látek s touto schopností je látka zvaná MO-I-500 (viz obrázek 4). Ta má obdobnou strukturu jako kyselina L-askorbová (vitamin C) a je i stejně polárně nabitá, což umožňuje využít specifické sodno-vitamin C-kotransportéry SVCT1 a SVCT2, které se vyskytují i v hematoencefalické bariéře (HEB). Tyto přenašeče fyziologicky umožňují procházet molekule kyseliny L-askorbové skrze membránu výměnou za 2 sodné ionty (Wilson *et al.*, 1991). Nízký polární náboj na povrchu MO-I-500 umožňuje projít HEB, současně silný negativní náboj umožňuje vázat se do aktivního místa namísto 2OG (Zheng *et al.*, 2014).



**Obrázek 4. Strukturní vzorec farmakologického inhibitoru MO-I-500.** Převzato ze Zheng *et al.* (2014).

Protein ALKBH5 patří stejně jako protein FTO do skupiny 2-oxoglutarát dependentních dioxygenáz a katalyticky odštěpuje metylovou skupiny z m<sup>6</sup>A. ALKBH5 se v buňce nachází v jádře. Při jeho nedostatku dochází k úbytku ribonukleových kyselin obohacených o polyadenylový řetězec, jenž je důležitý pro export jaderné RNA a stabilitu molekuly. Regulace m<sup>6</sup>A pomocí ALKBH5 ovlivňuje jaderný export mRNA. V těle myši je ALKBH5 exprimován v centrální nervové soustavě (CNS) i na periférii. Velké množství tohoto proteinu je tvořeno ve varlatech, kde se regulací m<sup>6</sup>A podílí na spermatogenezi (Zheng *et al.*, 2013).

### 2.3 Proteiny rozpoznávající m<sup>6</sup>A modifikaci

N<sup>6</sup>-metylovaný adenosin ovlivňuje další osud mRNA pomocí tzv. čtecích molekul („readers“), které dokáží m<sup>6</sup>A na vlákně ribonukleové kyseliny rozpoznat, navázat se a rozhodnout o dalším směřování ribonukleové kyseliny (viz obrázek 2). Mezi tyto čtecí molekuly patří především proteiny z rodiny, která obsahuje doménu YTH a skupina heterogenních jaderných ribonukleoproteinů (hnRNP).

Protein YTHDC1 se podílí na alternativním sestřihu mRNA tím, že navádí pre-mRNA sestřihové faktory do cílového místa na mRNA (Xiao *et al.*, 2016). Jeho funkce byla prokázána také při inaktivaci chromozomu X, pomocí stabilizace X-inactive specific transcript (XIST; Patil *et al.*, 2016). Jako jediný z rodiny proteinů obsahujících YTH doménu působí v jádře. YTHDC2 interaguje s malou podjednotkou ribozomu a navozuje rychlý způsob exprese některých mRNA. Výrazně se uplatňuje v regulaci spermatogeneze u myši, kde je potřeba pro překonání zygotene fáze při meiotickém dělení zárodečných buněk (Hsu *et al.*, 2017). Popsána byla také jeho helikázová aktivita (Wojtas *et al.*, 2017).

V cytozolu působí také protein YTHDF1, který interakcí s iniciačními faktory podporuje translaci a usnadňuje navázání ribozomu na templátovou molekulu mRNA (Wang *et al.*, 2015). Opačně působí protein YTHDF2, který navádí mRNA do cytoplazmatických P-tělísek (Wang *et al.*, 2014). YTHDF2 reaguje na teplotní stres svou translokací do jádra, kde blokuje funkci demetyláz, čímž dochází ke zvyšování m<sup>6</sup>A modifikace v 5' nepřekládaných oblastech. Za těchto podmínek může dojít k m<sup>7</sup>G-nezávislé translaci (Zhou *et al.*, 2015). Příbuzný protein YTHDF3 interaguje a oběma zmíněnými proteiny. Společně s YTHDF1 usnadňuje translaci cílových mRNA, svůj podíl má ale i na jejich degradaci. Zdá se, že všechny tři proteiny kooperují, aby byla v buňce zachována žádoucí hladina translace i degradace mRNA (Shi *et al.*, 2017).

Heterogenní ribonukleové částice působí v jádře, kde regulují expresi a alternativní sestřih pre-mRNA. Váží se do vazebného místa (tzv. RBM) na vláknu RNA. Toto vazebné místo může být skryto nebo naopak odhaleno pomocí změnou terciální struktury RNA, které je regulováno pomocí m<sup>6</sup>A. HNRNPC se navazuje na vlásenkovou strukturu obohacenou o m<sup>6</sup>A blízko ohybu. Při demetylaci tohoto místa klesá i afinita HNRNPC (Liu *et al.*, 2015). Stejným způsobem je regulována i vazba HNRNPG (Liu *et al.*, 2017). Schopnost HNRNPA2B1 navázat se na m<sup>6</sup>A obohacené oblasti, je důležitá pro maturaci mikroRNA (Alarcón *et al.*, 2015).

Dalšími proteiny, které se rozpoznávají m<sup>6</sup>A modifikaci na RNA jsou proteiny IGF2BP1/2/3 ze skupiny insulin-like growth factor 2. Tyto proteiny se váží na RNA, napomáhají stabilizovat molekulu RNA a usnadňují její translaci (Huang *et al.*, 2018).

### 3 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba (Alzheimerova demence; AD) je progresivní neurodegenerativní onemocnění mozku, které vede k poruchám paměti, zhoršení kognice a řeči, v pokročilejších fázích choroby ztrácí pacient schopnost sebeobsluhy až nakonec AD končí smrtí postiženého. Podle odhadů trpí v současné době některou z forem demence až 50 milionů lidí na světě, z čehož nejčastější forma je právě Alzheimerova demence (World Alzheimer Report 2018).

Symptomy Alzheimerovy nemoci se obvykle začínají projevovat až ve věku okolo 65 let, přitom patologické změny v organismu nastávají třeba i o 20 let dříve (McDade *et al.*, 2018). Mezi prvotní symptomy patří apatie, depresivní stavy, později i zhoršená komunikace, zmatenost a ztráta orientace a změna osobnosti.

Na úrovni orgánu, v případě Alzheimerovy choroby jde především o mozek, vznikají abnormality, z nichž nejpatrnější je tvorba  $\beta$ -amyloidových plaků ( $A\beta$  plaky), které se ukládají extracelulárně mezi neurony a další mozkové buňky.  $\beta$ -amyloidové plaky vznikají při akumulaci špatně složeného, a tudíž nesolubilního proteinu  $\beta$ -amyloidu. Druhou výraznou změnou je přítomnost intracelulárních tzv. neurofibrilárních klubek (neurofibrilar tangles, NFT), které jsou tvořeny hyperfosforylovaným Tau proteinem (Grundke-Iqbal *et al.*, 1986). Oba tyto patologické útvary narušují přirozenou funkčnost neuronů –  $A\beta$  plaky pravděpodobně zhoršují synaptický přenos mezi neurony, NFT brání intracelulárnímu transportu. Dalšími doprovodnými znaky AD jsou zánět v mozkové tkáni a úbytek neuronů (Kinney *et al.*, 2018)

Diagnóza Alzheimerovy choroby probíhá na základě vyšetření lékaře, kdy pomocí kognitivních testů a následných neurologických vyšetření, doplněných o osobní a rodinnou anamnézu, lze určit, zda pacient trpí demencí. Pro další upřesnění typu demence se využívá zobrazovacích technik a krevního obrazu, které určí hladiny  $\beta$ -amyloidu, hlavního znaku Alzheimerovy demence, a vyloučí jiné příčiny např. hypovitaminózy či nádor.

Alzheimerovu chorobu nelze v současné době úspěšně vyléčit, veškerá farmakologická léčba doplněná zdravým životním stylem se používá pouze na zmírnění symptomů (tzv. symptomatická léčba) a pozdržení nemoci v jejích lehčích stádiích. Mezi farmaka určená k léčbě AD patří cholinergní mimetika např. donepezil, rivastigmin a další látky např. memantin (Di Santo *et al.*, 2013). Léčbu lze podpořit doplňky stravy tzv. nootropiky, které mají vazodilatační schopnosti a zlepšují tak přísun živin do CNS. K těmto látkám patří



např. účinné látky z jinanu dvoulaločnatého (*Ginkgo biloba*) a ženšenu pravého (*Panax ginseng*; Wasnes *et al.*, 2000). Snahou léčby je pomoci od depresivních stavů, poruch spánku a ostatních behaviorálních symptomů, zlepšit či alespoň zachovat úroveň kognitivních funkcí a zvládnání úkonů všedního dne.

Pro boj s Alzheimerovou chorobou je důležitá prevence, která spočívá v udržování zdravého životního stylu, pozitivní výsledky se dostávají např. při pravidelné fyzické aktivitě (Rovio *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2013; Karssemeijer *et al.*, 2019). Další metodou je podpoření kognitivních funkcí pomocí cíleného tréninku (Karssemeijer *et al.*, 2019).

U Alzheimerovy choroby rozlišujeme dvě formy – sporadickou a familiární. Za vznikem sporadické formy AD stojí více faktorů, které se ve větší či menší míře zapojují do rozvoje nemoci. Významným rizikovým faktorem je vysoký věk nad 65 let. Lidem ve věku 65-74 let hrozí 3% pravděpodobnost rozvoje AD, ve věku 85 let a více je tato pravděpodobnost až 32 % podle odhadů populace USA (Hebert *et al.*, 2013). Dalšími rizikovými faktory jsou výskyt Alzheimerovy choroby v rodině nebo diabetes mellitus 2. typu (Ott *et al.*, 1999).

Roli hraje i genotyp v čele s rizikovou alelou ApoE4 (Mayeux *et al.*, 1993), ale i dalšími alelami. Apolipoprotein E je jedna z molekul, která se podílí na transportu cholesterolu v těle. Přítomnost rizikové alely může napomoci rozvoji AD, ale není nutnou podmínkou. Homozygotní jedinci se 2 alelami E4 v genu pro apolipoprotein E (APOE) mají riziko rozvoje AD 8-12x vyšší než homozygotní E3 jedinci. E4 alela také přináší riziko rozvoje patologií vedoucích k AD i v nižším věku oproti držitelům alel E3 a E2 (Jansen *et al.*, 2015).

Alzheimerova choroba může být zapříčiněna mutacemi v genech proteinů, které jsou zodpovědné za tvorbu  $\beta$ -amyloidu. Mezi tyto geny patří geny pro amyloidový prekurzorový protein (APP), presenilin-1 (PSEN1) a presenilin-2 (PSEN2; Raux *et al.*, 2005). Tato forma Alzheimerovy choroby se nazývá familiární forma AD a je pro ni typický raný nástup, kdy se symptomy objevují již ve věku 40 let, a dědičnost podle mendelovských zákonů.

Vyšší riziko rozvoje AD kombinované s nástupem v nižším věku hrozí i lidem s Downovým syndromem, tedy jedincům s trizomií 21. chromozomu (Lai a Williams, 1989). Na tomto chromozomu se nachází mnoho genů, které se mohou uplatňovat v patologii AD, patří mezi ně např. gen pro APP či gen pro protein S-100 (Tanzi *et al.*, 1988; Griffin *et al.*, 1989).

Rozvoji demence (nejen AD) obvykle předchází tzv. mírná kognitivní porucha (Mild Cognitive Impairment; MCI). Ta se projevuje jako jemné, ale přeci jen zřetelné změny kognitivních schopností jednotlivce. Na rozdíl od demence je postižený schopen samostatně

zvládat povinnosti běžného dne. MCI nemusí nutně předznamenávat rozvoj demence, nicméně podle analýzy studií se zdá, že u zhruba 30 % jedinců s diagnózou MCI se během let Alzheimerova choroba rozvine (Mitchell a Shiri-Feshki, 2009).

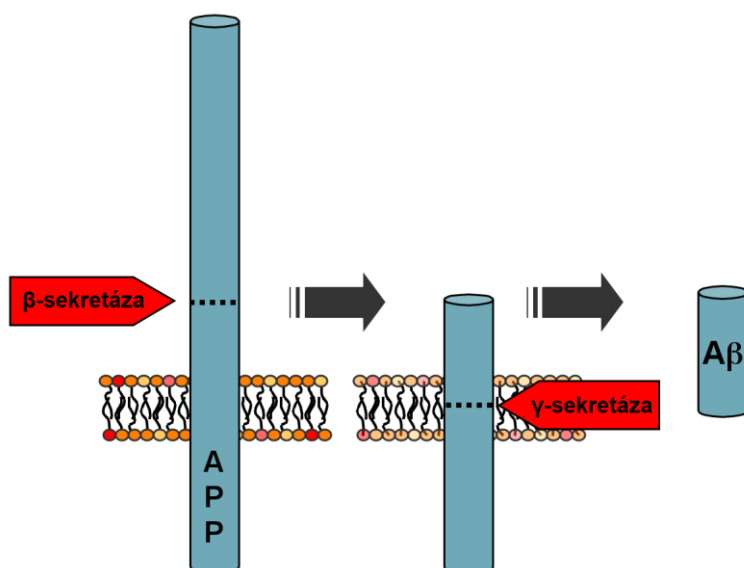
### 3.1 Molekulární podstata Alzheimerovy choroby

Patologické změny v organismu, které doprovázejí AD, se v organismu objevují postupně i o několik desítek let dříve než choroba propukne (McDade *et al.*, 2018).

Přesná a jednoznačná příčina rozvoje sporadické formy AD není známa, pro výzkum proto bylo vytvořeno více teorií o vzniku patologií AD. Nejznámější tzv. amyloidová hypotéza je založena na akumulaci  $\beta$ -amyloidu v CNS, který je nejvýraznějším molekulárním markerem obou forem AD – sporadické i familiární.

$\beta$ -amyloid vzniká v těle přirozeně jako cca 4 kDa peptid (Masters *et al.*, 1985). Je tvořen z transmembránového APP několikerým endoproteomickým štěpením (viz obrázek 5). Poslední endoproteázou, která se na štěpení podílí je  $\gamma$ -sekretáza, jejíž katalytickou podjednotku tvoří proteiny presenilin-1 (PSEN1) a presenilin-2 (PSEN2).  $\gamma$ -sekretáza štěpí na 2 místech, takže výsledkem jejího působení vznikají různě dlouhé úseky A $\beta$ . V 80-90 % případů se tvoří A $\beta$ 40, který končí na pozici 40. aminokyseliny, v malém množství případů (5-10 %) vzniká A $\beta$ 42, který je o dvě aminokyseliny delší. A $\beta$ 42 vykazuje vyšší hydrofobicitu a tendenci ke tvorbě fibril, což vede ke shlukování a ukládání do depozit (Lührs *et al.*, 2005).

U familiární formy AD je známo, že mutace v genu APP ve výsledku vedou k nadprodukci A $\beta$ 42. Příčinou mohou být změny aminokyselin v místech štěpení  $\beta$ -sekretázou (např. „švédská mutace“) nebo  $\gamma$ -sekretázou (Haass *et al.*, 1995; Bentahir *et al.*, 2006). Další příčinou mohou být mutace v genech pro protein presenilin 1 a presenilin 2, které rovněž vedou k akumulaci A $\beta$ 42, tentokrát ale přímou změnou aktivity  $\gamma$ -sekretázy. Presenilin 1 má funkci jako katalytická podjednotka komplexu  $\gamma$ -sekretázy (Thinakaran *et al.*, 1996; Citron *et al.*, 1997).



**Obrázek 5. Sekrece  $\beta$ -amyloidu.** Amyloidový prekurzorový protein (APP) je nejprve rozštěpen  $\beta$ -sekretázou. Následně  $\gamma$ -sekretáza odštěpí  $\beta$ -amyloid v transmembránové oblasti.

Další patologií, která doprovází AD, je hyperfosforylace Tau proteinu. Tau proteiny můžeme nalézt především v axonech neuronu (Binder *et al.*, 1985), kde se ve své nefosforylované formě váží na vlákno mikrotubulu, stabilizují ho a napomáhají jeho polymerizaci (Biernat *et al.*, 1993). Při hyperfosforylaci proteinu dochází ke snížení afinity vazby k mikrotubulu, Tau protein se shlukuje a vytváří párová helikální filamenta, které se ukládají v intracelulárním prostoru, kde je lze pozorovat v útvarech zvaných neurofibrilární klubka (Grundke-Iqbal *et al.*, 1986).

Kromě amyloidové hypotézy existují i další teorie, které se snaží vysvětlit patogenezu sporadické formy AD. Mezi tyto hypotézy patří např. vysvětlení pomocí akumulace kovů v CNS (Mantyh *et al.*, 1993), hypotéza založená na zánětlivých procesech (Wyss-Coray a Rogers, 2012) či hypotéza založená na oxidativním stresu (Swerdlow, 2012).

## 3.2 Animální modely AD

### 3.2.1 Vybrané animální transgenní modely AD

Pro výzkum familiární formy AD byla vytvořena řada transgenních modelů založených na patologii AD – tedy zvýšeném množství  $A\beta$ , vedoucí k tvorbě  $A\beta$  plaků a hyperfosforylaci Tau proteinu s následnou tvorbou NFT. Nejčastěji se jedná o mutace v genech cílového proteinu nebo jiných proteinů, které se na metabolismu  $\beta$ -amyloidu a Tau proteinu podílí. I skrze snahu nasimulovat co nejpodobnější patologii lidské formě AD, jsou patologie

indukované v organismu experimentálního zvířete fyzikálně i biochemicky odlišné od lidských. Navíc rozvoj Alzheimerovy choroby u lidí může být podmíněn a ovlivněn další řadou drobných metabolických změn, protože se nejedná o typické jednoznačně geneticky podmíněné onemocnění. Proto v případech snahy o navození Alzheimerovy choroby u zvířat mluvíme pouze o indukci patologií podobných Alzheimerově chorobě (Alzheimer's disease-like pathology).

### **Myší model 3xTg-AD**

Do genomu C57BL/6J myši byly vpraveny 3 lidské mutace, které jsou asociovány s rozvojem Alzheimerovy choroby. Jednou je KM670/671NL švédská mutace genu pro amyloidový prekurzorový protein, druhá je P301L mutace v genu Tau proteinu (MAPT) a poslední tvoří M146V mutace v genu presenilin 1 (PSEN1). U těchto modelů se projevují obě typické AD patologie – na věku závislé ukládání A $\beta$  plaků i tvorba NFT z hyperfosforylovaného Tau proteinu – především v oblastech hipokampu, amygdaly a kortexu (Oddo *et al.*, 2003).

### **AD-prediabetický myší model**

Tento model vznikl zkřížením pre-diabetické myší linie (db/db myši) s linií nesoucí mutace Alzheimerovy choroby (APP/PS1 myši). Při navození diabetu 2. typu (T2D) u tohoto modelu vysokokalorickou dietou, lze pozorovat další efekty AD patologií např. zvýšení hladiny A $\beta$ 40 i A $\beta$ 42 nebo snížení synaptické denzity. Jedná se o vhodný experimentální model pro studium vztahu Alzheimerovy choroby s T2D a dalšími poruchami spojenými s dysbalancí metabolismu (Ramos-Rodriguez *et al.*, 2017).

### **Potkaní model TgF344-AD**

Model TgF344-AD je odvozen z potkaního kmene Fischer 344 vpravením dvou lidských mutací, které jsou nezávisle na sobě považovány za příčinu familiární formy AD – první podmiňuje expresi mutantního lidského amyloidového prekurzorového proteinu se švédskou mutací (APP<sup>sw</sup>) a druhá tvorbu presenilinu 1 (PS1 $\Delta$ E9).

Jedinci TgF344-AD vykazují 2,4x vyšší produkci APP<sup>sw</sup> než APP a 6,2x více lidského PS1 $\Delta$ E9 než endogenního PS1. Tyto mutace způsobují změny v potkaním organismu, které jsou považovány za typické rysy Alzheimerovy demence – především na věku závislé nadměrné ukládání  $\beta$ -amyloidových plaků v ECM, tvorba NFT, chronický zánět a úbytek neuronů. Ve věku 15 měsíců vykazují horší výsledky při testování v bludišti Barnesové zaměřeném na prostorovou orientaci (Cohen *et al.*, 2013).

### 3.2.2 Vybrané animální modely s chemicky indukovanou AD

Sporadickou formu AD lze modelovat pomocí chemických látek, které navozují některé z patofyziologických znaků AD. Níže uvedené látky se využívají v experimentálním navození AD nejčastěji u hlodavců (*Mus musculus*, *Rattus norvegicus*), ale i u dalších organismů např. primátů (Yeo *et al.*, 2015) nebo lidí (Bajo *et al.*, 2015).

Jedním z příkladů je infúze A $\beta$ 42, Fe<sup>2+</sup> a buthionin-sulfoximinu (FAB) do mozkové komory po dobu 4 týdnů. Po této době je možné pozorovat ukládání  $\beta$ -amyloidu, hyperfosforylaci Tau proteinu a ztrátu neuronů (Lecanu *et al.*, 2006).

Skopolamin je antagonist muskarinních cholinergních receptorů, a tak při jeho podání dochází k narušení cholinergního systému. To se projevuje zhoršením kognitivních funkcí a paměti (Khakpai *et al.*, 2012). Při jeho podávání se také objevují poruchy oxidativního stresu jako je peroxidace lipidů, nižší hladiny glutationu a inaktivace superoxid dismutázy. Výhodou využití skopolaminu při modelování AD patofyziologie je možnost intraperitoneálního (*ip*) podání (Fan *et al.*, 2005).

Další látkou, která se používá pro navození sporadické formy AD, je kolchicin, který při intracerebroventrikulárním (*icv*) podávání prostupuje až 3x více do oblasti hippocampu, kde nepříznivě působí na granulární buňky (Evrard *et al.*, 1998). Téměř nevratně se váže na tubulin a zabraňuje tak tvorbě mikrotubul, čímž poškozuje buňky a vede k jejich zániku. Dále navozuje peroxidaci lipidů, snižuje hladiny redukovaného glutationu a acetylcholinesterázy v potkaním mozku. Výsledkem jeho působení je úbytek cholinergních neuronů a narušený cholinergní systém obdobně jako v patologii AD (Kumar *et al.*, 2007).

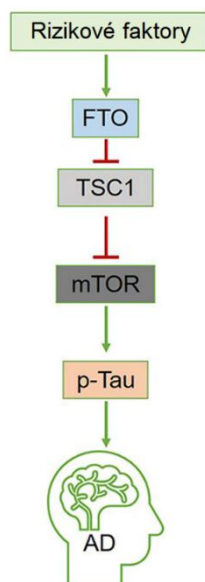
Myším, potkanům i dalším subjektům lze aplikovat streptozotocin přímo do mozkových komor, čímž se rozvinou patologické znaky podobné AD. Streptozotocin působí inzulinovou rezistenci v mozku doprovázenou zhoršenou pamětí, narušením cholinergního systému, zvýšením markerů oxidativního stresu a vyšší mírou neurodegenerace (Shingo *et al.*, 2013; Correia *et al.*, 2013).

### 3.3 Souvislost mezi hladinou m<sup>6</sup>A a AD

První známky propojení mezi hladinou m<sup>6</sup>A a Alzheimerovou demencí byly nalezeny při genomových srovnávacích studiích. Riziková alela rs9939609 genu FTO, která vede ke zvyšování hladiny FTO (Church *et al.*, 2010) a tudíž současně i ke snižování m<sup>6</sup>A, se vyskytovala ve zvýšené míře i u nositelů Alzheimerovy choroby (Reitz *et al.*, 2012). Kromě spjitosti s vyšší pravděpodobnosti rozvoje AD byl nalezen vztah rizikových alel FTO s nadváhou (Frayling *et al.*, 2007), diabetem melitem 2. typu (Li *et al.*, 2012) a cévními chorobami (He *et al.*, 2014).

Riziková alela FTO rs9939609 ovlivňuje riziko rozvoje AD především skrze interakci s APOE4 alelou. V případě, že jedinec nese obě rizikové alely, se pravděpodobnost rozvoje AD ztrojnásobí (Keller *et al.*, 2011). U starších nositelů rizikové alely trpících nadváhou, byla pozorována asociace rizikové alely s horšími výsledky v testech verbální plynulosti, která se používá při hodnocení funkce frontálních laloků (Benedict *et al.*, 2011). Podobně bylo nalezeno výrazné snížení objemu frontálního laloku o 8 % a týlního laloku o 12 % u nositelů rizikové alely (Ho *et al.*, 2010).

Přesný mechanismus, kterým FTO přispívá k rozvoji Alzheimerovy choroby není znám. Dle nejnovějších poznatků, by však zvýšená aktivita demetylázy FTO mohla stát na počátku řetězce (viz obrázek 6), který skrze protein TSC1 ovlivňuje mTOR. Tato dráha ve výsledku vede k nadměrné fosforylaci Tau proteinu (Li *et al.*, 2018).



**Obrázek 6. Jedna z hypotéz o vztahu mezi FTO a Alzheimerovou demencí.** Schéma naznačuje dráhu vedoucí od proteinu FTO přes TSC1 a mTOR k hyperfosforylaci Tau proteinu (p-Tau), potenciálnímu spouštěči AD patologie. Upraveno podle Li *et al.* (2018).

## 4 Kalorická restrikce

Kalorická restrikce je spolu s fyzickou aktivitou a intelektuální aktivitou považována za environmentální podnět působící zlepšení kognitivních funkcí. Kalorickou restrikcí se míní dieta, při které je energetický příjem snížen tak, aby nedocházelo k podvýživě, nebo režim, při jehož dodržování není potrava dostupná neomezeně (Goodrick *et al.*, 1983).

Pozitivní příspěvky kalorické restrikce na organismus se projevují zpomaleném procesu stárnutí, čímž dochází k prodloužení střední i maximální délky života (Goodrick *et al.*, 1983), snížením nežádoucí tukové tkáně v oblasti trupu, nižší koncentrace leptinu v plazmě (Colman *et al.*, 1999) a zvýšenou citlivostí k inzulinu (Kemnitz *et al.*, 1994). Tyto nálezy zlepšují celkové zdraví a snižují riziko rozvoje T2D a kardiovaskulárních onemocnění.

Na molekulární úrovni v mozku byl při kalorické restrikci pozorován nárůst nových synapsí, zvýšení počtu neuronů a zvýšení hladin neurotrofických faktorů mezi které patří např. BDNF (Lee *et al.*, 2000), dalším efektem byla redukce markerů oxidativního stresu (Guo *et al.*, 2000).

Dle dostupné literatury, která se věnuje především změnám exprese RNA-demetylázy FTO v hypotalamu po krátkodobé kalorické restrikci, dochází ke změnám exprese, jednotlivé studie se však neshodují.

U myší, které podstoupily krátkodobou kalorickou restrikci a nebyly krmeny po dobu 16 hodin, byla pozorována vyšší hladina proteinu FTO (Olszewski *et al.*, 2009). Ale oproti tomu dle McTaggart *et al.*, 2011, se u myší, které neměly přístup k potravě 18 h, neprokázala změna hladiny FTO. U potkanů kmene Wistar byla pozorována zvýšená exprese proteinu FTO v hypotalamu po krátkodobé kalorické restrikci (Vujovic *et al.*, 2013).

## **5 Behaviorální úlohy zaměřené na testování deklarativní paměti u zvířat**

Studium dlouhodobé paměti u zvířat je omezeno, protože na rozdíl od lidí nemohou verbálně vyjádřit své vzpomínky. Jednou z možností, jak testovat deklarativní paměť u hlodavců, jsou úlohy využívající prostorové orientace např. Morrisovo vodní bludiště nebo úloha aktivního se vyhýbání místu (AAPA). Oba tyto testy jsou založeny na negativní motivaci.

### **5.1 Úloha aktivního vyhýbání se místu**

Aktivní vyhýbání se místu (AAPA; Active Allothetic Place Avoidance) je stejně jako Morrisovo vodní bludiště (MWM) postaveno na nutnosti využít alotetický způsob navigace, ale v tomto případě je úkolem potkana vyhnout se konkrétnímu místu v prostoru. V místnosti s výraznými orientačními body je umístěna kruhová kolotočová aréna s kovovou deskou a stěnou z průhledného plastu. Aréna v průběhu pokusu rotuje a nehybného potkana tak unášejí kolem dokola. Pomocí počítačového programu je v určitém výseku arény nastavena zóna, které se potkan musí vyhnout. Aby byl potkan motivován vyhýbat se této zóně, je po vstupu do ní potrestán mírným elektrickým šokem. Potkan je připojen vodivým spojením skrze jehlu umístěnou v kůži ke zdroji proudu a současně snímán kamerou. Pokud se potkan dostane do oblasti, které se má vyhýbat, je mu automaticky aplikován elektrošok (Cimadevilla *et al.*, 2000).

Na rozdíl od Morrisova vodního bludiště je úloha v rotační aréně komplexnější, protože potkan může navigovat v aréně pomocí lokálních pachových značek (egocentrický přístup). Ty ale nemusí být vždy relevantní pro úlohu vyžadující alotetický přístup, proto je v úloze pro zvíře výhodné, aby rozlišilo tyto dvě informace a řídilo se relevantnější z nich (Kelemen a Fenton, 2010).



## **EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

## 6 Cíle experimentální práce

Cílem práce bylo ověřit hypotézu, že snížená aktivita RNA demetylázy FTO je asociována se zlepšením kognitivních funkcí u potkana. Aktivitu RNA demetylázy FTO jsme ovlivnili podáním inhibitoru MO-I-500 u transgenního potkaního modelu Alzheimerovy choroby TgF344-AD. Dále jsme sledovali vliv dlouhodobé kalorické restrikce na kognitivní funkce a expresi proteinů regulujících m<sup>6</sup>A dráhu u potkanů kmene F344. Stanovili jsme si tři dílčí cíle:

- 1) Sledovat změny kognitivních funkcí pomocí behaviorálních testů u transgenních potkanů TgF344-AD po farmakologické inhibici RNA demetylázy FTO.
- 2) Stanovit vliv kalorické restrikce u potkanů kmene F344 na chování v behaviorálních úlohách.
- 3) Kvantifikovat expresi proteinů m<sup>6</sup>A dráhy v mozku potkanů F344 vystavených kalorické restrikci.

## 7 Materiál

### 7.1 Zvířata

Do experimentů byli zařazeni potkani obou pohlaví transgenního modelu TgF344-AD (TG) a wildtype jedinci z kmene F344 (WT). Zvířata byla umístěna do chovných boxů a chována ve skupinách 2-5 jedinců. V chovném zázemí byl nastaven světelný režim 12 h/12 h (čas rozsvěcení v 7:00), teplota vzduchu  $22 \pm 2$  °C a potkanům byl do doby experimentu umožněn přístup k potravě a vodě dle libosti.

### 7.2 Přístroje a nástroje

Název	Výrobce
Centrifuga	Hettich, Německo
Pipety	Eppendorf, Německo
Pipetman	Eppendorf, Německo
Homogenizátor	IKA, Německo
Spektrofotometr	BioTek, USA
Analytické váhy	Sartorius, Německo
Analytické váhy	Micro Precision Calibration, USA
pH metr	Mettler Toledo, USA
Aparatura pro elektroforézu	Bio-rad, USA
Zdroj pro elektroforézu	Bio-rad, USA
Termoblok	Techne, UK
Vyvolávací stroj	Optimax, Německo
Filmy	Agfa HealthCare, Belgie
OF aréna; 100x100 cm	Ugo Basile, Itálie
EZM aréna; Ø 120 cm	Ugo Basile, Itálie
AAPA aréna; Ø 82 cm	Biosignal group, USA
Morrisovo vodní bludiště; Ø 150 cm	Ugo Basile, Itálie
Morrisovo vodní bludiště; Ø 185 cm	Česká televize, Česká republika
Nádrž pro test nuceného plavání; Ø 50 cm	Zakázková výroba

### 7.3 Chemikálie

<b>Název</b>	<b>Výrobce</b>
Bromfenolová modř	SERVA, Německo
Dithiotreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, USA
Dodecylsírán sodný (SDS)	SERVA, Německo
EDTA	Sigma-Aldrich, USA
Etanol	SERVA, Německo
Glycerol	Sigma-Aldrich, USA
Glycin	SERVA, Německo
Chlorid hořečnatý (MgCl <sub>2</sub> )	SERVA, Německo
Chlorid sodný (NaCl)	Carl Roth, Německo
Kyselina octová	Lachema, Česká republika
Metanol	SERVA, Německo
Metylcelulóza	Sigma-Aldrich, USA
Mléko (sušené odstředěné)	Artifex Instant, Česká republika
NNNN' Tetrametyletylnediamin (TEMED)	SERVA, Německo
Persírán amonný (APS)	Sigma-Aldrich, USA
Ponceau S	Merck, USA
Sacharóza	SERVA, Německo
Tris (Trizma base)	Sigma-Aldrich, USA
Tween 20	SERVA, Německo

### 7.4 Roztoky a pufrы

#### **Homogenizační pufr TMES**

20 mM Tris; 3 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM EDTA; 250 mM sacharóza; H<sub>2</sub>O, pH = 7,4

#### **APS (ammonium persulfate)**

10% (w/v) APS; H<sub>2</sub>O

#### **Pufr 1 (pH 8,8)**

1,5M Tris; H<sub>2</sub>O

#### **Pufr 2 (pH 6,8)**

0,5M Tris; H<sub>2</sub>O

### **Elektroforetický pufr (running buffer) 10x koncentrovaný**

0,25M Tris; 2M Glycin; 35mM SDS; H<sub>2</sub>O

### **Nanášecí pufr (SLB, pH 6,8)**

0,24M Tris (pH 6,8); 10% (v/v) Glycerol; 28mM SDS; 2mM DTT; 145mM bromfenolová modř; mili-Q H<sub>2</sub>O; pH = 6,8

### **TBS pufr (pH 7,4) 10x koncentrovaný**

1,5M NaCl; 0,1M Tris; H<sub>2</sub>O; pH = 7,4

### **Blokující pufr (blocking buffer)**

10% (v/v) TBS; 0,1% (v/v) Tween 20; 5% (w/v) mléko; H<sub>2</sub>O

### **Ředící pufr (diluting buffer)**

10% (v/v) TBS; 0,1% (v/v) Tween 20; 1% (w/v) mléko; H<sub>2</sub>O

### **Promývací pufr (washing buffer)**

10% (v/v) TBS; 0,3% (v/v) Tween 20; H<sub>2</sub>O

### **Blotovací pufr (blotting buffer)**

25 mM Tris; 190 mM Glycin; 20% (v/v) metanol; H<sub>2</sub>O

### **Ponceau barvivo**

0,1% (w/v) Ponceau S; 5% (v/v) kyselina octová; H<sub>2</sub>O

## **7.5 Inhibitory**

Inhibitor RNA-demetylázy FTO (MO-I-500; Mark Olsen, Arizona, USA)

Inhibitory proteáz (cOmplete Protease Inhibitor Cocktail; Sigma-Aldrich)

## **7.6 Protilátky**

### **7.6.1 Primární**

Anti-FTO antibody [5-2H10]; lot#: GR 288074-20; Abcam

Anti-METTTL3 antibody [EPR18810]; lot#: GR 233964-2; Abcam

YTHDF1 Rabbit polyclonal antibody; lot#: 00044548; Proteintech

### **7.6.2 Sekundární**

Amersham ECL Mouse IgG, HRP-linked whole Ab (from sheep); NA931-1ML; GE Healthcare

Amersham ECL Rabbit IgG, HRP-linked whole Ab (from donkey);  
NA934-1ML; GE Healthcare

### **7.7 Software**

ANY-maze tracking software 5.14 (Stoelting Co., Illinois, USA, [www.stoeltingco.com](http://www.stoeltingco.com))

Interactive tracking system (BioSignal group, USA, [www.biosignalgroup.com](http://www.biosignalgroup.com))

Tracker 2.36 (BioSignal group, USA, [www.biosignalgroup.com](http://www.biosignalgroup.com))

Track Analysis 2.2 (BioSignal group, USA, [www.biosignalgroup.com](http://www.biosignalgroup.com))

Track Explorer 1.1 (BioSignal group, USA, [www.biosignalgroup.com](http://www.biosignalgroup.com))

The Observer XT 14.0 (Noldus Information Technology, Netherlands, [www.noldus.com](http://www.noldus.com))

EthoVision XT 14.0 (Noldus Information Technology, Netherlands, [www.noldus.com](http://www.noldus.com))

BORIS 7.5 (O. Friard a M. Gamba, [www.boris.unito.it](http://www.boris.unito.it))

Gen5 (BioTek, USA, [www.biotek.com](http://www.biotek.com))

ImageJ 1.52a (W. Rasband, US National Institutes of Health, [imagej.nih.gov](http://imagej.nih.gov))

GraphPad Prism 5.03 (GraphPad Software Inc, California, USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com))

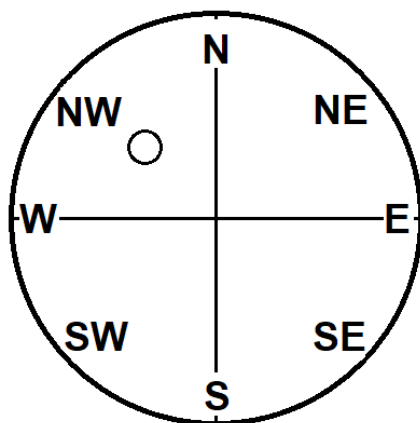
## 8 Metodika

### 8.1 Ověření zrakových funkcí

Před testováním prostorové navigace v úloze aktivního vyhýbání se místu musel být proveden test zrakových funkcí. Ten byl připraven jako série 8 plaveb na viditelný ostrůvek v Morrisově vodním bludišti (MWM). Platforma byla umístěna tak, aby cca 1,5 cm vyčnívala nad hladinu vody, která byla pro lepší detekci pozice potkanů zbarvena černou temperovou barvou. Platforma byla kontrastní světlé barvy, takže ji potkani s nepoškozeným zrakem snadno viděli. V místnosti byl naměřen osvit  $280 \pm 40$  lx. Poloha ostrůvku se mezi jednotlivými plavbami měnila, a navíc docházelo i ke střídání startovních pozic potkana, aby potkan neplaval k platformě vždy jen z jednoho směru (viz obrázek 7 a tabulka 1).

**Tabulka 1 Umístění platformy a startovní pozice potkana**

Plavba	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
Umístění platformy	N	W	SE	NE	SW	NW	E	S
Startovní pozice potkana	SE	E	N	W	N	SE	SW	NE



**Obrázek 7. Schéma Morrisova vodního bludiště v testu navigace na viditelný ostrůvek.** Platforma je označena kroužkem a umístěna na pozici NW.

Potkani byli rozděleni do skupin o 5-6 jedincích, kteří byli umisťováni do arény postupně v pravidelném sledu. Délka doby mezi jednotlivými plavbami pro konkrétního potkana (tzv. intertrail interval) činila  $10 \text{ min} \pm 2 \text{ min}$ . Maximální doba jedné plavby potkana činila dvě minuty. Pokud potkan nenalezl platformu do dvou minut, byl na ostrůvek experimentátorem naveden. Po dosažení ostrůvku byl potkan ponechán na ostrůvku

po dobu 10 s. Potkan byl poté přenesen do suchého boxu vystlaného savým papírem, kde setrval do doby další plavby.

Schopnost vidění potkana byla určena na základě časů, za kterou potkan dosáhl viditelné platformy. Pokud potkan ve 4 a více plavbách nenalezl platformu do dvou minut a ani nebylo pozorováno postupné zlepšování, byl vyřazen z dalších pokusů pro špatný zrak.

## **8.2 Inhibice RNA-demetylázy FTO**

Transgenním i wildtype potkanům byl po dobu 5 dnů podáván farmakologický inhibitor MO-I-500. Látka byla připravena jako jemná suspenze MO-I-500 v roztoku 0,1% metylcelulózy o koncentraci 5 mg/ml. Zvířatům byla podávána intraperitoneální cestou. Dávka byla stanovena na 10 mg/kg. Kontrolní skupině bylo souběžně podáváno vehikulum (0,1% metylcelulóza) ve stejném objemu (2 ml/kg). Po posledním dnu aplikace látky, předtím než bylo přistoupeno k testování v behaviorálních úlohách, následoval jeden den klidu, kdy se se zvířaty nemanipulovalo.

## **8.3 Behaviorální úlohy**

Potkani byli testováni ve světelné fázi LD cyklu. Veškerým behaviorálním testům předcházela habituace potkanů v místnosti testování o délce minimálně 30 minut.

### **8.3.1 Test otevřeného pole**

Testované zvíře bylo samostatně umístěno doprostřed arény na 10 min. Jeho trajektorie byla zaznamenávána kamerou. Před vstupem dalšího zvířete byla aréna očištěna 70% etanolem. Teplota v místnosti činila  $21 \pm 1$  °C a osvit byl naměřen 50 lx. Pro sledování dalších parametrů byla definována oblast vnitřní zóny arény v programu. Obsah vnitřní zóny arény se rovná polovině obsahu plochy celkové arény.

### **8.3.2 Vyvýšené kruhové bludiště**

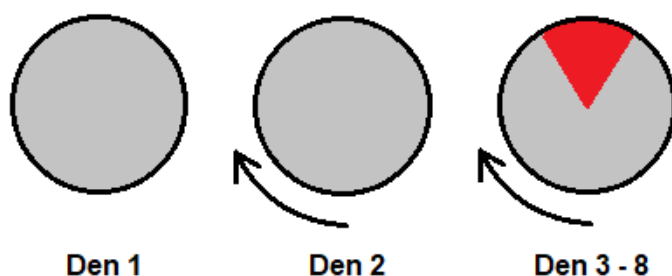
Potkan byl umístěn doprostřed otevřené části aparatury a následně ponechán v bludišti po dobu 10 min. Pokud potkan spadl z otevřeného ramene, byl tam co nejdříve navrácen. Po celou dobu byl nahráván pohyb zvířete, který byl následně vyhodnocen pomocí programu ANY-maze. Před vstupem dalšího zvířete byla aréna očištěna 70% etanolem. V otevřených ramenech bludiště bylo naměřeno osvětlení 60 lx a v uzavřených ramenech bludiště 30 lx. Teplota v místnosti byla  $21 \pm 1$  °C.



### 8.3.3 Aktivní vyhýbání se místu

Testování v úloze AAPA se skládalo z prvního dne habituace (aréna se netočí, elektrické šoky vypnuté), z druhého dne habituace (aréna se netočí, elektrické šoky zapnuté) a následně šesti testovacích dnů (aréna se točí, elektrické šoky zapnuté; viz obrázek 8). Rychlost otáčení arény byla 1 otáčka/min. Úhel oblasti, ve které byl potkanům aplikován elektrošok, činil 60°. Hodnoty elektrošoků se pohybovaly v rozmezí 0,2-0,5 mA podle váhy a reakce potkana. Délka elektrošoku činila 500 ms, pauza mezi dvěma šoky trvala 1500 ms, při vstupu do zóny nedostal potkan elektrošok okamžitě, ale až po 500 ms. V aréně byl naměřen osvit 60 lx. Po celou dobu bylo zvíře nahráváno na kameru a pomocí programu Tracker pořizován záznam o jeho pohybu. Ten byl poté vyhodnocen programem Track Analysis.

Jedno sezení v aréně trvalo 20 minut, zvíře bylo testováno 1x za den v pseudorandomizovaném pořadí. Aréna byla mezi jednotlivými sezeními pečlivě vyčištěna 70 % etanolem.



**Obrázek 8. Schéma pokusu aktivního vyhýbání se místu (AAPA).** První den se aréna netočí, druhý den se aréna točí (šipka), ale elektrošoky jsou vypnuté. Třetí až osmý den se aréna točí a potkani dostávají v zakázané oblasti elektrošoky (červená výseč).

### 8.3.4 Test nuceného plavání

Potkan byl umístěn do testovací nádrže naplněné vodou na 15 minut, po ukončení testu byl potkan umístěn do přepravky vystlané savým papírem. Hladina vody v nádrži dosahovala takové výšky, aby potkan nedosáhl na dno (30 cm), a teplota vody činila  $22 \pm 1$  °C. Chování potkana bylo nahráváno na kameru po celou dobu testování a následně vyhodnoceno manuálně pomocí programu BORIS (Friard a Gamba, 2016).

## 8.4 Statistická analýza behaviorálních úloh

Srovnání jednotlivých skupin bylo provedeno v programu GraphPad Prism 5. Pro určení signifikance v testech OF, EZM a FST byl použit oboustranný t-test nebo dvoucestná ANOVA, pro porovnání skupin v úloze AAPA byla využita dvoucestná ANOVA. Analýza dat byla doplněna o Bonferonniho *post-hoc* test. Grafy byly vytvořeny v témže programu. Hodnoty na grafu označují aritmetické průměry u jednotlivých pozorování a chybové úsečky označují střední chybu průměru (SEM). Výsledky doplňují heatmapy pohybu potkanů po kruhové aréně v testu OF a poslední den úlohy AAPA. Tyto mapy byly vytvořeny v programu Ethovision.

## 8.5 Model kalorické restrikce

Potkanům byla postupně snižována denní dávka potravy, tak aby během 3 týdnů dosáhli 85-90 % své původní hmotnosti. Následně byla hmotnost udržována na této hodnotě po dobu 4 týdnů. Poslední týden, tedy 7. týden od zahájení pokusu, probíhalo současně testování v behaviorálních úlohách. Krmení probíhalo každý večer ve stejnou dobu (18 h) a potkanům byla individuálně odvážená přesná porce potravy ( $3 \pm 1$  g), kterou jsou běžně krmeni.

## 8.6 Odběr tkání

Po dokončení baterie behaviorálních úloh byla zvířata uspána směsí Narketanu (100 mg/ml; Vétoquinol) a Xylazinu (XYLAZIN Ecuphar, 20 mg/ml, Bioveta) v poměrech uvedených v tabulce 2 a následně usmrcena stržením vazů.

**Tabulka 2 Poměry Narketanu a Xylazinu**

	<b>Narketan</b>	<b>Xylazin</b>
Samice	1,9 ml/kg	0,6 ml/kg
Samec	1,4 ml/kg	0,5 ml/kg

Pro další pokusy byly odebrány vzorky feces, mozkomíšního moku, séra a vybrané mozkové struktury (kortex, hipokampus, hypotalamus). Tkáně byly zmrazeny v tekutém dusíku a uchovány do zpracování v hlubokomrazícím boxu při  $-80$  °C.

## 8.7 Homogenizace

Tkáň byla zvážena a vložena do ledového TMES pufru s 25x ředěným inhibitorem proteáz v poměru uvedených v tabulce 3.

**Tabulka 3 Poměr jednotlivých reagensů před homogenizací**

Tkáň	TMES	Inhibitor proteáz (25x ředěný)
1 g	10 ml	400 µl

Tkáň byla mechanicky rozmělněna na menší kousky, poté byla homogenizována v homogenizátoru při 1200 rpm, následně byl homogenát stáčen po dobu 10 min a teplotě 4 °C v centrifuze při nastavení 2100 rpm, se zrychlením 9 a zpomalením 0. Nakonec byl odebrán supernatant, rozaliquotován pro další účely, zamražen v tekutém dusíku a uchováván pro další účely v -80°C.

## 8.8 Stanovení koncentrace proteinů metodou BCA

Stanovení koncentrace proteinů bylo provedeno metodou kyseliny bicinchoninové (bicinchoninic acid; BCA).

Kalibrační křivka byla vytvořena pomocí známých koncentrací roztoku hovězího sérového albuminu (BSA). Tyto standardy byly nanášeny po 100 µl do jednotlivých jamek 96jambkové destičky spolu se vzorky, u kterých bylo třeba určit koncentraci. Ty byly nanášeny do jamek jako triplikáty. Reakční směs byla připravena ze 3 reagensů (viz tabulka 4) a nanášena ke vzorkům i standardům po 100 µl.

**Tabulka 4 Složení a poměry reagensů reakční směsi**

	Reagencie A	Reagencie B	Reagencie C
Složení	6,8 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 1,6 g Na <sub>2</sub> C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub> doplněno do 100 ml H <sub>2</sub> O	4 g BCA doplněno do 100 ml H <sub>2</sub> O	0,4 g CuSO <sub>4</sub> ·5 H <sub>2</sub> O doplněno do 10 ml H <sub>2</sub> O
Poměr	2 %	48 %	50 %

Připravená destička s nanesenými vzorky byla přelepena izolepou a inkubována 30 min při 60 °C, poté byly vzorky vyhodnocovány spektrofotometrem při 562 nm. Výsledné koncentrace (c) byly získány jako průměr triplikátu v jednotkách µg/µl odečtením z kalibrační křivky programem Gen 5.

## 8.9 Příprava vzorků

Zhomogenizovaná tkáň byla naředěna do koncentrace 2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  a celkového množství 400  $\mu\text{l}$  podle vzorce:

$$\text{zhomogenizovaná tkáň } (\mu\text{l}) = 800/c + (300 - 800/c) + 100 \mu\text{l SLB pufru}$$

Značka  $c$  ve vzorci značí původní naměřenou koncentraci homogenátu ze spektrofotometru. Vzorky byly po naředění promíchány na vortexu a inkubovány 2 min při 95 °C.

## 8.10 Rozdělení proteinů pomocí SDS-PAGE

Rozdělení proteinů podle molekulové hmotnosti bylo provedeno pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu (metoda SDS-PAGE).

Nejprve byl připraven gel, sestávající ze spodního 10% separačního gelu a horního zaostřovacího gelu. Složení gelů je rozepsáno v tabulce 5, množství je uvedeno pro 2 gely. Reagencie byly přidávány v pořadí uvedeném níže. Do připravené aparatury (Biorad), po očištění sklíček etanolem, byl nalit nejprve separační gel a převrstven vodou nasyceným butanolem (cca 300  $\mu\text{l}$ ). Gel byl ponechán polymerizovat  $50 \pm 10$  min. Poté byl butanol vypláchnut destilovanou vodou a gel byl vysušen filtračním papírem, tak aby nedošlo ke znehodnocení gelu. Následně byl nad separační gel přidán zaostřovací gel a do něj vložen etanolem očištěný hřebínek.

**Tabulka 5 Složení separačního a zaostřovacího gelu**

	<b>Separací gel 10%</b>	<b>Zaostřovací gel</b>
Destilovaná voda	8 ml	6 ml
Pufr 1 (pH = 8,8)	5 ml	-----
Pufr 2 (pH = 6,8)	-----	2,5 ml
30% akrylamid	6,7 ml	1,3 ml
10% SDS	200 $\mu\text{l}$	100 $\mu\text{l}$
10% APS	90 $\mu\text{l}$	90 $\mu\text{l}$
TEMED	8 $\mu\text{l}$	8 $\mu\text{l}$

Po zpolymerizování separačního gelu (cca 35 min) byl vyjmut hřebínek a jamky propláchnuty destilovanou vodou. Gel ve skle byl přemístěn do elektroforetické aparatury a zalit cca 1 l elektroforetického pufru. Do jamek byly nanесeny vzorky a aparatura byla zapojena do zdroje s nastavenými hodnotami: napětí 200 V, proud 400 mA, čas 50 min.

## **8.11 Immunoblotting**

Gely byly vyjmuty z aparatury a proteiny přeneseny na PVDF membránu metodou imunoblotting (western blotting). Membrány byly položeny na gel mezi papírové a pěnové podložky, uzavřeny do plastové formy a umístěny do blotovací aparatury s blotovacím pufrém, která byla na 1 hodinu zapojena do zdroje s nastaveným napětím 100 V a hodnotou elektrického proudu 400 mA.

Následně byly membrány přemístěny do plastových nádob, 3x promyty destilovanou vodou a následně barvené ponceau barvivem po dobu 5 min. Po obarvení byly membrány promyty 3krát destilovanou vodou, vysušeny čistým filtračním papírem a naskenovány skenerem do počítače.

Potom byly membrány inkubovány 25 min na třepačce v blokujícím pufru za pokojové teploty a následně ponechány na třepačce v ředícím pufru s primárními protilátkami (viz tabulka 6) přes noc při 4 °C ve chladové místnosti.

Následující den byly primární protilátky slity, membrány byly 3x promyty destilovanou vodou a 3x po dobu 10 min oplachovány v promývacím pufru. Následně byly přidány sekundární protilátky do ředícího pufru a membrány inkubovány 1 hodinu při pokojové teplotě. Poté byly membrány 3x promyty destilovanou vodou a 3x 10 min promývacím pufrém. Po uplynutí této doby byly membrány inkubovány roztokem chemiluminiscentů (SuperSignal West Femto, Thermo Scientific USA) - 1 ml na membránu po dobu 5 minut. Po vysušení filtračním papírem byly membrány umístěny do vyvolávací kazety.

**Tabulka 6 Přehled využitých protilátek**

Detekovaný protein	Primární protilátka	Ředění primární protilátky	Sekundární protilátka	Ředění sekundární protilátky	Doba expozice
FTO	Anti-FTO antibody lot#: GR 288074-20 Abcam	1 : 10 000	Anti-mouse	1 : 20 000	3 min
METTL3	Anti-METTL3 antibody lot#: GR 233964-2 Abcam	1 : 10 000	Anti-rabbit	1 : 40 000	10 s
YTHDF1	YTHDF1 Rabbit Polyclonal antibody lot#: 00044548 Proteintech	1 : 10 000	Anti-rabbit	1 : 40 000	45 s

### 8.12 Vyvolávání filmu

V temné místnosti byl přiložen film na membránu, a po uplynutí požadované doby expozice (viz tabulka 6), byl film vyvolán ve vyvolávacím stroji.

### 8.13 Opakované použití membrány

Po vyvolání filmu byly membrány vyjmuty z kazety, 3x promyty destilovanou vodou a následně 3x po dobu 10 min promývány promývacím pufrem. Následně byly membrány ponechány 25 min na třepačce v blokujícím pufre. Poté byly membrány ponechány přes noc na třepačce v ředícím pufre s primárními protilátkami při 4 °C a druhý den se pokračovalo v protokolu promýváním (3x destilovanou vodou, 3x 10 min oplachovacím pufrem), 1h inkubací se sekundárními protilátkami, promýváním (3x destilovanou vodou, 3x 10 min oplachovacím pufrem), aplikací chemiluminiscentů a následným vyvoláním filmu.

### 8.14 Softwarové vyhodnocení

Naskenované výstupy (membrány s ponceau barvivem a vyvolané filmy) byly vyhodnocovány v programu ImageJ.

### **8.15 Stanovení proteinové exprese**

Hodnoty získané z filmu byly vztaženy vůči celkové nanášce proteinů (ponceau barvivo). Následně byly tyto hodnoty vztaženy k hladině standardu (tkáň celého kortexu 90-denní WT samice). Hodnoty standardů na jednotlivých membránách byly porovnány a pomocí jejich poměru byly extrapolovány i hodnoty zbylých vzorků, tak aby bylo možné mezi sebou porovnávat veškeré vzorky.

### **8.16 Statistická analýza proteinové exprese**

Výsledky a grafy byly zpracovány ve statistickém programu GraphPad Prism 5. Výsledky jednotlivých skupin byly porovnávány dvoucestnou ANOVOU a doplněny o Bonferonniho *post-hoc* test. V grafech jsou uvedeny hodnoty aritmetického průměru skupiny a chybové úsečky označující SEM.

## 9 Výsledky

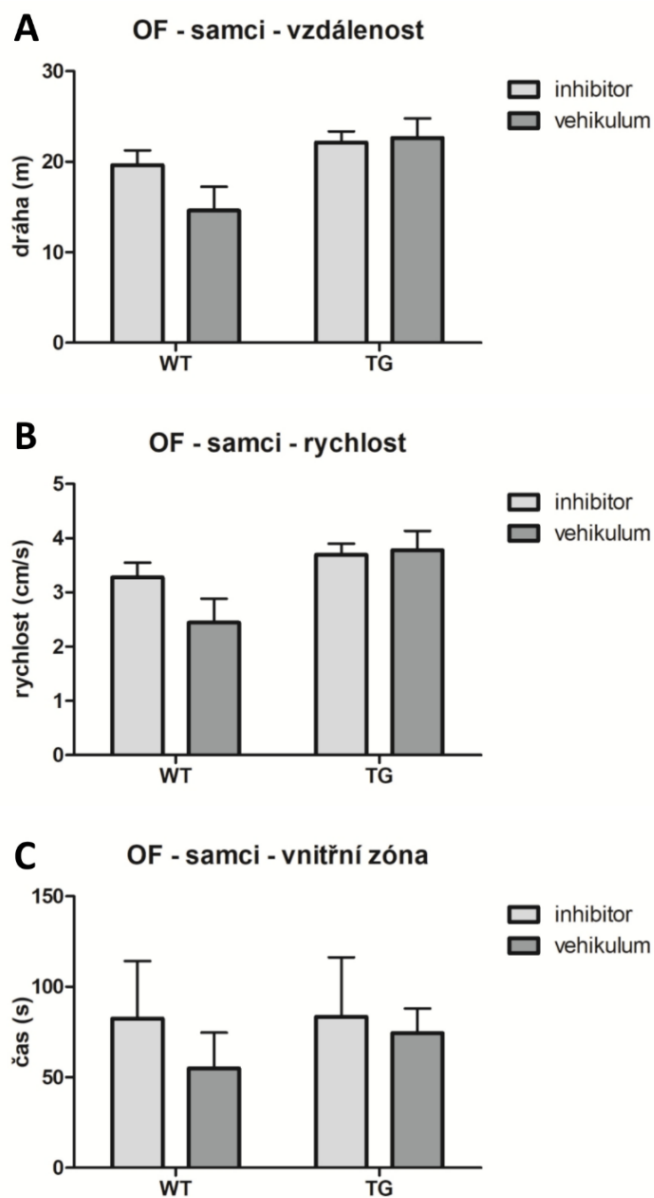
### 9.1 Vliv aplikace MO-I-500 na chování a paměť v potkaním transgenním modelu Alzheimerovy choroby TgF344 AD

Vybraným potkanům TgF344-AD a F344 ve věku  $10 \pm 2$  měsíce a obou pohlaví byl aplikován farmakologický inhibitor RNA-demetylázy FTO látka MO-I-500. Kontrolní skupině bylo podáváno vehikulum. Potkani následně prošli testováním v úloze otevřeného pole (OF; Open Field), vyvýšeného kruhového bludiště (EZM; Elevated Zero Maze), aktivního vyhýbání se místu (AAPA; Active Allothetic Place Avoidance) a nuceného plavání (FST; Forced Swim Test; viz obrázky 9-14).

#### 9.1.1 Vliv MO-I-500 v testu otevřeného pole u potkaních samců TgF344-AD

Na obrázku 9 jsou uvedeny výsledky z testování samců v testu otevřeného pole. Ve sledovaných parametrech překonané vzdálenosti (obr. 9A), průměrné rychlosti pohybu (obr. 9B) a době strávené ve vnitřní zóně (obr. 9C) nebyly nalezeny signifikantní změny mezi skupinami.

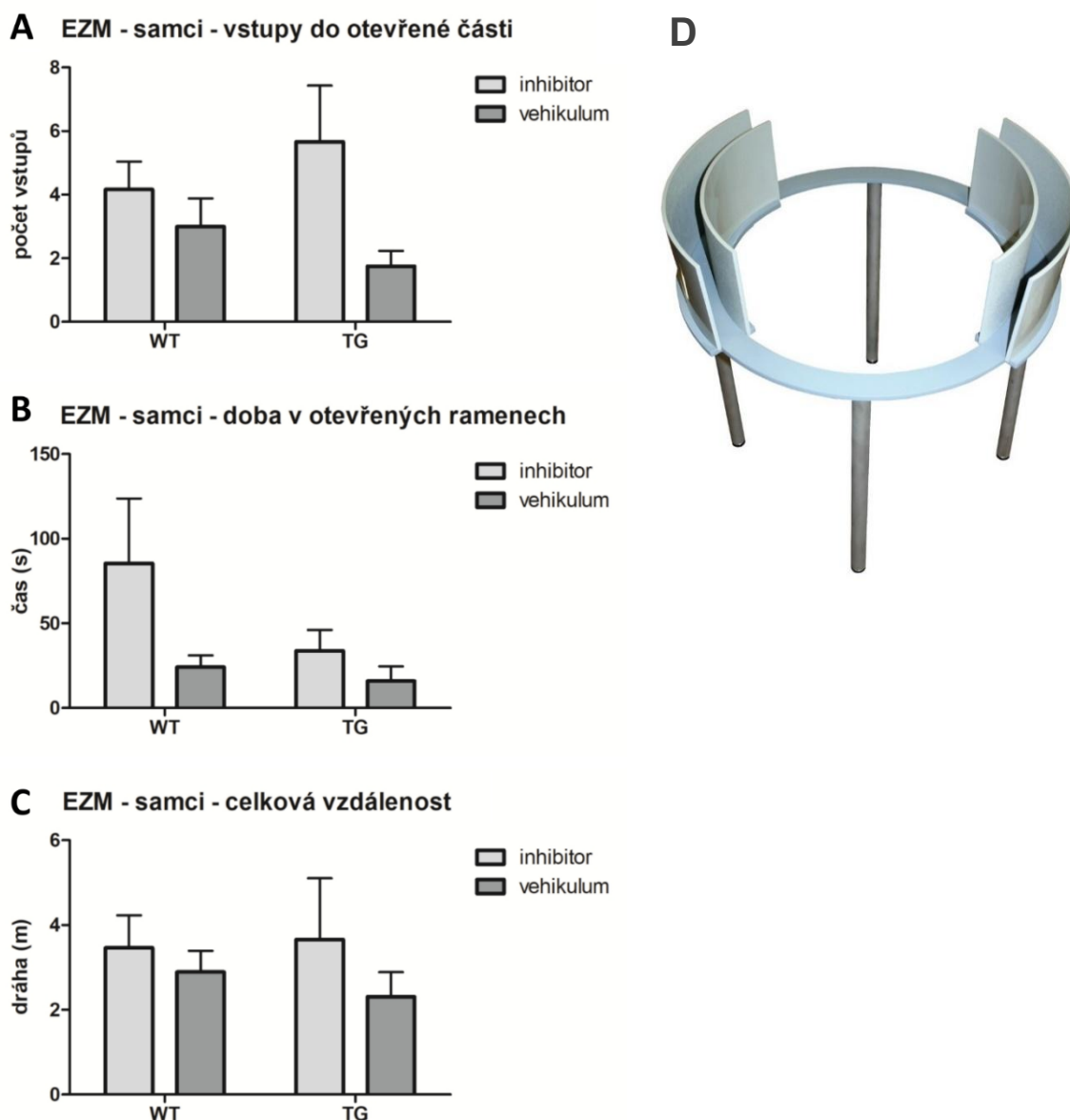




**Obrázek 9. Vliv MO-I-500 v testu otevřeného pole u samců TgF344-AD. A-C:** Sledované parametry byly celková ušlá vzdálenost (A), průměrná rychlost lokomoce (B) a doba pohybu ve vnitřní polovině povrchu pokusné arény (C). Signifikantní změny nebyly nalezeny.

### 9.1.2 Vliv MO-I-500 v testu vyvýšeného kruhového bludiště u potkaních samců TgF344-AD

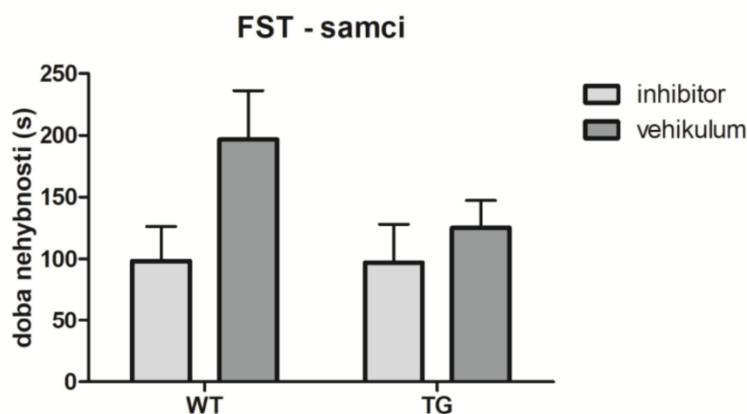
Obrázek 10 obsahuje výsledky z testování samců v úloze vyvýšeného kruhového bludiště. Sledovali jsme parametry počet vstupů do otevřených částí (obr. 10A), dobu strávenou v otevřených částech bludiště (obr. 10B) a celkovou překonanou vzdálenost (obr. 10C). Pouze v jediném z těchto parametrů, počtu vstupů do otevřené části bludiště, byl nalezen signifikantní hlavní efekt látky MO-I-500 [ $F(1,17) = 5,689$ ;  $p < 0,05$ ].



**Obrázek 10. Vliv MO-I-500 v testu vyvýšeného kruhového bludiště u samců TgF344-AD. A až C:** Hlavní sledované parametry chování v testu vyvýšeného křížového bludiště, včetně počtu vstupů do otevřené části bludiště (A), doby strávené v otevřené části (B) a celkové ušlé vzdálenosti (C). Hlavní efekt inhibitoru MO-I-500 byl nalezen u počtu vstupů do otevřených ramen, avšak výsledek nebyl potvrzen signifikantním *post-hoc* testem. **D:** schéma vyvýšeného kruhového bludiště (převzato ze [www.stoelgingco.com/zero-maze.html](http://www.stoelgingco.com/zero-maze.html)).

### 9.1.3 Vliv MO-I-500 v testu nuceného plavání u potkaních samců TgF344-AD

Obrázek 11 obsahuje dobu nehybnosti potkaních samců z celkových 15 minut testování v úloze nuceného plavání. Statistická analýza neprokázala žádný signifikantní rozdíl.

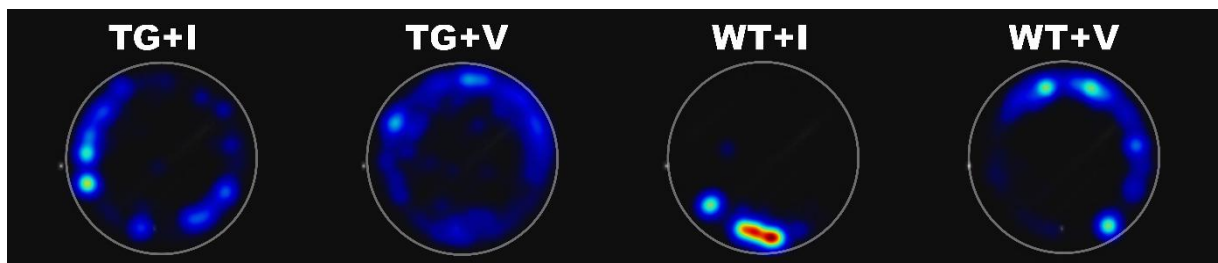
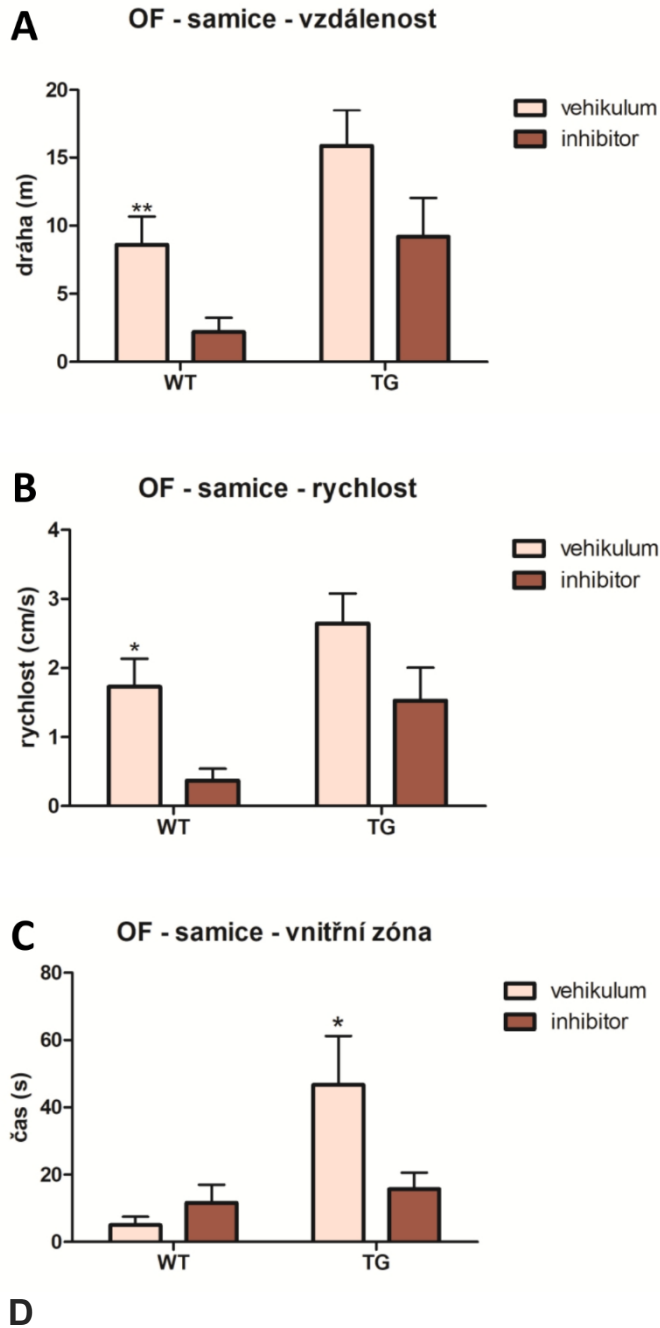


**Obrázek 11. Vliv MO-I-500 v testu nuceného plavání u samců TgF344-AD.** Hlavní efekt inhibitoru MO-I-500 nebyl nalezen.

### 9.1.4 Vliv MO-I-500 v testu otevřeného pole u potkaních samic TgF344-AD

Obrázek 12 ukazuje výsledky samic TgF344-AD a F344 po aplikaci inhibitoru FTO v úloze otevřeného pole. Sleduje celkovou vzdálenost, kterou samice v aréně překonaly (obr. 12A), průměrné rychlosti samic v testu OF (obr. 12B) a graf průměrnou dobu, kterou potkaní samice strávily ve vnitřní zóně arény (obr. 12C).

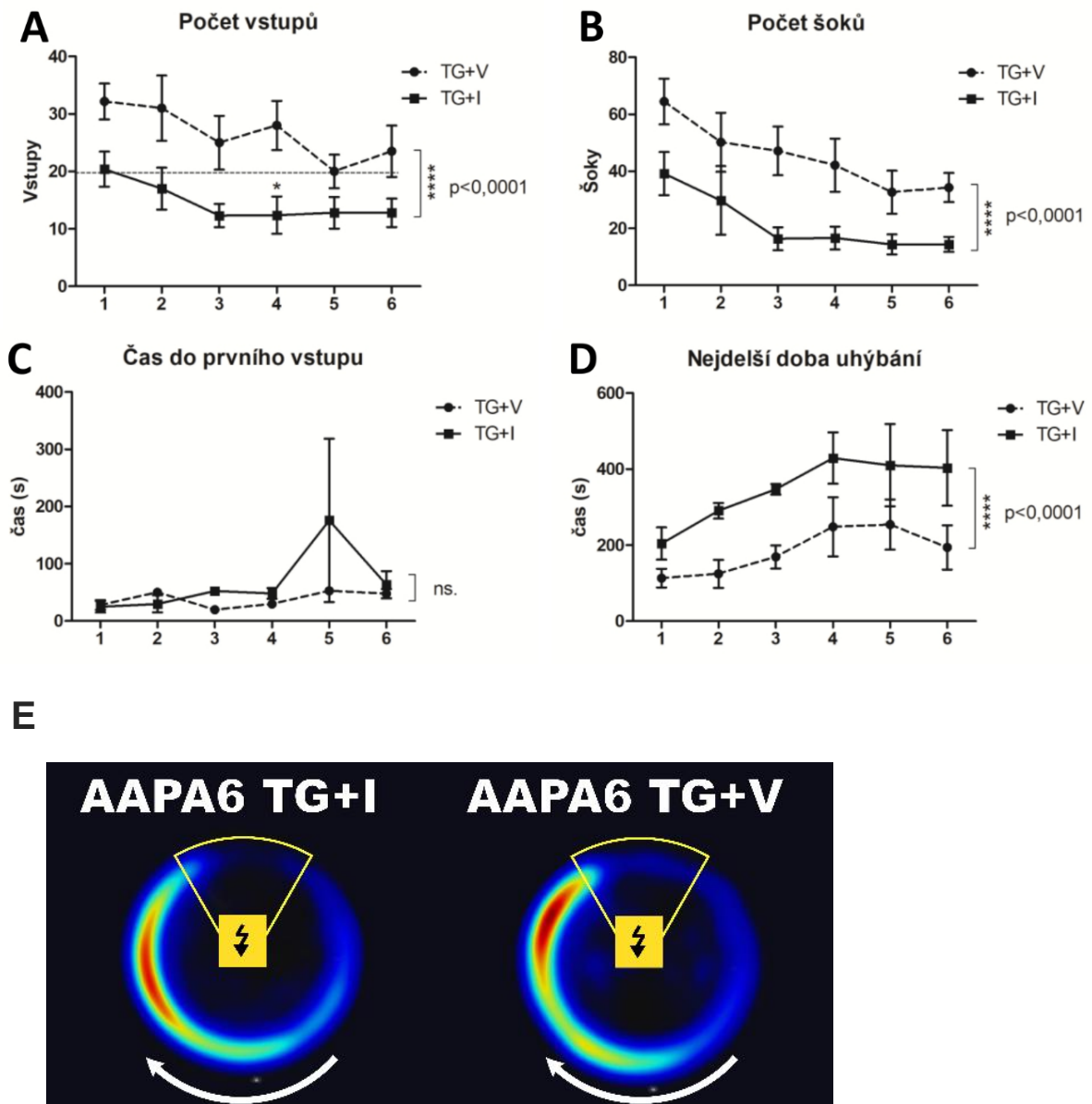
Statistická analýza byla provedena dvoucestnou ANOVOU a ukázala signifikantní efekt genotypu [ $F(1,21) = 9.994$ ;  $p < 0,01$ ] a podávání inhibitoru [ $F(1,21) = 8,432$ ;  $p < 0,01$ ] na rozdíly v překonané vzdálenosti mezi skupinami. Při srovnání průměrné rychlosti byl pozorován velmi signifikantní efekt genotypu [ $F(1,21) = 9,861$ ;  $p < 0,01$ ] a signifikantní efekt podávání inhibitoru [ $F(1,21) = 6,930$ ;  $p < 0,05$ ]. Analýza doby strávené ve vnitřní zóně ukázala signifikantní efekt interakce [ $F(1,19) = 6,365$ ;  $p < 0,05$ ] a velmi signifikantní efekt podávání inhibitoru [ $F(1,19) = 9,413$ ;  $p < 0,01$ ] u TG samic.



**Obrázek 12. Vliv MO-I-500 v testu otevřeného pole u samic TgF344-AD. A až C:** Rozdíly v hlavních parametrech pohybu v pokusné aréně, včetně ušlé vzdálenosti, průměrné rychlosti lokomoce a doby strávené ve vnitřní části arény. Hladiny signifikance v *post-hoc* testech jsou značeny \* ( $p < 0,05$ ) a \*\* ( $p < 0,01$ ). **D:** Heatmapa pohybu jednotlivých skupin samic TgF344-AD v úloze otevřeného pole. Oblast, kde se samice nejvíce zdržovaly je znázorněna červenou barvou, modrá místa jsou oblasti, kde se potkaní samice nacházely nejméně často.

### 9.1.5 Vliv MO-I-500 v testu AAPA u potkaních samic TgF344-AD

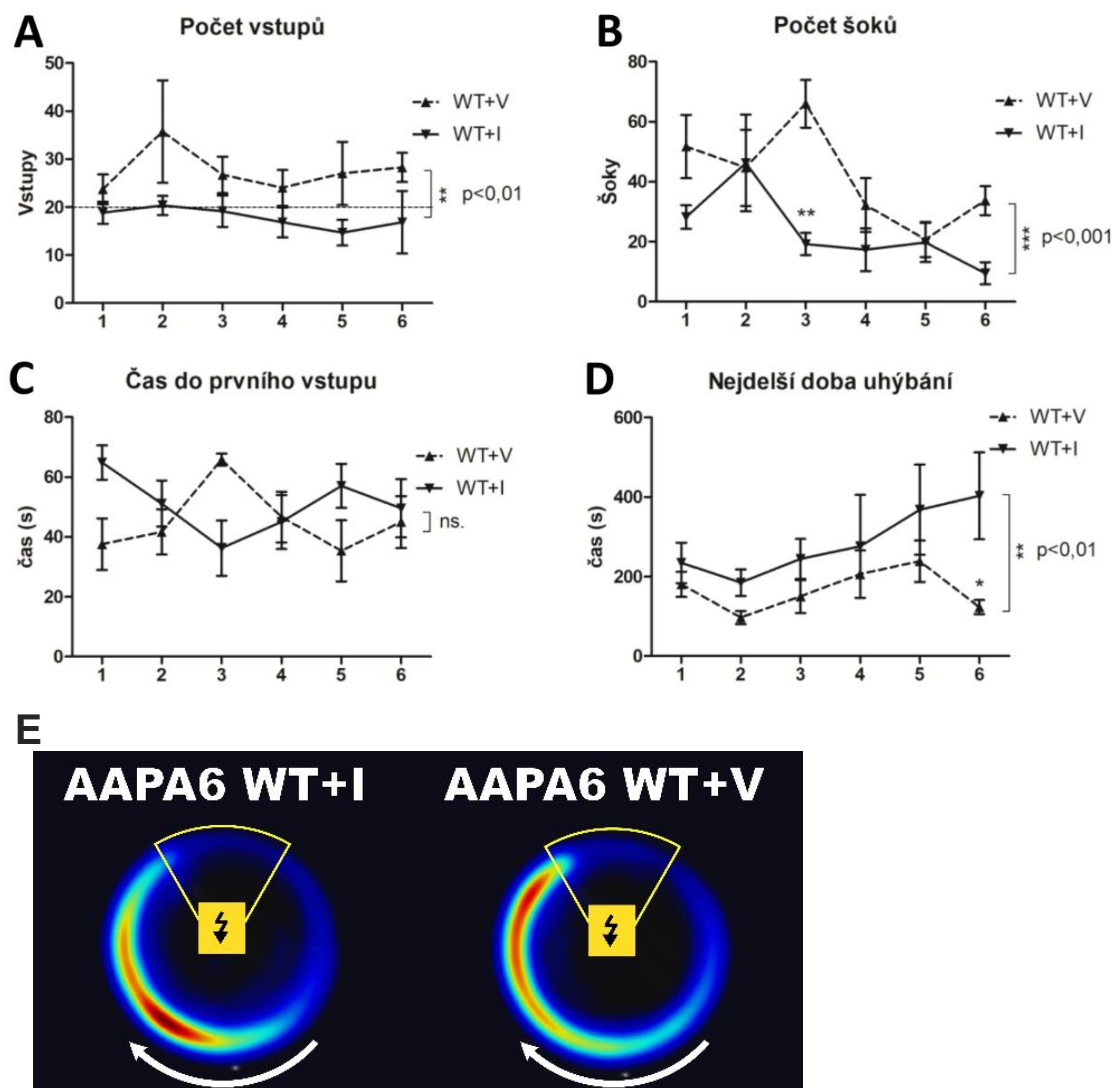
Obrázek 13 popisuje výsledky transgenních samic z úlohy aktivního se vyhýbání místu. Grafy porovnávající parametry jako počet vstupů do oblasti, kde hrozí potrestání elektrošokem (obr. 13A), počet šoků (obr. 13B) a nejdelší doba, po kterou se samice vyhýbaly elektrošokům (obr. 13D) ukazují extrémně signifikantní rozdíl mezi skupinami: počet vstupů [ $F(1,51) = 28,11$ ;  $p < 0,001$ ], počet šoků [ $F(1,51) = 26,09$ ;  $p < 0,001$ ], nejdelší doba vyhýbání se šokové zóně [ $F(1,51) = 19,62$ ;  $p < 0,001$ ]. Při porovnání výsledků času do prvního vstupu nebyl nalezen signifikantní efekt inhibitoru. Kromě vlivu inhibitoru byl nalezen i efekt dní, který se projevil při srovnávání počtu elektrošoků [ $F(5,51) = 3,951$ ;  $p < 0,01$ ], času do prvního vstupu [ $F(5,86) = 3,321$ ;  $p < 0,05$ ] a nejdelší doby vyhýbání se šokové zóně [ $F(5,51) = 2,674$ ;  $p < 0,05$ ].



**Obrázek 13. Vliv MO-I-500 v testu AAPA u TG samic TgF344-AD.** Skupina, které byl aplikován inhibitor (TG+I) je znázorněna plnou čarou, skupina s vehikule (TG+V) přerušovanou čarou. **A:** Počet vstupů do trestané oblasti. Hranice 20 vstupů odpovídající počtu otáček arény během experimentálního sezení je vyznačena přerušovanou čarou. Pouze skupina s inhibitorem dosáhla nižšího průměrného počtu vstupů a aktivně se vyhýbala trestané oblasti. Hipokampálně podmíněný deficit TG+V skupiny byl tedy kompenzován podáním inhibitoru. *Post-hoc* test prokázal signifikantní rozdíl ve čtvrtém dnu učení. **B:** V počtu obdržených šoků byl signifikantní hlavní efekt dny a vlivu inhibitoru. **C, D:** Průměrný čas prvního vstupu do zakázané oblasti a nejdelší doba vyhýbání. **E:** Heatmapa pohybu jednotlivých skupin TG samic TgF344-AD poslední den úlohy AAPA. Žlutou výsečí s bleskem je naznačena oblast, kde dostávali potkani elektrošok, bílá šipka značí směr rotace arény. Hladiny signifikance jsou označeny \* ( $p < 0,05$ ) a \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ).

### 9.1.6 Vliv MO-I-500 v testu AAPA u potkaních samic F344

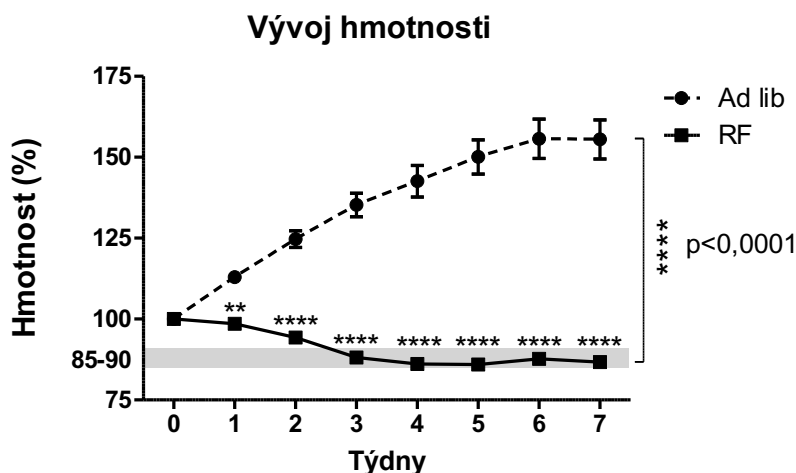
Výsledky WT skupiny samic, kterým byl podáván inhibitor a vehikulum jsou zobrazeny v grafech na obrázku 14. Byl nalezen signifikantní efekt podávání inhibitoru v parametru počtu vstupů do zóny s elektrošoky (obr. 14A) [ $F(1,66) = 11,20$ ;  $p < 0,01$ ], počtu šoků (obr. 14B) [ $F(1,34) = 13,87$ ;  $p < 0,001$ ], a nejdelší době, po kterou se WT skupina dokázala vyhýbat elektrošokům (obr. 14D) [ $F(1,66) = 9,910$ ;  $p < 0,01$ ]. Hlavní efekt dní byl pozorován pouze při srovnávání počtu obdržných elektrošoků [ $F(5,34) = 3,689$ ;  $p < 0,01$ ].



**Obrázek 14. Vliv MO-I-500 v testu AAPA u samic F344. A-D:** Výsledky AAPA úlohy WT samic v jednotlivých dnech testování. Skupina, které byl aplikován inhibitor je znázorněna plnou čarou, skupina s vehikulem je zobrazena přerušovanou čarou. V grafu 14A je vyobrazena hranice 20 vstupů světle šedou čarou. Zajímavé je, že i u WT skupiny zestárých potkanů byl pozorován deficit v hipokampálně podmíněné schopnosti aktivního vyhýbání. U všech sledovaných parametrů s výjimkou času do prvního vstupu byl pozorován signifikantní hlavní efekt inhibitoru. **E:** Heatmapa pohybu jednotlivých skupin WT samic TgF344-AD poslední den úlohy AAPA. Žlutou výšeří s bleskem je naznačena oblast, kde dostávali potkani elektrošok, bílá šipka značí směr rotace arény. Hladiny signifikance jsou značeny \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ) a \*\*\* ( $p < 0,001$ ).

## 9.2 Vliv kalorické restrikce na chování a paměť v potkaním modelu F344

Výsledky behaviorální experimentů po navození kalorické restrikce znázorňují výsledky na obrázcích 15-17. Do experimentu byli zařazeni potkani kmene F344 ve věku 3 měsíce. Ve skupině s omezenou dostupností potravy (RF) i ve skupině krmené ad libitum (Ad lib) byly zastoupeni samci i samice. Potkanům byla během tří týdnů postupně snižována dostupnost potravy, tak aby dosáhli 85-90 % původní hmotnosti. Na této nové úrovni tělesné hmotnosti byli udržováni další 4 týdny (obr 15). Poté byli potkani testováni v úloze OF a AAPA. Pozorované rozdíly v hmotnosti zvířat jsou extrémně signifikantní, uplatňují se hlavní efekt týdnů [ $F(7,144) = 12,24$ ;  $p < 0,0001$ ], dietního režimu [ $F(1,144) = 810,5$ ;  $p < 0,0001$ ] a interakce [ $F(7,144) = 19,53$ ;  $p < 0,0001$ ].



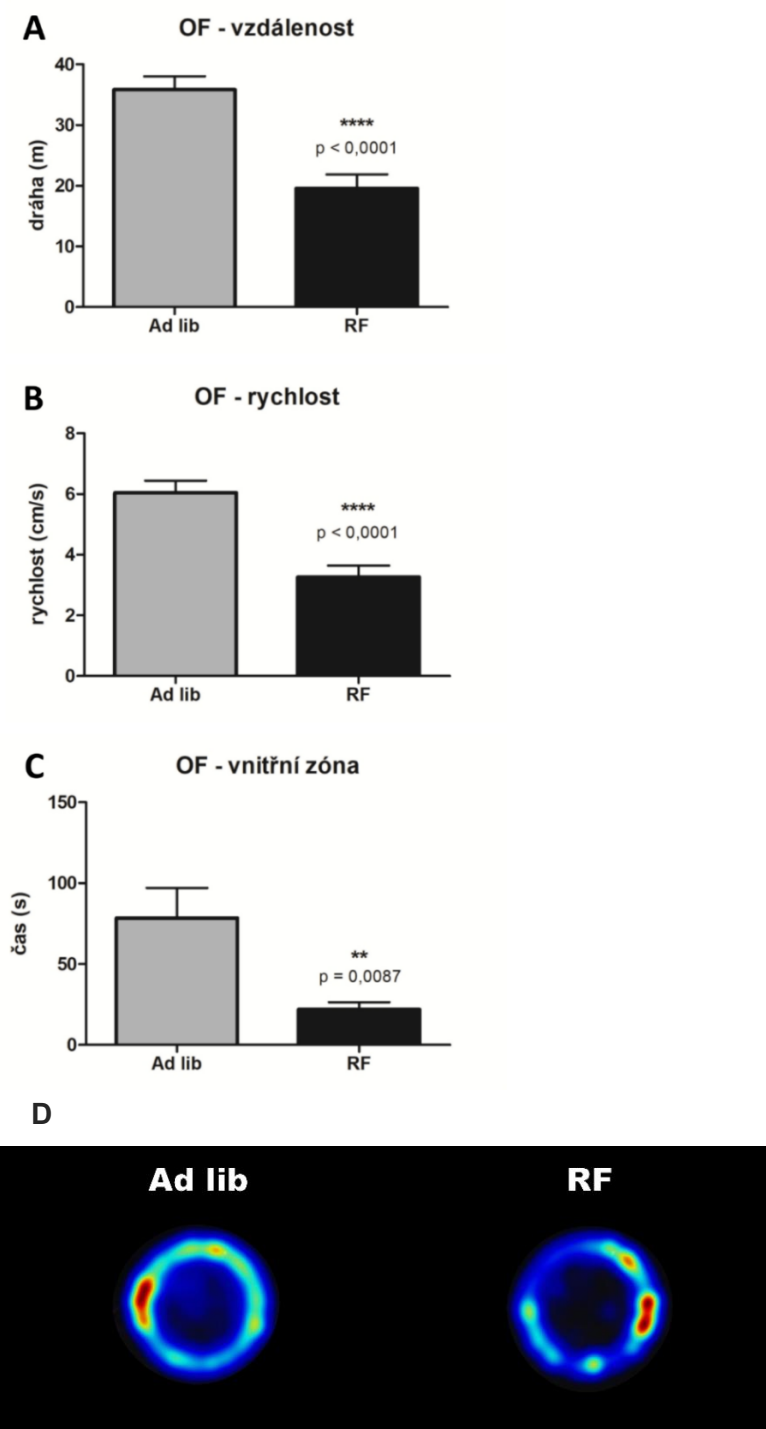
**Obrázek 15 Vývoj hmotnosti potkanů F344 při kalorické restrikci.** Hmotnost zvířat je vztažena k době začátku restrikčního protokolu (den 0; 100 %). Cílová hodnota hmotnosti pro skupinu s kalorickou restrikcí (RF; 85-90 %) je v grafu vyznačena šedým pásmem. Hmotnost kontrolní skupiny (Ad lib) s libovolným přístupem k potravě je vyznačena černými kolečky a přerušovanou čarou. Hmotnost RF potkanů je v grafu označena černými čtverečky a plnou čarou. Hodnoty obou skupin jsou uvedeny jako průměrná hodnota s chybovými úsečkami označující střední chybu průměru (SEM). V případě RF skupiny byla SEM natolik malá, že není v grafu patrná. Hladiny signifikance jsou značeny \*\* ( $p < 0,01$ ) a \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ).

### 9.2.1 Vliv kalorické restrikce v testu otevřeného pole u potkanů F344

V grafech na obrázku 16 lze vidět naměřené parametry z úlohy otevřeného pole při testování potkanů F344, celkovou uběhnutou dráhu v aréně (obr. 16A), kde je rozdíl mezi skupinami Ad lib a RF extrémně signifikantní ( $p < 0,0001$ ). Graf 16B ukazuje signifikantní rozdíl v rychlosti pohybu potkanů v aréně ( $p < 0,0001$ ). Data posledního



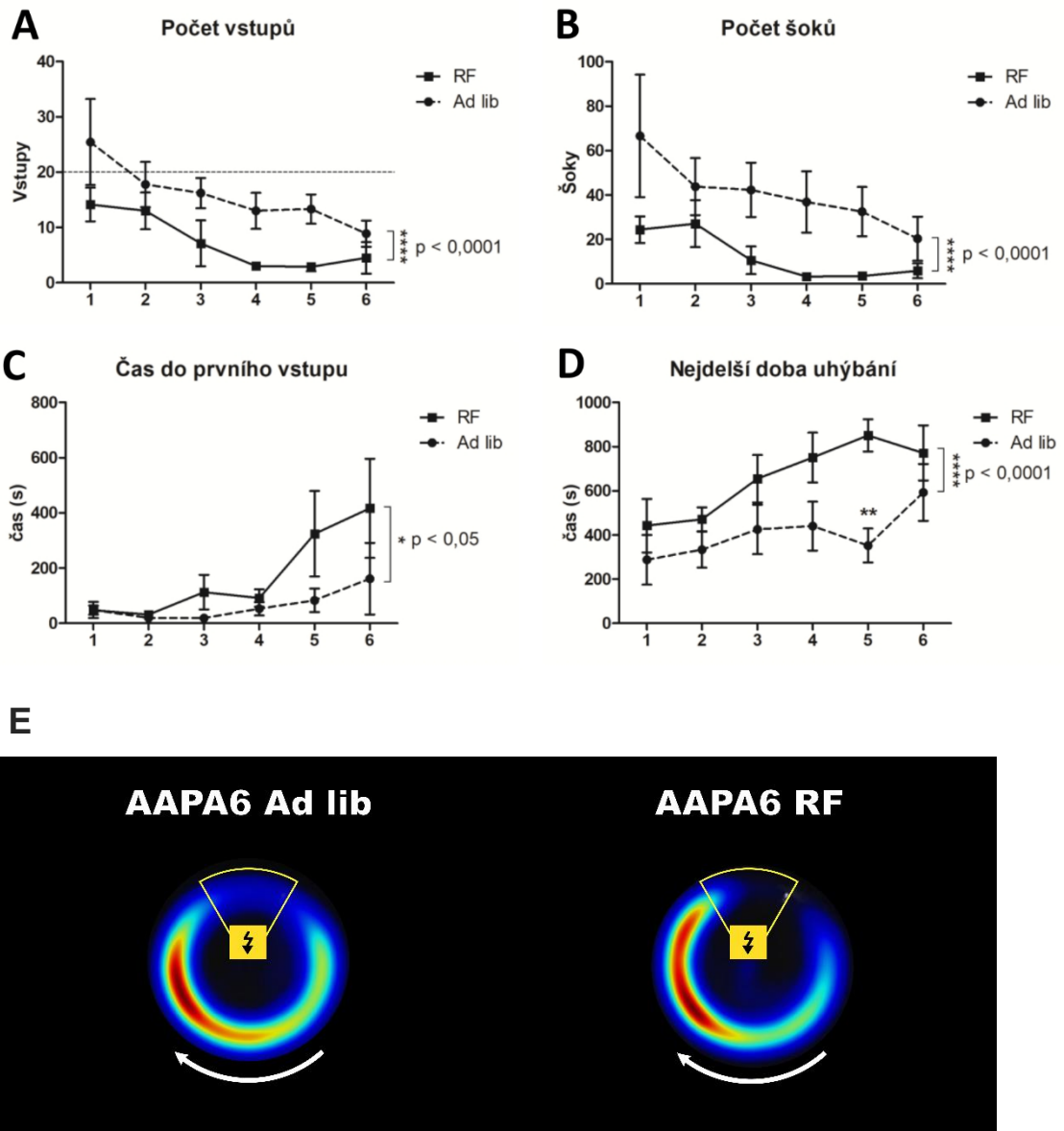
grafu 16C ukazují signifikantní rozdíl mezi Ad lib a RF skupinou v době strávené ve vnitřní zóně arény ( $p < 0,01$ ). Skupiny byly porovnávány oboustranným nepárovým t-testem.



**Obrázek 16. Vliv kalorické restrikce v testu otevřeného pole u potkanů F344. A-C:** Ve všech hodnocených parametrech vykazovala RF skupina nižší explorační aktivitu. Sledovanými parametry byly ušlá vzdálenost (A), průměrná rychlost lokomoce (B) a čas strávený ve vnitřní zóně arény reprezentované vnitřní polovinou obsahu plochy (C). **D:** Heatmapa pohybu jednotlivých skupin potkanů F344 v úloze otevřeného pole. Červenou barvou jsou zvýrazněny místa nejčastějšího výskytu potkanů v aréně, modrou barvou jsou označena místa, kde se potkani pohybovali nejméně. Statistická analýza byla provedena dvouvýběrovým oboustranným Studentovým t-testem, hladiny signifikance jsou označeny \*\* ( $p < 0,01$ ) a \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ).

### 9.2.2 Vliv kalorické restrikce v testu AAPA u potkanů F344

Vliv kalorické restrikce na kognitivní funkce potkanů F344 byl testován 6 dnů pomocí úlohy AAPA. Obrázek 17 obsahuje 4 grafy s údaji o počtu vstupů do šokové oblasti (obr. 17A), kdy byl pozorovaný rozdíl mezi skupinami extrémně signifikantní [ $F(1,86) = 17,19$ ;  $p < 0,0001$ ]. V grafu 17B je porovnáván počet šoků [ $F(1,85) = 18,5$ ;  $p < 0,0001$ ], graf 17C srovnává čas, který uběhl, než potkan poprvé vstoupil do zakázané zóny [ $F(1,86) = 4,903$ ;  $p < 0,05$ ], v grafu 17D je zobrazen rozdíl skupin v parametru nejdelší doby, po kterou se zvířata dokázala vyhýbat zakázané zóně [ $F(1,86) = 17,46$ ;  $p < 0,0001$ ]. Kromě kalorické restrikce se uplatňoval i efekt dní, který ukazuje na velmi signifikantní rozdíl při srovnávání počtu vstupů do zóny s elektrošoky [ $F(5,86) = 4,073$ ;  $p < 0,01$ ] a u nejdelší doby, po kterou se potkani dokázali vyhýbat šokové oblasti [ $F(5,86) = 2,731$ ;  $p < 0,05$ ] a signifikantní změny v parametru doby do prvního vstupu [ $F(5,86) = 3,321$ ;  $p < 0,05$ ].



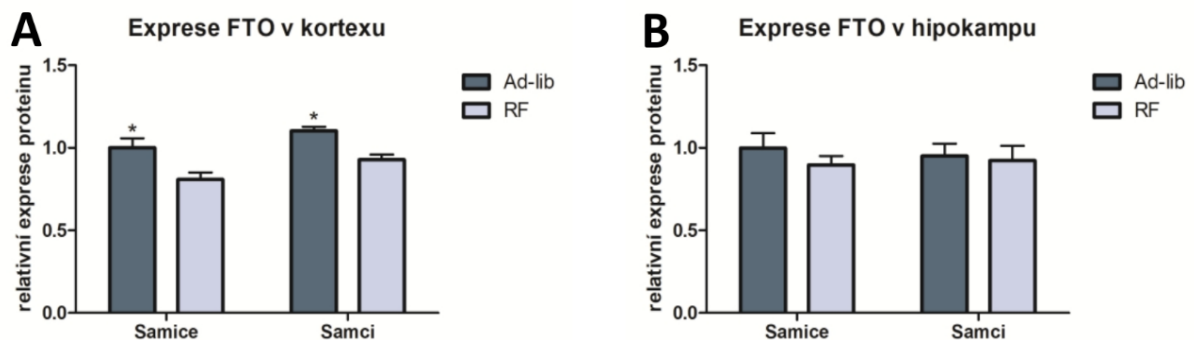
**Obrázek 17. Vliv MO-I-500 v testu AAPA u potkanů F344 v modelu kalorické restrikce.** Ve všech sledovaných behaviorálních parametrech v úloze AAPA byl nalezen signifikantní hlavní efekt diety, skupina s kalorickou restrikcí (RF) vykazovala vždy zlepšení výkonnosti v testu oproti kontrolní skupině (Ad-lib). **A:** Počet vstupů do trestané oblasti. Hranice 20 vstupů odpovídající počtu otáček arény během experimentálního sezení je vyznačena přerušovanou čarou. Obě skupiny prokázaly schopnost aktivního se vyhýbání šokové oblasti. **B-D:** Dalšími sledovanými parametry byly počet šoků, čas do prvního vstupu do trestané oblasti a nejdelší doba uhýbání. **E:** Heatmapa pohybu jednotlivých skupin samic F344 poslední den úlohy AAPA. Žlutá výšeč s bleskem označuje oblast elektrošoků, bílá šipka znázorňuje směr rotace arény. Hladiny signifikace hlavního efektu diety a *post-hoc* testů jsou označeny \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ) a \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ).

### 9.3 Vliv kalorické restrikce na změny exprese proteinů m<sup>6</sup>A dráhy u potkanů F344

Relativní exprese proteinů spřažených s m<sup>6</sup>A dráhou byly získány metodou SDS-PAGE a následným vyhodnocením. Sledujeme vždy expresi vybraného proteinu v kortexu a hipokampu.

#### 9.3.1 Vliv kalorické restrikce na změny exprese FTO u potkanů F344

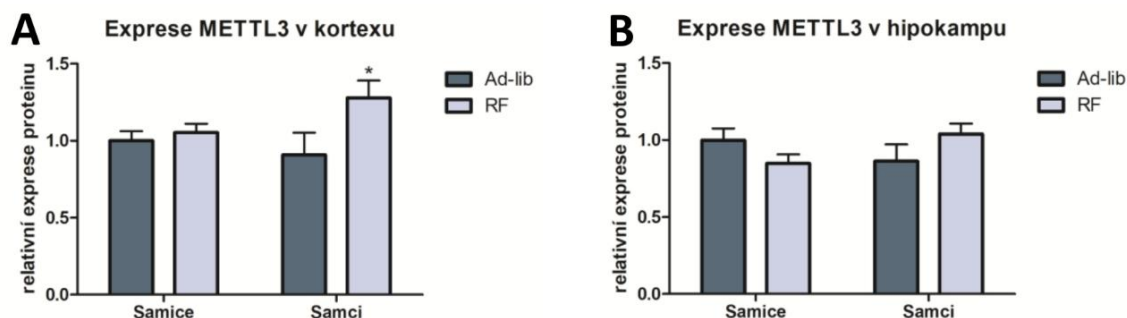
Na obrázku 18 jsou vidět změny exprese FTO u potkanů F344. Graf 18A ukazuje relativní expresi proteinu FTO v kortexu, kde byl prokázán signifikantní efekt dietního režimu [ $F(1,15) = 16,73$ ;  $p < 0,01$ ] i efekt rozdílu pohlaví [ $F(1,15) = 6,126$ ;  $p < 0,05$ ]. V hipokampu (obr. 18B) nebyly nalezeny signifikantní rozdíly v expresi FTO.



**Obrázek 18. Vliv kalorické restrikce na změny exprese FTO u potkanů F344.** U RF zvířat obou pohlaví byla zjištěna snížená exprese RNA demetylázy FTO v mozkové kůře (označeno \*;  $p < 0,05$ ). Změnu exprese v FTO jsme nepozorovali.

### 9.3.2 Vliv kalorické restrikce na změny exprese METTL3 u potkanů F344

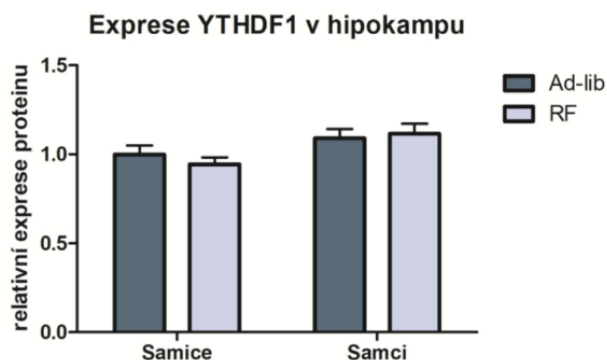
Na obrázku 19 je zobrazena exprese METTL3 v kortexu (obr. 19A), která ukazuje na signifikantní efekt diety [ $F(1,14) = 5,065$ ;  $p < 0,05$ ]. Avšak v hipokampu (obr. 19B) nebyl nalezen žádný signifikantní rozdíl.



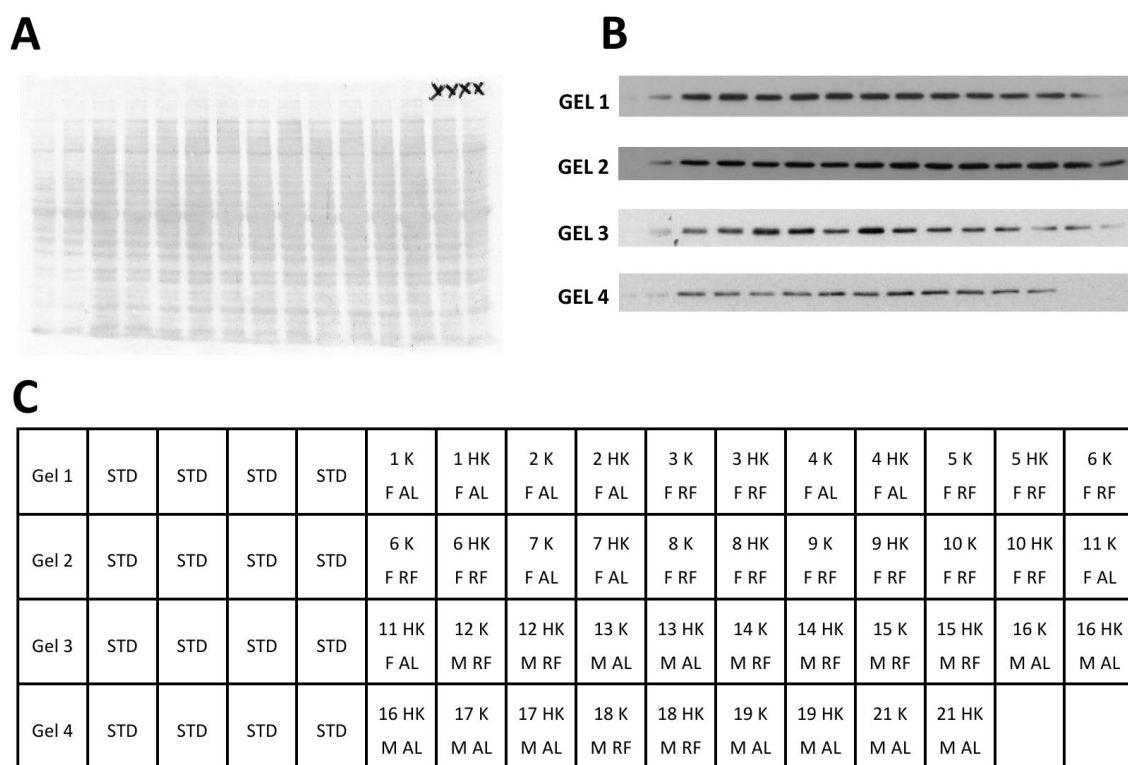
**Obrázek 19. Vliv kalorické restrikce na změny exprese METTL3 u potkanů F344.** U RF samců, avšak nikoli RF samic byla zjištěna signifikantně zvýšená exprese metyltransferázového proteinu METTL3 v mozkové kůře. V hipokampu jsme nepozorovali významné rozdíly v expresi METTL3. Signifikantní rozdíl v *post-hoc* testu je značen \* ( $p < 0,05$ ).

### 9.3.3 Vliv kalorické restrikce na změny exprese YTHDF1 u potkanů F344

V grafu na obrázku 20 lze pozorovat signifikantní efekt pohlaví [ $F(1,14) = 6,931$ ;  $p < 0,05$ ] na expresi YTHDF1 v hipokampu, efekt diety nebyl pozorován.



**Obrázek 20. Vliv kalorické restrikce na změny exprese YTHDF1 u potkanů F344.** V expresi YTHDF1 v hipokampu byl zjištěn hlavní efekt pohlaví, avšak nebylo pozorováno ovlivnění kalorickou restrikcí.



**Obrázek 21. Detekce proteinu METTL3 pomocí imunoblotu. A:** snímek jedné z membrán obarvené Ponceau S. **B:** Proužky imunoblotu odpovídající molekulové hmotnosti METTL3 v kortexu a hipokampu, které byly naneseny celkem na 4 gely, po závěrečném vyvolání na film. **C:** Randomizované pořadí vzorků nanesených na jednotlivé gely je zaznamenáno v tabulce. STD = standard, K = kortex, HK = hipokampus, F = samice, M = samec, RF = kalorické restrikce, AL = neomezený příjem potravy.

## 10 Diskuze

### 10.1 Vliv inhibitoru MO-I-500 na chování v behaviorálních testech u potkanů TgF344-AD

Transgenní potkaní model TgF344-AD, vykazuje několik patologických znaků Alzheimerovy choroby. Jednou z nich je úbytek kognitivních schopností s narůstajícím věkem, jak popsali Cohen *et al.* (2013) při behaviorálním testování v bludišti Barnesové. Naše testování probíhalo v úloze AAPA, která je taktéž zaměřená na testování deklarativní paměti za využití prostorové navigace. Průměrný věk naší testované skupiny byl 12 měsíců, tedy o 3 měsíce nižší než věk potkanů, kteří vykazovali prokazatelně zhoršené výsledky v bludišti Barnesové (Cohen *et al.*, 2013). Farmakologický cíl, protein RNA-demetyláza FTO, byl zvolen na základě souvislosti rizikových SNP variant genu pro FTO na kognitivní funkce u člověka (Benedict *et al.*, 2011), riziko rozvoje Alzheimerovy choroby (Keller *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2018) a významné úlohy m<sup>6</sup>A dráhy v regulaci kognitivních funkcí a nervové plasticity (Li *et al.*, 2017; Yoon *et al.*, 2017; Shi *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2019). Pro ovlivnění FTO byl zvolen inhibitor MO-I-500, který prochází hematoencefalickou bariérou (Zheng *et al.*, 2014).

TG samice, kterým byl aplikován inhibitor MO-I-500 dosahovaly v úloze AAPA lepších výsledků než kontrolní skupina s vehikulem. Signifikantní rozdíl je možné sledovat hned na několika parametrech popisujících chování v úloze. Počet šoků je poslední den úlohy více než o polovinu nižší u TG skupiny s MO-I-500 než u TG skupiny s vehikulem. Podobně i při uhýbání šokové zóně dosahovaly poslední den AAPA TG samice s MO-I-500 dvakrát delší maximální doby vyhýbání. Počet vstupů do zóny s elektrošoky poslední den testování je u TG samic s MO-I-500 téměř o polovinu nižší (13 vstupů) než u TG samic s vehikulem, ale na rozdíl od nich nepřesáhly TG samice s inhibitorem MO-I-500 počet 20 vstupů do zóny. 20 vstupů do zóny je počet vstupů, které by získalo zvíře, které se v úloze chová pasivně a nechá se unášet rotující arénou. To poukazuje na aktivní vyhýbání se této zóně u TG samic s MO-I-500, které je závislé na hipokampu (Stuchlík *et al.*, 2013). Oproti tomu TG samice s vehikulem získaly poslední den v průměru 23,5 vstupů a dalším šokům se zvládly vyhnout až poté, co obdržely první šok. V tomto případě vykazovaly TG samice s vehikulem učení procedurální dovednosti úniku ze šokové oblasti, které je nezávislé na hipokampu. Tyto výsledky ukazují, že aplikace MO-I-500 dokázala zvrátit kognitivní deficit, který je závislý na hipokampu.

WT samice, kterým bylo podáváno MO-I-500 vykazují signifikantní zlepšení kognitivních funkcí v úloze AAPA při porovnání se skupinou WT samic, kterým bylo podáváno jen vehikulum. Tento rozdíl mezi skupinami není tak výrazný jako u TG samic. Poněkud překvapivým zjištěním však byla skutečnost, že nejen u TG zvířat, ale i u zestárlých WT samic byl pozorován deficit v hipokampově závislém vyhýbání se šokové oblasti, neboť počet vstupů do trestané oblasti se nepohyboval pod hranicí 20 vstupů. Například u počtu vstupů do zóny s elektrošoky se WT skupina s inhibitorem držela pod hranicí 20 vstupů a poslední den dosáhla 18 vstupů, skupina WT samic s vehikulem má poslední den AAPA průměrný počet vstupů 27. Přítomnost behaviorálního deficitu u WT samic spolu se signifikantním příznivým vlivem podání inhibitoru MO-I-500 svědčí o tom, že pozitivní účinky inhibitoru na kognitivní funkce nejsou omezeny na jedince s patologickými znaky Alzheimerovy choroby, ale mohou kompenzovat i jiné procesy asociované se stárnutím.

Podle heatmapy pohybu TG i WT potkaních samic z posledního dne AAPA lze konstatovat, že TG i WT skupina s inhibitorem lépe určila pozici úseku s elektrošoky v aréně a držela se od tohoto místa dále než skupiny s vehikulem. To platí zejména o oblasti ve směru proti pohybu hodinových ručiček. Jelikož se aréna otáčela po směru hodinových ručiček, delší setrvávání v této oblasti bylo spojeno s rizikem pasivního zavezení do šokové oblasti. V grafickém znázornění však nejsou vidět veškeré údaje a pro další závěry o strategii potkanů v úloze AAPA by bylo vhodné kvantifikovat data jiným způsobem.

Rozdíl mezi skupinami samic TgF344 a F344 po aplikaci inhibitoru MO-I-500 je patrný i v úloze otevřeného pole, kde lze pozorovat signifikantní rozdíl v rychlosti a uběhnuté dráze, tedy v proměnných, které popisují spontánní lokomoci. WT i TG samice, kterým byl podáván inhibitor, dosahovaly dvakrát nižší rychlosti ( $p < 0,05$ ) a uběhly dvakrát kratší trasu ( $p < 0,01$ ) než skupina, které bylo podáváno vehikulum. Zároveň se v obou těchto parametrech ukázal rozdíl genotypu, kdy TG samice dosahují dvakrát vyšších hodnot než WT samice ( $p < 0,01$ ). TG samice s vehikulem také vykazují výrazně delší dobu pobytu ve vnitřní zóně než WT skupina. Během 10min sezení činí tento rozdíl zhruba 30 s. Dokonce i WT skupina s vehikulem, jejíž průměrná překonaná dráha byla poměrně vysoká, strávila ve vnitřní zóně výrazně kratší dobu. Z uvedených pozorování se zdá, že TG samice se více věnují exploraci, a to i v místech jako je vnitřní prostor arény, která neposkytuje takovou přirozenou ochranu. Tato skutečnost poukazuje na to, že TG samice nevykazují takovou míru thigmotaxe oproti WT skupině. Naše výsledky, které ukazují větší pohybovou aktivitu TG skupiny, jsou ve shodě s dostupnou literaturou popisující chování TGF344-AD potkanů



a WT kontrol (Cohen *et al.*, 2013) a také s experimenty, které prokazují delší dobu explorační nového prostředí u potkanů s poškozením hipokampu (Save *et al.*, 1992).

Výsledky z behaviorálního testování samců TgF344-AD, kterým byl podáván inhibitor a vehikulum nepřinesly mnoho signifikantních rozdílů v testu otevřeného pole, vyvýšeného kruhového bludiště a testu nuceného plavání. Jediný parametr, kde se projevil signifikantní efekt látky MO-I-500 ( $p < 0,05$ ) byl vyšší počet vstupů TG samců s inhibitorem do otevřené části bludiště EZM.

Test nuceného plavání neproběhl podle standardního protokolu (Yankelevitch-Yahav *et al.*, 2015), kdy je potkan první den umístěn na 15 min do nádrže a teprve druhý den (po 24 h) je při 5min testování v nádrži nahráván a data jsou vyhodnocována pouze z druhého dne pokusu. V našem případě nebylo možné z časových důvodů provést 2 sezení, proto byli zvířata nahrávána při 15 min sezení, které bylo následně celé analyzováno.

Z důvodu velmi omezené dostupnosti zvířat s nepoškozeným zrakem, byli samci a samice TgF344-AD po aplikaci inhibitoru MO-I-500 testováni na různých pracovištích a v různých časech. Přes snahu o zachování co nejpodobnějších podmínek testování, včetně zachování stejného testovacího protokolu, použití totožných či identických testovacích aparatur, stejné míry osvětlení a v rámci možností stejné teploty místnosti, nebylo možné zajistit zcela identické podmínky testu. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli výsledky samců a samic neslučovat a přímo neporovnávat statistickými testy.

## **10.2 Vliv kalorické restrikce na projevy potkanů F344 v behaviorálních testech**

Řada studií prokázala příznivé účinky kalorické restrikce na zdraví lidského organismu. Kalorická restrikce je dobrou prevencí neurodegenerativních onemocnění a zlepšuje kognitivní schopnosti (Mattson, 2019), lze ji tedy považovat za prostředek zlepšení kognitivních schopností (tzv. kognitivní enhancement). Výsledky z testování potkanů F344 v úloze AAPA po dlouhodobé 7týdenní kalorické restrikci tyto poznatky potvrdily. Z výsledků můžeme soudit, že obě skupiny prokázaly na hipokampu závislé učení, protože se dokázaly aktivně vyhýbat místu. Poslední den učení v testu AAPA byl průměrný počet vstupů do šokové oblasti 8,8 u Ad lib skupiny a 4,5 u RF skupiny. Tento výsledek je plně v souladu s očekáváním, neboť se jednalo o mladé dospělé jedince, kde nelze předpokládat hipokampální deficit. Přesto byl pozorován významný rozdíl mezi skupinami. Signifikantní efekt diety byl pozorován v parametru počtu šoků, kdy poslední den testování dostala

RF skupina o 75 % méně šoků než Ad lib skupina. Počet vstupů do oblasti s elektrošoky byl v průběhu testování u RF skupiny poloviční až třetinový než u Ad lib skupiny. Doby do prvního vstupu do zóny byla první a druhý den testování téměř na stejné hodnotě, ale během dalších dnů se rozdíl prohluboval a poslední den testování byla u RF potkanů tato doba 2,5x delší než u Ad-lib potkanů. Nejdelší doba, po kterou se potkani dokázali vyhýbat šokové zóně, byla zhruba o 3 min delší u RF potkanů než u Ad lib potkanů. Nejvýraznější byl tento rozdíl 5. den testování, kdy rozdíl činil 8,5 min.

Heatmapa pohybu potkanů v aréně 6. den AAPA ukazuje, že RF potkani se dokázali přiblížit zóně s elektrošoky na menší vzdálenost. To je překvapivě opačná tendence oproti výsledkům z předchozího experimentu, kde se příznivý vliv inhibitoru projevil sníženou dobou pobytu v blízkosti šokové oblasti. Zároveň se skutečností, že získali o 75% méně šoků než Ad lib skupina, to může znamenat, že RF skupina měla preciznější představu o pozici šokového sektoru v porovnání s Ad lib skupinou.

V úloze otevřeného pole vykazovali RF potkani signifikantně nižší (o 46% méně) uběhnutou vzdálenost ( $p < 0,0001$ ) i rychlost ( $p < 0,0001$ ) a vyšší thigmotaxi – o 72% méně času strávili v centrální zóně ( $p < 0,01$ ) než potkani s neomezenou dostupností. Výsledky našeho pozorování z testu otevřeného pole se neshodují s výsledky, které získali Carter *et al.* (2009) u potkanů F344xBN, podstupujících kalorickou restrikcí. Může to být způsobeno nižším věkem našich potkanů, který v době testování činil 4,5 měsíce (3 měsíce věku na začátku experimentu a 7 týdnů kalorické restriktce, testování probíhalo v 7. týdnu), zatímco Carter *et al.* testovali nejmladší skupinu ve věku 8 měsíců, a odlišným způsobem navozovali kalorické restriktce. My jsme snižovali dávku klasické potravy po dobu 3 týdnů a následně udržovali kalorickou restrikcí po dobu dalších 4 týdnů. V jejich případě započalo snižování kalorického příjmu o 10 % kalorického příjmu ve věku 14 týdnů potkana a trvalo 4 týdny, poté byli potkani drženi na 60 % kalorického příjmu kontrolní skupiny.

### **10.3 Vliv kalorické restriktce na změny exprese proteinů spřažených s m<sup>6</sup>A dráhou u F344 potkanů**

Zajímalo nás, zda ovlivnění kognitivních funkcí kalorickou restrikcí, které bylo prokázáno pomocí behaviorálních úloh, může být asociováno se změnami v regulaci m<sup>6</sup>A dráhy. Zaměřili jsme se na studium exprese proteinů m<sup>6</sup>A dráhy v kortexu a hipokampu. V hipokampu je možné pozorovat adultní neurogenezi, která může být podpořena právě kalorickou restrikcí (Hornsby *et al.*, 2016). m<sup>6</sup>A regulace se navíc také uplatňuje v procesu neurogeneze (Yoon *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2018).

Expresi proteinu FTO v kortexu byla signifikantně nižší u samců i samic podstupující kalorickou restrikcí ( $p < 0,01$ ). V hipokampu nebyly nalezeny žádné signifikantní změny exprese proteinu FTO.

Naše výsledky se liší od studie, která nepopisuje žádný efekt krátkodobé diety na expresi proteinu FTO v hypotalamu, mozečku ani rostrální části mozku, která obsahovala kortex i hipokampus (McTaggart *et al.*, 2011). Oba tyto výzkumy byly navíc provedeny na myších samcích C57BL/6J, kteří podstoupili pouze krátkodobou 18h kalorickou restrikcí.

Hladina proteinu METTL3 se v kortexu signifikantně zvyšuje u RF samců ( $p < 0,05$ ) a v hipokampu nedochází k signifikantním změnám jeho exprese. Spolu se sníženou expresí FTO je pravděpodobné, že tato změna u samců vyvolává zvýšení hladiny metylace adenosinu v mRNA. Tato hypotéza bude předmětem našeho dalšího výzkumu.

V hipokampu jsme navíc sledovali expresi proteinu YTHDF1, který je významným čtecím proteinem  $m^6A$  s prokázaným pozitivním účinkem na procesy neuroplasticity v hipokampu (Shi *et al.*, 2018). Případné zvýšení exprese tohoto proteinu by mohlo souviset se zlepšením kognitivních funkcí v testu AAPA. YTHDF1 však vykazoval pouze odlišnou hladinu exprese v závislosti na pohlaví, efekt diety nebyl prokázán.

Tyto výsledky naznačují, že kalorická restrikce může být spojena se zvýšením aktivity  $m^6A$  dráhy v mozkové kůře. Nejistili jsme však žádnou souvislost mezi expresí proteinů  $m^6A$  dráhy a kalorickou restrikcí v hipokampu. K prokázání přímé souvislosti mezi kalorickou restrikcí, zvýšenou aktivitou  $m^6A$  dráhy a zlepšením kognitivních schopností však bude nezbytné provést řadu dalších experimentů, včetně stanovení hladiny  $m^6A$  v mRNA transkriptech a ontologické analýzy metylovaných transkriptů epitranskriptomickými metodami.

## 11 Závěr

Cílem této práce bylo ověřit vztah mezi m<sup>6</sup>A drahou a kognitivními schopnostmi potkanů TgF344-AD, animálním modelem Alzheimerovy choroby. Tento model byl vybrán na základě souvislostí mezi dysregulací m<sup>6</sup>A dráhy a rizikem rozvoje kognitivních poruch. Hladina metylace byla ovlivněna nepřímo farmakologickou inhibicí RNA-demetylázy FTO pomocí látky MO-I-500.

U transgenních potkanů TgF344-AD bylo pozorováno zlepšení kognitivních schopností v behaviorálních testech založených na prostorové orientaci (AAPA) po pětidenním podávání inhibitoru MO-I-500. Inhibice proteinu FTO měla vliv i na rozdíly v chování v testu otevřeného pole a vyvýšeném kruhovém bludišti.

Další nepřímé ovlivnění m<sup>6</sup>A dráhy bylo navozeno dlouhodobou kalorickou restrikcí, které byli vystaveni potkani F344 po dobu 6 týdnů. Omezení příjmu potravy vedlo ke zlepšení kognitivních funkcí, jež se projevilo lepšími výsledky v úloze aktivního se vyhýbání místu. Následná analýza exprese proteinů ukázala signifikantní změny v hladině proteinů m<sup>6</sup>A dráhy FTO a METTL3 v kortexu. V hipokampu, další analyzované struktuře, nebyly pozorovány signifikantní změny proteinů m<sup>6</sup>A dráhy.

Naše výsledky potvrzují vliv m<sup>6</sup>A dráhy na kognitivní funkce, ale pro plné porozumění mechanismům, kterými m<sup>6</sup>A dráha ovlivňuje kognitivní schopnosti, je nutný další výzkum. Získané výsledky ukazují na m<sup>6</sup>A dráhu a proteiny, které ji regulují, jako na potenciální cíle výzkumu při studiu poruch kognitivních funkcí.

## Přehled literatury

### Primární zdroje

- Alarcón, C. R., H. Goodarzi, H. Lee, X. Liu, S. Tavazoie, S. F. Tavazoie. 2015. „HNRNPA2B1 Is a Mediator of m(6)A-Dependent Nuclear RNA Processing Events". *Cell* 162 (6): 1299–1308. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.08.011>.
- Bajo, R., S. Pusil, M. E. López, L. Canuet, E. Pereda, D. Osipova, F. Maestú, E. Pekkonen. 2015. „Scopolamine effects on functional brain connectivity: a pharmacological model of Alzheimer's disease". *Scientific Reports* 5 (7). <https://doi.org/10.1038/srep09748>.
- Benedict, C., J. A. Jacobsson, E. Rönnekaa, M. Sällman-Almén, S. Brooks, B. Schultes, R. Fredriksson, et al. 2011. „The Fat Mass and Obesity Gene Is Linked to Reduced Verbal Fluency in Overweight and Obese Elderly Men". *Neurobiology of Aging* 32 (6): 1159.e1-5. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.02.006>.
- Bentahir M., O. Nyabi, J. Verhamme, A. Tolia, K. Horré, J. Wiltfang et al. 2006. „Presenilin clinical mutations can affect gamma-secretase activity by different mechanisms" *Journal of Neurochemistry* 96 (3): 732-42. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03578.x>.
- Biernat, J., N. Gustke, G. Drewes, E. M. Mandelkow, E. Mandelkow. 1993. „Phosphorylation of Ser262 Strongly Reduces Binding of Tau to Microtubules: Distinction between PHF-like Immunoreactivity and Microtubule Binding". *Neuron* 11 (1): 153–63. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(93\)90279-Z](https://doi.org/10.1016/0896-6273(93)90279-Z).
- Binder, L. I., A. Frankfurter, L. I. Rebhun. 1985. „The Distribution of Tau in the Mammalian Central Nervous System". *The Journal of Cell Biology* 101 (4): 1371–78. <https://doi.org/10.1083/jcb.101.4.1371>.
- Carter, C. S., C. Leeuwenburgh, M. Daniels, T. C. Foster. 2009. „Influence of Calorie Restriction on Measures of Age-Related Cognitive Decline: Role of Increased Physical Activity". *The Journals of Gerontology* 64A (8): 850–859. <https://doi.org/10.1093/gerona/glp060>.
- Cimadevilla, J. M., Y. Kaminsky, A. Fenton, J. Bures. 2000. „Passive and active place avoidance as a tool of spatial memory research in rats". *The Journal of Neuroscience Methods* 102 (2): 155-64. [https://doi.org/10.1016/S0165-0270\(00\)00288-0](https://doi.org/10.1016/S0165-0270(00)00288-0).
- Citron, M., D. Westaway, W. Xia, G. Carlson, T. Diehl, G. Levesque, K. Johnson-Wood, et al. 1997. „Mutant Presenilins of Alzheimer's Disease Increase Production of 42-Residue Amyloid Beta-Protein in Both Transfected Cells and Transgenic Mice". *Nature Medicine* 3 (1): 67–72.
- Cohen, R. M., K. Rezai-Zadeh, T. M. Weitz, A. Rentsendorj, D. Gate, I. Spivak, Y. Bholat, et al. 2013. „A Transgenic Alzheimer Rat with Plaques, Tau Pathology, Behavioral Impairment, Oligomeric A $\beta$ , and Frank Neuronal Loss". *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 33 (15): 6245–56. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3672-12.2013>.
- Colman, R. J., J. J. Ramsey, E. B. Roecker, T. Havighurst, J. C. Hudson, J. W. Kemnitz. 1999. „Body Fat Distribution with Long-Term Dietary Restriction in Adult Male Rhesus Macaques". *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences* 54 (7): B283-290. <https://doi.org/10.1093/gerona/54.7.b283>.
- Correia, S. C., R. X. Santos, M. S. Santos, G. Casadesus, J. C. Lamanna, G. Perry, M. A. Smith, P. I. Moreira. 2013. „Mitochondrial Abnormalities in a Streptozotocin-Induced Rat Model of Sporadic Alzheimer's Disease". *Current Alzheimer Research* 10 (4): 406–19.

- Desrosiers, R., K. Friderici, F. Rottman. 1974. „Identification of Methylated Nucleosides in Messenger RNA from Novikoff Hepatoma Cells". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71 (10): 3971–75. <https://doi.org/10.1073/pnas.71.10.3971>.
- Di Santo, S. G., F. Prinelli, F. Adorni, C. Caltagirone, M. Musicco. 2013. „A Meta-Analysis of the Efficacy of Donepezil, Rivastigmine, Galantamine, and Memantine in Relation to Severity of Alzheimer’s Disease". *Journal of Alzheimer’s Disease: JAD* 35 (2): 349–61. <https://doi.org/10.3233/JAD-122140>.
- Dominissini, D., S. Moshitch-Moshkovitz, S. Schwartz, M. Salmon-Divon, L. Ungar, S. Osenberg, K. Cesarkas, et al. 2012. „Topology of the Human and Mouse M6A RNA Methylomes Revealed by M6A-Seq". *Nature* 485 (7397): 201–6. <https://doi.org/10.1038/nature11112>.
- Dominissini, D., S. Nachtergaele, S. Moshitch-Moshkovitz, E. Peer, N. Kol, M. S. Ben-Haim, Q. Dai, et al. 2016. „The Dynamic N(1)-Methyladenosine Methylome in Eukaryotic Messenger RNA". *Nature* 530 (7591): 441–46. <https://doi.org/10.1038/nature16998>.
- Evrard, P. A., C. Ragusi, G. Boschi, R. K. Verbeeck, J. M. Scherrmann. 1998. „Simultaneous Microdialysis in Brain and Blood of the Mouse: Extracellular and Intracellular Brain Colchicine Disposition". *Brain Research* 786 (1–2): 122–27. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(97\)01454-6](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(97)01454-6)
- Fan, Y., J. Hu, J. Li, Z. Yang, X. Xin, J. Wang, J. Ding, M. Geng. 2005. „Effect of Acidic Oligosaccharide Sugar Chain on Scopolamine-Induced Memory Impairment in Rats and Its Related Mechanisms". *Neuroscience Letters* 374 (3): 222–26. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2004.10.063>.
- Frayling, T. M., N. J. Timpson, M. N. Weedon, E. Zeggini, R. M. Freathy, C. M. Lindgren, J. R. B. Perry, et al. 2007. „A Common Variant in the FTO Gene Is Associated with Body Mass Index and Predisposes to Childhood and Adult Obesity". *Science (New York)* 316 (5826): 889–94. <https://doi.org/10.1126/science.1141634>.
- Friard, O., M. Gamba. 2016. „BORIS: A Free, Versatile Open-Source Event-Logging Software for Video/Audio Coding and Live Observations". *Methods in Ecology and Evolution* 7 (11): 1325–30. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12584>.
- Fu, L., C. R. Guerrero, N. Zhong, N. J. Amato, Y. Liu, S. Liu, Q. Cai, et al. 2014. „Tet-Mediated Formation of 5-Hydroxymethylcytosine in RNA". *Journal of the American Chemical Society* 136 (33): 11582–85. <https://doi.org/10.1021/ja505305z>.
- Goodrick, C. L., D. K. Ingram, M. A. Reynolds, J. R. Freeman, N. L. Cider. 1983. „Differential Effects of Intermittent Feeding and Voluntary Exercise on Body Weight and Lifespan in Adult Rats". *Journal of Gerontology* 38 (1): 36–45. <https://doi.org/10.1093/geronj/38.1.36>.
- Griffin, W. S., L. C. Stanley, C. Ling, L. White, V. MacLeod, L. J. Perrot, C. L. White, C. Araoz. 1989. „Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (19): 7611–15. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.19.7611>
- Grundke-Iqbal, I., K. Iqbal, Y. C. Tung, M. Quinlan, H. M. Wisniewski, L. I. Binder. 1986. „Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (13): 4913–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.13.4913>

- Guo, Z., A. Ersoz, D. A. Butterfield, M. P. Mattson. 2000. „Beneficial Effects of Dietary Restriction on Cerebral Cortical Synaptic Terminals: Preservation of Glucose and Glutamate Transport and Mitochondrial Function after Exposure to Amyloid Beta-Peptide, Iron, and 3-Nitropropionic Acid". *Journal of Neurochemistry* 75 (1): 314–20. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0750314.x>
- Haass C., C. A. Lemere, A. Capell, M. Citron, P. Seubert, D Schenk et al. 1995. „The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by  $\beta$ -secretase cleavage within the secretory pathway". *Nature Medicine* 1 (12): 1291-6. <https://doi.org/10.1038/nm1295-1291>.
- He, D., M. Fu, S. Miao, K. Hotta, G. R. Chandak, B. Xi. 2014. „FTO Gene Variant and Risk of Hypertension: A Meta-Analysis of 57,464 Hypertensive Cases and 41,256 Controls". *Metabolism: Clinical and Experimental* 63 (5): 633–39. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2014.02.008>.
- Hebert, L. E., J. Weuve, P. A. Scherr, D. A. Evans. 2013. „Alzheimer Disease in the United States (2010-2050) Estimated Using the 2010 Census". *Neurology* 80 (19): 1778–83. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31828726f5>.
- Ho, A. J., J. L. Stein, X. Hua, S. Lee, D. P. Hibar, A. D. Leow, I. D. Dinov, et al. 2010. „A Commonly Carried Allele of the Obesity-Related FTO Gene Is Associated with Reduced Brain Volume in the Healthy Elderly". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (18): 8404–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.0910878107>.
- Hornsby, A. K., Redhead Y. T., Rees D. J., Ratcliff M. S., Reichenbach A., Wells T., Francis L., et al. 2016. „Short-term calorie restriction enhances adult hippocampal neurogenesis and remote fear memory in a Ghnr-dependent manner". *Psychoneuroendocrinology* 63: 198-207. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2015.09.023>.
- Hsu, P. J., Y. Zhu, H. Ma, Y. Guo, X. Shi, Y. Liu, M. Qi, et al. 2017. „Ythdc2 Is an N6-Methyladenosine Binding Protein That Regulates Mammalian Spermatogenesis". *Cell Research* 27 (9): 1115–27. <https://doi.org/10.1038/cr.2017.99>.
- Huang, H., H. Weng, W. Sun, X. Qin, H. Shi, H. Wu, B. S. Zhao, et al. 2018. „Recognition of RNA N6-Methyladenosine by IGF2BP Proteins Enhances mRNA Stability and Translation". *Nature Cell Biology* 20 (3): 285–95. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0045-z>.
- Chen, J., Y. Zhang, C. Huang, H. Shen, B. Sun, X. Cheng, Y. Zhang et al. 2019. „m6A Regulates Neurogenesis and Neuronal Development by Modulating Histone Methyltransferase Ezh2". *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* 17 (2): 154-168. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2018.12.007>.
- Chow, J. C., L. L. Hall, S. E. L. Baldry, N. P. Thorogood, J. B. Lawrence, C. J. Brown. 2007. „Inducible XIST-Dependent X-Chromosome Inactivation in Human Somatic Cells Is Reversible". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (24): 10104–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610946104>.
- Church, C., L. Moir, F. McMurray, C. Girard, G. T. Banks, L. Teboul, S. Wells, et al. 2010. „Overexpression of Fto Leads to Increased Food Intake and Results in Obesity". *Nature Genetics* 42 (12): 1086–92. <https://doi.org/10.1038/ng.713>.
- Jansen, W. J., R. Ossenkoppele, D. L. Knol, B. M. Tijms, P. Scheltens, F. R. J. Verhey, P. J. Visser. 2015. „Prevalence of Cerebral Amyloid Pathology in Persons Without Dementia". *JAMA* 313 (19): 1924–38. <https://doi.org/10.1001/jama.2015.4668>.
- Jia, G., Y. Fu, X. Zhao, Q. Dai, G. Zheng, Y. Yang, C. Li, et al. 2011. N6-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO". *Nature Chemical Biology* 7 (12): 885-7. <https://doi.org/10.1038/nchembio.687>

- Karssemeijer, E. G. A., J. A. Aaronson, W. J. R. Bossers, R. Donders, M. G. M. Olde Rikkert, R. P. C. Kessels. 2019. „The Quest for Synergy between Physical Exercise and Cognitive Stimulation via Exergaming in People with Dementia: A Randomized Controlled Trial". *Alzheimer's Research & Therapy* 11 (1): 3. <https://doi.org/10.1186/s13195-018-0454-z>.
- Kelemen, E., A. A. Fenton. 2010. „Dynamic Grouping of Hippocampal Neural Activity During Cognitive Control of Two Spatial Frames". *PLoS Biology* 8 (6): e1000403. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000403>.
- Keller, L., W. Xu, H. Wang, B. Winblad, L. Fratiglioni, C. Graff. 2011. „The Obesity Related Gene, FTO, Interacts with APOE, and Is Associated with Alzheimer's Disease Risk: A Prospective Cohort Study". *Journal of Alzheimer's Disease: Journal of Alzheimer's disease* 23 (3): 461–69. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-101068>.
- Kemnitz, J. W., E. B. Roecker, R. Weindruch, D. F. Elson, S. T. Baum, R. N. Bergman. 1994. „Dietary Restriction Increases Insulin Sensitivity and Lowers Blood Glucose in Rhesus Monkeys". *The American Journal of Physiology* 266 (4 Pt 1): E540-547. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1994.266.4.E540>.
- Khakpai, F., M. Nasehi, A. H.-Rohani, A. Eidi, M. R. Zarrindast. 2012. „Scopolamine Induced Memory Impairment; Possible Involvement of NMDA Receptor Mechanisms of Dorsal Hippocampus and/or Septum". *Behavioural Brain Research* 231 (1): 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.02.049>.
- Kumar, A., N. Seghal, P. S. Naidu, S. S. Padi, R. Goyal. 2007. „Colchicines-Induced Neurotoxicity as an Animal Model of Sporadic Dementia of Alzheimer's Type". *Pharmacological Reports: PR* 59 (3): 274–83.
- Lai, F., R. S. Williams. 1989. „A Prospective Study of Alzheimer Disease in Down Syndrome". *Archives of Neurology* 46 (8): 849–53. <https://doi.org/10.1001/archneur.1989.00520440031017>
- Lecanu, L., J. Greeson, V. Papadopoulos. 2006. „Beta-Amyloid and Oxidative Stress Jointly Induce Neuronal Death, Amyloid Deposits, Gliosis, and Memory Impairment in the Rat Brain". *Pharmacology* 76 (1): 19–33. <https://doi.org/10.1159/000088929>.
- Lee, J., W. Duan, J. M. Long, D. K. Ingram, M. P. Mattson. 2000. „Dietary Restriction Increases the Number of Newly Generated Neural Cells, and Induces BDNF Expression, in the Dentate Gyrus of Rats". *Journal of Molecular Neuroscience: MN* 15 (2): 99–108. <https://doi.org/10.1385/JMN:15:2:99>.
- Li, L., L. Zang, F. Zhang, J. Chen, H. Shen, L. Shu, F. Liang et al. 2017. „Fat mass and obesity-associated (FTO) protein regulates adult neurogenesis". *Human Molecular Genetics* 26 (13): 2398-2411. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx128>
- Li, H., T. O. Kilpeläinen, C. Liu, J. Zhu, Y. Liu, C. Hu, Z. Yang, et al. 2012. „Association of Genetic Variation in FTO with Risk of Obesity and Type 2 Diabetes with Data from 96,551 East and South Asians". *Diabetologia* 55 (4): 981–95. <https://doi.org/10.1007/s00125-011-2370-7>.
- Li, H., Y. Ren, K. Mao, F. Hua, Y. Yang, N. Wei, C. Yue, D. Li, H. Zhang. 2018. „FTO Is Involved in Alzheimer's Disease by Targeting TSC1-MTOR-Tau Signaling". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 498 (1): 234–39. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.02.201>.
- Linder, B., A. V. Grozhik, A. O. Olarerin-George, C. Meydan, C. E. Mason, S. R. Jaffrey. 2015. „Single-Nucleotide-Resolution Mapping of M6A and M6Am throughout the Transcriptome". *Nature Methods* 12 (8): 767–72. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3453>.



- Liu, J., Y. Yue, D. Han, X. Wang, Y. Fu, L. Zhang, G. Jia, et al. 2014. „A METTL3-METTL14 Complex Mediates Mammalian Nuclear RNA N6-Adenosine Methylation". *Nature Chemical Biology* 10 (2): 93–95. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1432>.
- Liu, N., Q. Dai, G. Zheng, C. He, M. Parisien, T. Pan. 2015. „N(6)-Methyladenosine-Dependent RNA Structural Switches Regulate RNA-Protein Interactions". *Nature* 518 (7540): 560–64. <https://doi.org/10.1038/nature14234>.
- Liu, N., K. I. Zhou, M. Parisien, Q. Dai, L. Diatchenko, T. Pan. 2017. „N6-Methyladenosine Alters RNA Structure to Regulate Binding of a Low-Complexity Protein". *Nucleic Acids Research* 45 (10): 6051–63. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx141>.
- Lührs, T., C. Ritter, M. Adrian, D. Riek-Loher, B. Bohrmann, H. Döbeli, D. Schubert, R. Riek. 2005. „3D structure of Alzheimer's amyloid- $\beta$  (1–42) fibrils". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (48): 17342–17347. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506723102>.
- Mantyh, P. W., J. R. Ghilardi, S. Rogers, E. DeMaster, C. J. Allen, E. R. Stimson, J. E. Maggio. 1993. „Aluminum, Iron, and Zinc Ions Promote Aggregation of Physiological Concentrations of Beta-Amyloid Peptide". *Journal of Neurochemistry* 61 (3): 1171–74. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1993.tb03639.x>.
- Masters, C. L., G. Simms, N. A. Weinman, G. Multhaup, B. L. McDonald, K. Beyreuther. 1985. „Amyloid Plaque Core Protein in Alzheimer Disease and Down Syndrome". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82 (12): 4245–49. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.12.4245>
- Mayeux, R., Y. Stern, R. Ottman, T. K. Tatemichi, M. X. Tang, G. Maestre, C. Ngai, B. Tycko, H. Ginsberg. 1993. „The Apolipoprotein Epsilon 4 Allele in Patients with Alzheimer's Disease". *Annals of Neurology* 34 (5): 752–54. <https://doi.org/10.1002/ana.410340527>.
- McDade, E., G. Wang, B. A. Gordon, J. Hassenstab, T. L. S. Benzinger, V. Buckles, A. M. Fagan, et al. 2018. „Longitudinal Cognitive and Biomarker Changes in Dominantly Inherited Alzheimer Disease". *Neurology* 91 (14): e1295–1306. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000006277>.
- McTaggart, J. S., S. Lee, M. Iberl, C. Church, R. D. Cox, F. M. Ashcroft. 2011. „FTO Is Expressed in Neurons throughout the Brain and Its Expression Is Unaltered by Fasting". *PloS One* 6 (11): e27968. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027968>.
- Meyer, K. D., Y. Saletore, P. Zumbo, O. Elemento, C. E. Mason, S. R. Jaffrey. 2012. „Comprehensive Analysis of mRNA Methylation Reveals Enrichment in 3' UTRs and Near Stop Codons". *Cell* 149 (7): 1635–46. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.003>.
- Mitchell, A. J., M. Shiri-Feshki. 2009. „Rate of Progression of Mild Cognitive Impairment to Dementia--Meta-Analysis of 41 Robust Inception Cohort Studies". *Acta Psychiatrica Scandinavica* 119 (4): 252–65. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0447.2008.01326.x>.
- Oddo, S., A. Caccamo, J. D. Shepherd, M. P. Murphy, T. E. Golde, R. Kaye, R. Metherate, M. P. Mattson, Y. Akbari, F. M. LaFerla. 2003. „Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles: Intracellular Abeta and Synaptic Dysfunction". *Neuron* 39 (3): 409–21. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00434-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00434-3)
- Olszewski, P. K., R. Fredriksson, A. M. Olszewska, O. Stephansson, J. Alsiö, K. J. Radomska, A. S. Levine, H. B. Schiöth. 2009. „Hypothalamic FTO is associated with the regulation of energy intake not feeding reward". *BMC Neuroscience* 10: 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-10-129>.
- Ortega, A., M. Niksic, A. Bachi, M. Wilm, L. Sánchez, N. Hastie, J. Valcárcel. 2003. „Biochemical Function of Female-Lethal (2)D/Wilms' Tumor Suppressor-1-Associated Proteins in Alternative Pre-mRNA Splicing". *The Journal of Biological Chemistry* 278 (5): 3040–47. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210737200>.

- Ott A., R. P. Stolk, F. van Harskamp, H. A. Pols, A. Hofman, M. M. Breteler. 1999. „Diabetes mellitus and the risk of dementia: The Rotterdam Study.“ *Neurology* 53 (9): 1937-42. <https://doi.org/10.1212/wnl.53.9.1937>.
- Patil, D. P., C. Chen, B. F. Pickering, A. Chow, C. Jackson, M. Guttman, S. R. Jaffrey. 2016. „M(6)A RNA Methylation Promotes XIST-Mediated Transcriptional Repression“. *Nature* 537 (7620): 369–73. <https://doi.org/10.1038/nature19342>.
- Ping, X., B. Sun, L. Wang, W. Xiao, X. Yang, W. Wang, S. Adhikari, et al. 2014. „Mammalian WTAP Is a Regulatory Subunit of the RNA N6-Methyladenosine Methyltransferase“. *Cell Research* 24 (2): 177–89. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.3>.
- Ramos-Rodriguez, J. J., T. Spires-Jones, A. M. Pooler, A. M. Lechuga-Sancho, B. J. Bacskai, M. Garcia-Alloza. 2017. „Progressive Neuronal Pathology and Synaptic Loss Induced by Prediabetes and Type 2 Diabetes in a Mouse Model of Alzheimer’s Disease“. *Molecular Neurobiology* 54 (5): 3428–38. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-9921-3>.
- Raux, G., L. Guyant-Marechal, C. Martin, J. Bou, C. Penet, A. Brice, D. Hannequin, T. Frebourg, D. Champion. 2005. „Molecular diagnosis of autosomal dominant early onset Alzheimer’s disease: an update“. *Journal of Medical Genetics* 42 (10): 793–95. <https://doi.org/10.1136/jmg.2005.033456>.
- Reitz, C., G. Tosto, R. Mayeux, J. A. Luchsinger, NIA-LOAD/NCRAD Family Study Group, a Alzheimer’s Disease Neuroimaging Initiative. 2012. „Genetic Variants in the Fat and Obesity Associated (FTO) Gene and Risk of Alzheimer’s Disease“. *PloS One* 7 (12): e50354. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050354>.
- Rovio, S., I. K reholt, E. Helkala, M. Viitanen, B. Winblad, J. Tuomilehto, H. Soininen, A. Nissinen, M. Kivipelto. 2005. „Leisure-Time Physical Activity at Midlife and the Risk of Dementia and Alzheimer’s Disease“. *The Lancet. Neurology* 4 (11): 705–11. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(05\)70198-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(05)70198-8).
- Save, E., M. C. Buhot, N. Foreman, C. Thinus-Blanc. 1992. „Exploratory activity and response to a spatial change in rats with hippocampal or posterior parietal cortical lesions“. *Behavioural Brain Research* 47 (2): 113-127. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(05\)80118-4](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(05)80118-4)
- Shi, H., X. Wang, Z. Lu, B. S. Zhao, H. Ma, P. J. Hsu, C. Liu, C. He. 2017. „YTHDF3 Facilitates Translation and Decay of N6-Methyladenosine-Modified RNA“. *Cell Research* 27 (3): 315–28. <https://doi.org/10.1038/cr.2017.15>.
- Shi H., X. Zhang, Y. L. Weng, Z. Lu, Y. Liu, Z. Lu, J. Li et al. 2018. „m6A facilitates hippocampus-dependent learning and memory through YTHDF1“. *Nature* 563 ( 7730): 249-253 <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0666-1>
- Shingo, A. S., T. Kanabayashi, S. Kito, T. Murase. 2013. „Intracerebroventricular Administration of an Insulin Analogue Recovers STZ-Induced Cognitive Decline in Rats“. *Behavioural Brain Research* 241 (3): 105–11. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.12.005>.
- Schwartz, S., M. R. Mumbach, M. Jovanovic, T. Wang, K. Maciag, G. G. Bushkin, P. Mertins, et al. 2014. „Perturbation of m6A writers reveals two distinct classes of mRNA methylation at internal and 5’ sites“. *Cell reports* 8 (1): 284–96. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.05.048>.
- Smith, J. C., K. A. Nielson, J. L. Woodard, M. Seidenberg, S. M. Rao. 2013. „Physical Activity and Brain Function in Older Adults at Increased Risk for Alzheimer’s Disease“. *Brain Sciences* 3 (1): 54–83. <https://doi.org/10.3390/brainsci3010054>.
- Tanzi, R. E., A. I. McClatchey, E. D. Lamperti, L. Villa-Komaroff, J. F. Gusella, R. L. Neve. 1988. „Protease Inhibitor Domain Encoded by an Amyloid Protein Precursor mRNA Associated with Alzheimer’s Disease“. *Nature* 331 (6156): 528–30. <https://doi.org/10.1038/331528a0>.

- Thinakaran, G., D. R. Borchelt, M. K. Lee, H. H. Slunt, L. Spitzer, G. Kim, T. Ratovitsky, et al. 1996. „Endoproteolysis of Presenilin 1 and Accumulation of Processed Derivatives in Vivo". *Neuron* 17 (1): 181–90. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80291-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80291-3)
- Vujovic, P., S. Stamenkovic, N. Jasic, I. Lakic, S. F. Djurasevic, G. Cvijic, J. Djordjevic. 2013. "Fasting Induced Cytoplasmic Fto expression in Some Neurons of Rat Hypothalamus". *PLoS One* 8 (5): e63694. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063694>
- Wang, X, Z. Lu, A. Gomez, G. C. Hon, Y. Yue, D. Han, Y. Fu, M. Parisien, Q. Dai, G. Jia, B. Ren, T. Pan, C. He. 2014. „N6-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability". *Nature* 505 (7481): 117-2. <https://doi.org/10.1038/nature12730>
- Wang, X., B. S. Zhao, I. A. Roundtree, Z. Lu, D. Han, H. Ma, X. Weng, K. Chen, H. Shi, C. He. 2015. „N(6)-Methyladenosine Modulates Messenger RNA Translation Efficiency". *Cell* 161 (6): 1388–99. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.014>.
- Wang, Y., Y. Li, M. Yue, J. Wang, S. Kumar, R. Wechsler-Reya, Z. Zhang, Y. Ogawa, M. Kellis, G. Duester, J. C. Zhao. 2018. „N6-methyladenosine RNA modification regulates embryonic neural stem cell self-renewal through histone modifications". *Nature Neuroscience* 21 (2): 195-206. <https://doi.org/10.1038/s41593-017-0057-1>.
- Wasnes, K. A., T. Ward, A. McGinty, O. Petrini. 2000. „The memory enhancing effects of a Ginkgo biloba/Panax ginseng combination in healthy middle-aged volunteers". *Psychopharmacology* 152 (4): 353-61. <https://doi.org/10.1007/s002130000533>
- Wei, C. M., A. Gershowitz, B. Moss. 1975. „Methylated Nucleotides Block 5' Terminus of HeLa Cell Messenger RNA". *Cell* 4 (4): 379–86. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(75\)90158-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(75)90158-0)
- Wilson, J. X., E. M. Jaworski, S. J. Dixon. 1991. „Evidence for Electrogenic Sodium-Dependent Ascorbate Transport in Rat Astroglia". *Neurochemical Research* 16 (1): 73–78. <https://doi.org/10.1007/BF00965831>
- Wojtas, M. N., R. R. Pandey, M. Mendel, D. Homolka, R. Sachidanandam, R. S. Pillai. 2017. „Regulation of M6A Transcripts by the 3'–5' RNA Helicase YTHDC2 Is Essential for a Successful Meiotic Program in the Mammalian Germline". *Molecular Cell* 68 (2): 374-387.e12. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.09.021>.
- Xiao, W., S. Adhikari, U. Dahal, Y. Chen, Y. Hao, B. Sun, H. Sun, et al. 2016. „Nuclear m(6)A Reader YTHDC1 Regulates MRNA Splicing". *Molecular Cell* 61 (4): 507–19. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.01.012>.
- Yankelevitch-Yahav, R., M. Franko, A. Huly, R. Doron. 2015. „The Forced Swim Test as a Model of Depressive-like Behavior". *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 97 (3). <https://doi.org/10.3791/52587>.
- Yeo, H., Y. Lee, C. Jeon, K. Jeong, Y. B. Jin, P. Kang, S. Kim, et al. 2015. „Characterization of Cerebral Damage in a Monkey Model of Alzheimer's Disease Induced by Intracerebroventricular Injection of Streptozotocin". *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 46 (4): 989–1005. <https://doi.org/10.3233/JAD-143222>.
- Yoon, K. J., F. R. Ringeling, C. Vissers, M. Pokrass, D. Jimenez-Cyrus, Y. Su, N. S. Kim, Y. Zhu, L. Zheng, S. Kim, et al. 2017. „Temporal Control of Mammalian Cortical Neurogenesis by m6A Methylation". *Cell* 171 (4): 877-889.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.003>.
- Yue, Y., J. Liu, X. Cui, J. Cao, G. Luo, Z. Zhang, T. Cheng, et al. 2018. „VIRMA Mediates Preferential M6A MRNA Methylation in 3'UTR and near Stop Codon and Associates with Alternative Polyadenylation". *Cell Discovery* 4: 10. <https://doi.org/10.1038/s41421-018-0019-0>.

- Zheng, G., J. A. Dahl, Y. Niu, Fedorcsak P., C. M. Huang, C. J. Li, C. B. Vågbø, Y. Shi, W. L. Wang, S. H. Song, et al. 2013. „ALKBH5 is a mammalian RNA demethylase that impacts RNA metabolism and mouse fertility“. *Molecular Cell* 49 (1): 18-29. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.10.015>.
- Zheng, G., T. Cox, L. Tribbey, G. Z. Wang, P. Iacoban, M. E. Booher, G. J. Gabriel, et al. 2014. „Synthesis of a FTO Inhibitor with Anticonvulsant Activity“. *ACS Chemical Neuroscience* 5 (8): 658–65. <https://doi.org/10.1021/cn500042t>.
- Zhou, J., J. Wan, X. Gao, X. Zhang, S. R. Jaffrey, S. Qian. 2015. „Dynamic m(6)A mRNA Methylation Directs Translational Control of Heat Shock Response“. *Nature* 526 (7574): 591–94. <https://doi.org/10.1038/nature15377>.

## Sekundární zdroje

- Alzheimer's Association Report - 2018 Alzheimer's disease facts and figures. Alzheimer's Association. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2018.02.001>
- Kinney J. W., S. M. Bemiller, A. D. Murtishaw, A. M. Leiseng, A. M. Salazar, B. T. Lamb. 2018. „Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease“. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions* 4: 575-590. <https://doi.org/10.1016/j.trci.2018.06.014>.
- Mattson M. P. 2019. „An Evolutionary Perspective on Why Food Overconsumption Impairs Cognition“. *Trends in Cognitive Sciences* 23 (3): 200-212. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2019.01.003>
- Schubert, C. 2019. „Technology Feature | Epitranscriptomics: RNA revisited“. *Science* 364 (6441): 696. <https://doi.org/10.1126/science.364.6441.696-b>.
- Stuchlík, A., T. Petrásek, I. Prokopová, K. Holubová, H. Hatalová, K. Valeš, S. Kubík et al. 2013. „Place avoidance tasks as tools in the behavioral neuroscience of learning and memory“. *Physiological Research* 62 Suppl 1: S1-S19.
- Swerdlow, R. H. 2012. „Mitochondria and Cell Bioenergetics: Increasingly Recognized Components and a Possible Etiologic Cause of Alzheimer's Disease“. *Antioxidants & Redox Signaling* 16 (12): 1434–55. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4149>.
- Wyss-Coray, T., J. Rogers. 2012. „Inflammation in Alzheimer Disease-a Brief Review of the Basic Science and Clinical Literature“. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2 (1): a006346. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006346>.
- World Alzheimer report 2018. The International Federation of Alzheimer's Disease and Related Disorders Societies, Inc., Illinois, USA. <https://www.alz.co.uk/research/world-report-2018>.
- Yang, Y., P. J. Hsu, Y. Chen, Y. Yang. 2018. „Dynamic Transcriptomic M6A Decoration: Writers, Erasers, Readers and Functions in RNA Metabolism“. *Cell Research* 28 (6): 616–24. <https://doi.org/10.1038/s41422-018-0040-8>.

## Seznam použitých zkratk

2OG	2-oxoglutarát
3' UTR	3' nepřekládaná oblast
5' UTR	5' nepřekládaná oblast
AAPA	úloha aktivního vyhýbání se místu
AD	alzheimerova demence
Ad lib	ad libitum; dle libosti
ALKBH5	AlkB Homolog 5 protein
APOE	apolipoprotein E
ApoE4	alela epsilon 4 v genu pro Apolipoprotein E
APP	amyloidový prekurzorový protein
APPsw	amyloidový prekurzorový protein se švédskou mutací
APS	ammonium persulfate, peroxidisíran amonný
A $\beta$	beta-amyloid
A $\beta$ 40	beta-amyloid dlouhý 40 aminokyselin
A $\beta$ 42	beta-amyloid dlouhý 42 aminokyselin
BCA	bicinchoninová kyselina
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
BSA	hovězí sérový albumin
CDS	kódující sekvence
CNS	centrální nervová soustava
CO <sub>2</sub>	oxid uhličitý
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	pentahydrát síranu měďnatého
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTT	dithiothreitol
E2	alela epsilon 2
E3	alela epsilon 3
E4	alela epsilon 4
ECM	extracelulární hmota
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EZM	elevated zero maze, vyvýšená kruhová aréna
F344	potkaní kmen Fischer 344
FAB	buthionin-sulfoximin
Fe <sup>2+</sup>	železnatý kation
FST	forced swim test, test nuceného plavání
FTO	Fat Mass and Obesity Associated Protein
H <sub>2</sub> O	voda

HEB	hematoencefalická bariéra
hm <sup>5</sup> C	5-hydroxymetylcytosin
hnRNP	heterogenní jaderný ribonukleoprotein
HNRNPA2B1	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1
HNRNPC	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2
HNRNPG	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G
HPA	hypothalamo-hypofyzární osa
<i>icv</i>	intracerebroventrikální podání
IGF2BP1	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1
<i>ip</i>	intraperitoneální podání
kDa	kilodalton
KIAA1429	Vir Like M <sup>6</sup> A Methyltransferase Associated protein
KM670/671NL	švédská mutace; dvojitá mutace se záměnou lysinu a methioninu za asparagin leucin na pozici 670 a 671 v APP
LD	light/dark; světelný cyklus
lnRNA	dlouhá nekódující RNA
M146V	záměna methioninu za valin na pozici 146 v presenilin 1
m <sup>1</sup> A	N1-metyladenosin
m <sup>5</sup> C	5-metylcytosin
m <sup>6</sup> A	N6-metyladenosin
m <sup>6</sup> Am	N6,2'-O-dimetyladenosin
m <sup>7</sup> G	7-metylguanosen
MAPT	microtubule-Associated Protein Tau
MCI	mírná kognitivní porucha
METTL14	Methyltransferase Like 14 Protein
METTL3	Methyltransferase Like 3 Protein
MgCl <sub>2</sub>	chlorid hořenatý
mRNA	mediátorová RNA
mTOR	mammalian target of rapamycin, savčí cíl rapamycinu
MWM	morrisovo vodní bludiště
Na <sub>2</sub> C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	vínan sodný
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	uhličitan sodný
NaCl	chlorid sodný
NFT	neurofibrilární klubka
O <sub>2</sub>	kyslík
OF	open field, test otevřeného pole
P301L	záměna prolinu za leucin na pozici 301 v tau proteinu
PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
pre-mRNA	primární transkript mRNA

PS1	presenilin 1
<i>PS1ΔE9</i>	presenilin1 s chybějícím exonem 9
PSEN1	presenilin 1
PSEN2	presenilin 2
PVDF	polyvinylidenfluorid
RBM	motiv vázající RNA
RF	kalorická restrikce
RNA	ribonukleová kyselina
rpm	otáčka za minutu
rRNA	ribozomální RNA
rs9939609	jednonukleotidový polymorfismus v místě 9939609
SDS	sodium dodecyl sulfát
SEM	střední chyba průměru
SNP	jednonukleotidový polymorfismus
SVCT1	Sodium-dependent Vitamin C Transporter 1
SVCT2	Sodium-dependent Vitamin C Transporter 2
T2D	diabetes mellitus 2. typu
TBS	trisový pufr
TEMED	N,N,N',N'-tetrametyl-1,2-diaminometan
TG	transgenní
TgF344-AD	transgenní model potkanů odvozený z kmene F344
TMES	homogenizační pufr
tRNA	transferová RNA
TSC1	tuberous sclerosis 1
Tween 20	polyoxyethylen sorbitan monolaurát
WT	wildtype; nemutovaná forma
WTAP	Wilms Tumor 1 Associated Protein
XIST	inaktivační transkript specifický pro chromozom X
YTHDC1	YTH Domain Containing 1
YTHDC2	YTH Domain Containing 2
YTHDF1	YTH N6-Methyladenosine RNA Binding Protein 1
YTHDF2	YTH N6-Methyladenosine RNA Binding Protein 2
YTHDF3	YTH N6-Methyladenosine RNA Binding Protein 3
ZC3H13	Zinc Finger CCCH-Type Containing 13 protein