

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Josef Boubín

Charakteristika nervového systému myši s mutací Lurcher
Characteristics of the nervous system of mice with a Lurcher mutation

Bakalářská práce

Školitelka: RNDr. Zdeňka Bendová, Ph.D.

Praha, 2016

Poděkování

Rád bych poděkoval RNDr. Zdeňce Bendové, Ph.D. za trpělivost a ochotu, se kterou konzultovala vznik této práce. Dále děkuji rodině a všem přátelům, kteří mě při psaní podpořili.

Prohlášení

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

V Praze, 12. 5. 2016

Podpis

Abstrakt

Glutamátový receptor $\delta 2$ (GluR $\delta 2$) je exprimován v dendritech Purkyňových buněk lokalizovaných v kůře mozečku. Správná funkce GluR $\delta 2$ je nezbytná pro zdravý vývoj mozečku, formování synapsí mezi paralelními vlákny granulárních buněk a Purkyňovými buňkami a také pro vznik dlouhodobé deprese důležité pro utváření paměti. Lurcher mutace, lokalizovaná na 6. autozomálním chromosomu, mění tento receptor substitucí aminokyseliny ve třetí transmembránové doméně v konstitutivně otevřený iontový kanál. Následkem této změny dochází k úplnému vymření populace Purkyňových buněk a silné degeneraci granulárních buněk a buněk oliverních neuronů. Myši postižené Lurcher mutací mají sníženou hmotnost a samice rodí menší počty mláďat. Fertilita samců není mutací ovlivněna. Po behaviorální stránce vykazují Lurcher mutanti značné deficity. Trpí ataxií, typickou pro všechny cerebelární neurodegenerace, mají sníženou schopnost ve fyzických výkonech, zhoršenou schopnost orientace a nejsou téměř schopni učení. Tato práce shrnuje současné poznatky o Lurcher mutaci od její molekulární podstaty po behaviorální projevy. Specifické znaky této degenerace nám dovolují zkoumat vliv neurodegenerativních poruch mozečku na celkové kognitivní funkce mozku, objevovat jejich příčiny a nalézat možnosti léčby. Lurcher mutanti jsou vhodnými modelovými organismy pro výzkum původu a léčby nemocí jako je autismus, ADHD a dalších.

Klíčová slova

lurcher mutace, GluR $\delta 2$, Purkyňova buňka, mozeček, neurodegenerace

Abstract

The glutamate receptor $\delta 2$ (GluR $\delta 2$) is expressed in dendrites of Purkinje cells localized in the cerebellar cortex. Correct function of GluR $\delta 2$ is necessary for cerebellar development, synapse formation between parallel fibers of the granular and Purkinje cells and for inducing long term depression important in memory formation. Lurcher mutation, localized to 6th autosomal chromosome, transforms GluR $\delta 2$ into constitutively open ion channel by amino acid substitution in third transmembrane domain. As a result, almost complete disappearance of Purkinje cells population and a large degeneration of granular cells and olivary neurons occurs. Mice impaired by Lurcher mutation have lower body weight and reduced litter size. Fertility of males is not affected. Lurcher mutants display extensive behavioral deficits. Mice suffer from ataxia typical for cerebellar neurodegenerations. They have reduced physical performance, impaired spatial orientation and learning capabilities. The aim of this work is to summarize recent knowledge about Lurcher mutation from molecular basis to behavioral manifestation. Specific characteristics of this degeneration allow us to investigate influences of neurodegenerative cerebellar disorders on cognitive functions of the brain as a whole, study causing factors and treatment possibilities. Lurcher mice are great model organism for research of genesis and treatment of diseases like autism, ADHD and others.

Key words

lurcher mutation, GluR $\delta 2$, Purkinje cell, cerebellum, neurodegeneration

Obsah

1. Seznam použitých zkratk	1
2. Úvod	3
3. Glutamátový receptor $\delta 2$	4
3.1 Struktura a vlastnosti GluR$\delta 2$	5
3.2 Genová struktura	6
4. Mutace Lurcher	7
4.1 Stavba mozečku, jeho funkce a odlišnosti u Lurcher mutantů	7
4.2 Buněčná smrt Purkyňových buněk	9
5. Behaviorální vlastnosti Lurcher mutantů	12
5.1 Motorické výkony a učení	12
5.2 Explorativní chování a prostorová orientace	14
5.3 Chování Lurcher mutantů ve stresové zátěži	16
6. Obdobné cerebelární degenerace	16
7. Možnosti výzkumu	19
7.1 Rozdíly vlastností Lurcher jedinců v závislosti na kmenu původu .	19
7.2 Lurcher mutace v souvislosti s lidskými chorobami	20
8. Závěr	22
9. Použitá literatura	23

1. Seznam použitých zkratk

ADHD	hyperaktivita s poruchou pozornosti, z angl. attention deficit hyperactivity disorder
AMP	adenosinmonofosfát
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxalon
AMPK	AMP-aktivovaná proteinová kináza
<i>Apg6/Vps30</i>	kvasinkový gen asociovaný s apoptózou kódující Beclin1, z angl. autophagy-specific gene
<i>Atg5</i>	lidský gen asociovaný s apoptózou, z angl. autophagy related 5
ATP	adenosintrifosfát
GTP	guanosintrifosfát
B6CBA	myší kmen
<i>Bax</i>	gen asociovaný s apoptózou, z angl. bcl-2-like protein 4
BCL-2	Bcl-2 protein
C1q	proteinová rodina tumor nekrotických faktorů
C3H	myší kmen
DNA	deoxyribonukleová kyselina
<i>Cbln1</i>	cerebellin1
GFP	zelený fluorescenční protein, z angl. green fluorescent protein
GFP-LC3	zelený fluorescenční protein-lehký řetězec protein 3, z angl. green fluorescent protein-light chain protein 3
GluR1	glutamátový receptor 1
GluR6	glutamátový receptor 6
GluRδ2	glutamátový receptor delta 2
GluRδ2^{Lc}	lurcher glutamátový receptor delta 2
iGluR	ionotropní glutamátový receptor
<i>Grid2^{Lc}</i>	myší gen kódující glutamátový receptor delta 2
HEK 293	lidské embryonální ledvinové buňky, z angl. human embryonic kidney 293
Hu-bcl2	lidský bcl2 protein, z angl. human bcl-2 protein
Lc	Lurcher
LC3	protein lehký řetězec, z angl. light chain protein 3
Lc^J	Lurcher Jackson
LTD	dlouhodobá deprese, z angl. long term depression
MGI	internetová databáze myšího genomu, z angl. Mouse Genome Informatics

mRNAmediátorová ribonukleová kyselina
NASP1-naftylacetylspermin
Na⁺ - K⁺ ATPázasodno - draselná pumpa
nPISTPDZ protein interagující specificky s TC10, z angl. PDZ protein
interacting specifically with TC10
NMDAN-methyl-D-asparagová kyselina
NMDG⁺N-methyl-D-glukamin
NR3BN-methyl-D-aspartátový receptor podjednotka 3B
P44. postnatální den; analogicky P5., P6., P7. atd.
PCDdegenerace Purkyňových buněk, z angl. purkinje cell degeneration
PFCprefrontální kortex
Rora^{sg}RAR-příbuzný orfanový receptor alfa staggerer, z angl. RAR-related
orphan receptor alpha staggerer
SPG2sulfatovaný glykoprotein 2
TM1transmembránová doména 1; analogicky TM2, TM3, TM4
ts3Trichinella spiralis resistance 3

2. Úvod

Genová mutace typu Lurcher (Lc) byla poprvé objevena v roce 1954 v anglickém ústavu Medical Research Council Radiobiological Research Unit v Harwelu. První popis Lc mutace u myši pochází z roku 1960 od výzkumníka R. Philipse. Ten ukázal, že tato semi-dominantní mutace genu *Grid2*, označovaná jako *Grid2^{Lc}*, je lokalizována na 6. autozomálním chromozomu (Phillips, 1960). Gen *Grid2* kóduje glutamátový receptor $\delta 2$ (GluR $\delta 2$), který je exprimován téměř výhradně v Purkyňových buňkách mozečku a jehož mutace vede k úplnému vymizení Purkyňových buněk a sekundárně také k degeneraci oliverních a granulárních buněk. Purkyňovy buňky objevil a poprvé popsal v roce 1837 slavný český lékař, biolog a především fyziolog nervové soustavy Jan Evangelista Purkyně. Tyto buňky dodnes na počest objevitele nesou jeho jméno. Purkyňovy buňky jsou základní funkční jednotkou mozečku a patří mezi jedny z největších neuronů v mozku.

Samice s Lc mutací mají v porovnání s divokým typem myši menší počty mláďat. Stejně staré myši postižené Lc mutací mají v průměru menší tělesnou hmotnost v porovnání s kontrolními jedinci ze stejného kmene (Tůma et al., 2015). Homozygotní jedinci s Lc mutací jsou zcela neživotoschopní a umírají během narození v důsledku velké ztráty neuronů ve středním a zadním mozku (Phillips, 1960). Heterozygotní jedinci jsou životoschopní a od roku 1960 jsou často používáni k výzkumu jako vzorový model neurodegenerativních poruch, v současné době především jako model autismu (McKim et al., 2014; Mittleman et al., 2008; Schmahmann & Sherman, 1998; Martin et al., 2010). Mozeček reguluje nejen pohybovou koordinaci, ale účastní se i procesu motorického učení a má vliv i na mnohé další kognitivní funkce. Myši s tímto postižením trpí ataxií, behaviorálními poruchami, neschopností učit se a změnami imunitního i endokrinního systému (Cendelín et al., 2010; Lorivel et al., 2014; Tůma et al., 2015; Vernet-der Garabedian et al., 1998; Araki et al., 1993). Právě degenerace mozečku u Lc myši dovoluje zkoumat poruchy pohybových schopností a kognitivní deficity, které se objevují i u lidí s postižením mozečku (Schmahmann & Sherman, 1998).

Cílem mé práce je popsat molekulární podstatu Lc mutace, její vliv na chování, učení a pohybové schopnosti postižených myši, a zdůraznit tak přínos studia tohoto animálního modelu cerebelární degenerace pro poznání mechanismu vzniku a rozvoje některých psychiatrických onemocnění.

3. Glutamátový receptor $\delta 2$

V roce 1993 byly popsány dvě nové podjednotky ionotropního glutamátového receptoru na základě homologie sekvence s ostatními typy glutamátových receptorů (Araki et al., 1993; Lomeli et al., 1993). Tyto podjednotky byly nazvány $\delta 1$ a $\delta 2$. Shoda mezi jednotkami $\delta 1$ a $\delta 2$ v pořadí aminokyselin v primární struktuře je 56 % a s dalšími typy glutamátových receptorů – kainátovým, NMDA a AMPA sdílí 16-24% homologii. Všechny tyto podskupiny patří do rodiny ionotropních glutamátových receptorů, které patří mezi ligandy řízené kanály.

GluR $\delta 2$ po dlouhou dobu vzdoroval objevení svého vnitřního ligandu, a byl proto označován za sirotčí, neboli orphanový receptor. Teprve Matsuda et al. (2010) objevil, že se na extracelulární N-konec GluR $\delta 2$ váže molekula Cerebellinu 1 (Cbln1). Tento solubilní glykoprotein, patřící do C1q rodiny tumor supresorových proteinů, je sekretován granulárními buňkami. Cbln1 je v mozečku důležitý z mnoha důvodů. Váže k sobě presynaptické adhezni molekuly granulárních buněk a post-synapticky exprimovaný GluR $\delta 2$ v Purkyňových buňkách, kontroluje způsob signalizace mezi těmito buňkami a vyvolává dlouhodobou depresi (LTD z angl. long-term depression) (Hirai et al., 2005). Exprese GluR $\delta 2$ na dendritech Purkyňových buněk a vazba Cbln1 jsou nezbytné k vytvoření nové synapse mezi axonem granulární buňky, neboli paralelním vláknem a Purkyňovou buňkou, jak v *in vitro*, tak v *in vivo* podmínkách. Tomuto významu také nasvědčuje míra exprese GluR $\delta 2$, která je největší právě na dendritických výběžcích Purkyňových buněk, v místech synapsí s paralelními vlákny (Takayama et al., 1995).

Lurcher mutace postihující GluR $\delta 2$ je zapříčiněna tranzicí adeninu za guanin v nukleotidové pozici 1960 (Zuo et al., 1997). Touto změnou je způsobena substituce nepolární aminokyseliny alaninu za polární threonin v 654. aminokyselinové pozici, umístěné ve třetí transmembránové doméně GluR $\delta 2$. Mutace je lokalizována v konzervovaném místě genetického kódu, které je společné pro všechny ionotropní glutamátové receptory, a jsou tak změněny vlastnosti mutovaného kanálu (Zuo et al., 1997).

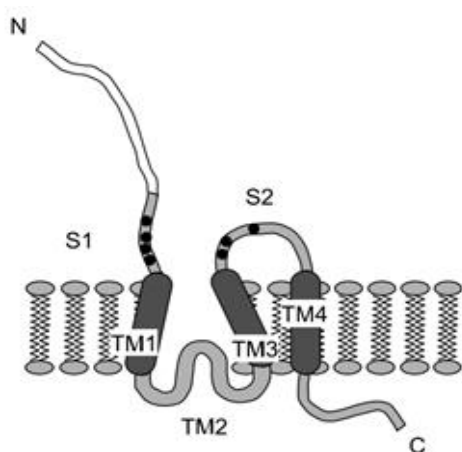
Kromě Purkyňových buněk byl GluR $\delta 2$ nalezen v gliových buňkách epifýzy, ale pouze u 0,03 % buněčné populace (Yatsushiro et al., 2000). Autoři tohoto nálezu spekulují nad tím, že by se tento receptor mohl podílet na regulaci syntézy melatoninu v epifýze nebo se účastnit správného vývoje buněk epifýzy. GluR $\delta 2$ je intenzivně a dlouhodobě zkoumán mnoha výzkumnými týmy, přesto jsem, kromě tohoto článku, nenalezl jinou relevantní zmínku o expresi GluR $\delta 2$ v epifýze (Yatsushiro et al., 2000).

3.1 Struktura a vlastnosti GluR δ 2

Na základě mnoha podobností s ostatními ionotropními glutamátovými receptory (iGluR) (Lomeli et al., 1993; Araki et al., 1993) je struktura GluR δ 2 odvozována podle obecné stavby těchto receptorů. GluR δ 2 má podle předpokladu N-terminální konec vystupující na extracelulární straně membrány a C-terminální část lokalizovanou v cytoplasmě buňky. Dále se skládá ze 4 transmembránových domén (TM), TM1-4, ze kterých se vyjímá TM2 tvořící pór iontového kanálu (obr.1; Nichollis et al., 2013; rev. Yuzaki, 2003).

Doména TM2 ovlivňuje selektivní propustnost kanálu. Klíčovou úlohu v iontově selektivním filtru celého kanálu má typ aminokyseliny, který se v něm nachází. V AMPA a kainátových receptorech glutamátový zbytek umožňuje jen mírnou propustnost pro Ca²⁺. Asparaginový zbytek NMDA receptorů dovoluje vysokou propustnost pro vápníkové ionty, zatímco argininový zbytek kanál pro Ca²⁺ zcela uzavírá (Burnashev et al., 1995).

V transfekovaných buňkách se na GluR δ 2 neváže glutamát ani jeho analogy a receptor sám o sobě nevytváří funkční ionotropní glutamátový kanál ani ve spojení s jinými podjednotkami iGluR (Araki et al., 1993; Lomeli et al., 1993; Kohda et al., 2003). Bodová mutace Lc z GluR δ 2 vytváří konstitutivně aktivovaný receptor a to i bez přítomnosti ligandu. Experimenty z konce devadesátých let prokázaly, že zvýšená propustnost membrány pro sodíkové ionty v heterologních buňkách exprimujících mutantní GluR δ 2, byla přímo způsobena konstitutivní aktivací mutovaného kanálu bez přítomnosti vazebného ligandu. Autoři této studie poukazují na shodné vlastnosti mutovaných kanálů GluR1 a GluR6 ve stejném místě jako Lc mutace u GluR δ 2, zapříčínující též konstitutivně otevřený kanál (Zuo et al., 1997; Kohda et al., 2000).



Obr. 1 - Struktura glutamátového receptoru δ 2; převzato a upraveno z (rev. Yuzaki, 2003)

N-terminální konec vystupuje do extracelulárního prostoru, C-terminální konec je umístěn v cytoplasmě. Transmembránové domény TM 1, 3 a 4 prostupují skrze plasmatickou membránu, zatímco TM2 vytváří smyčku formující kanál.

3.2 Genová struktura

Lc degenerace je způsobena semi-dominantní mutací na 6. autosomálním chromosomu (Phillips, 1960; Zuo et al., 1997). GluR δ 2 je kódován 16 exony. Nejdelším z nich je exon16 kódující 141 aminokyselin, nejkratší exon5 kóduje jen 17 aminokyselin. Všechny 5 intronů svým kódem přesahují 100 kb a nejdelší z nich, intron2, má 408 kb. Celková délka genu tak činí 1,4 Mb. Průměrná délka genu glutamátového receptoru z ostatních skupin je jen okolo 190 kb. Největší gen pro kainátový receptor GluR6 má délku 690 kb, zatímco nejkratším kódujícím úsekem pro receptor je pouze 6 kb dlouhý gen pro NMDA receptor NR3B (Wang et al., 2003). Nadprůměrná velikost genu *Grid2* je možným vysvětlením velkého množství spontánních mutací vznikajících v tomto genu. U myši je v tomto genu v současné době známo minimálně 22 spontánních mutací (MGI – Mouse Genome Informatics 2016). Kódování jednotlivých receptorových podjednotek je silně konzervováno a bývá charakteristické pro každou rodinu. TM1 a TM2 GluR δ 2 jsou společně kódovány exonem11, zatímco TM3 je kódována až exonem následujícím. V každém typu receptoru je kódování umístěno v jiném uspořádání, a tak například kainátová rodina receptorů má každou transmembránovou doménu kódovanou v jiném exonu zatímco v NMDA rodině receptorů NR2 jsou TM2 a TM3 kódovány jediným exonem. Podjednotky TM1 a TM2 AMPA receptorů jsou kódovány společně jediným exonem, tak jako v GluR δ 2. Tento způsob zakódování GluR δ 2 je tedy shodný pouze s geny pro AMPA receptory, nikoliv však pro kainátové či NMDA receptory. Z tohoto důvodu je GluR δ 2 receptor blíže příbuzný systému AMPA receptorů než dvěma dalším (Wang et al., 2003).

V roce 1997 byl ohlášen nález nové alely postihující Lc gen *Grid2^{Lc}*. Tuto alelu objevil tým De Jager et al. (1997) a pojmenoval ji Lurcher Jackson (*Lc^J*). Projevy *Lc^J* mutace jsou u heterozygotních jedinců shodné s původnější Lc mutací. Postiženým jedincům v mozečku degenerují Purkyňovy buňky a s nástupem motility se projevuje ataxie. Větší rozdíly mezi Lc a *Lc^J* vynikají u homozygotů. Část *Lc^J* homozygotů umírá v den porodu, zbývající jedinci, na rozdíl od Lc, však umírají až okolo 25. dne. Tento markantní rozdíl výzkumníci vysvětlují vlastnostmi původního kmene myši, nebo rozdílnou povahou mutace. *Lc^J* mutace je rovněž semi-dominantní.

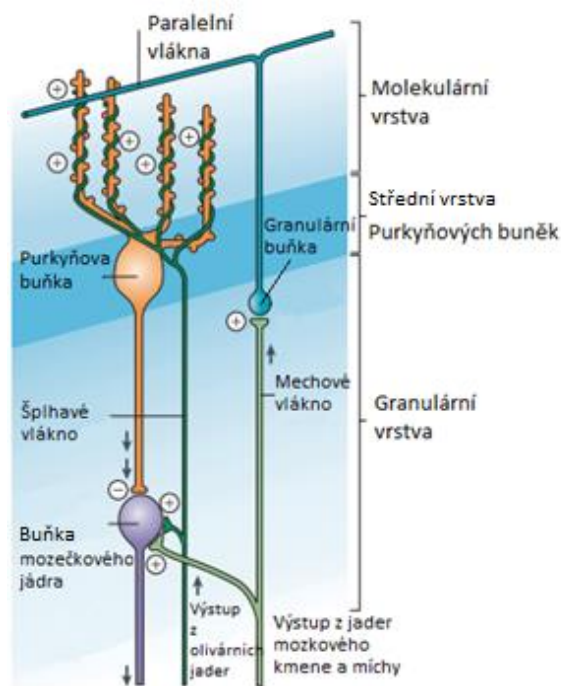
4. Mutace Lurcher

4.1 Stavba mozečku, jeho funkce a odlišnosti u Lurcher mutantů

Pro lepší pochopení významu Lc mutace ve fyziologii centrální nervové soustavy je nezbytné znát stavbu a funkci mozečku, který je touto mutací silně ovlivněn. U člověka je mozeček svým vzhledem a stavbou podobný koncovému mozku. Jeho povrch je zvrásněn závitými nazývanými folia, které výrazně zvětšují jeho plochu, podobně jako gyrifikace koncového mozku. Koncový mozek laboratorních hlodavců jako je myš či potkan však gyrifikaci postrádá a zvrásněn je pouze mozeček. Mozeček se skládá ze dvou hemisfér a prostřední části zvané vermis. Na povrchu mozečku se nachází šedá hmota, vnitřní část je vyplněna bílou hmotou, podobně jako v ostatních částech mozku. Jeho kůra se dělí na 3 vrstvy, které obsahují několik základních typů nervových buněk; Purkyňovy buňky, granulární buňky, Golgiho buňky, hvězdičkové buňky a košíčkové buňky. V prostřední vrstvě se nacházejí Purkyňovy buňky, které jsou nejdůležitější částí mozečku, neboť jejich axony vytváří jediný výstup z mozečkové kůry. Buňky jsou seřazeny v jedné vrstvě. Mají silně rozvětvené dendrity, které jsou ale členěny pouze v jedné rovině a jsou často připodobňované koruně stromu. Hustě větvené dendritické výběžky stoupají do molekulární vrstvy, kde se na ně napojují dva hlavní excitační typy neuronálních vláken, šplhavá a paralelní vlákna (rev. Cerminara et al., 2015). Šplhavá vlákna stoupají z olivového jádra mozkového kmene a přímou synapsí inervují 1 až 10 Purkyňových buněk (Nichollis et al., 2013a). Purkyňova buňka dostává vstup vždy pouze z jednoho šplhavého vlákna, netvoří tedy paralelní synapse. Tato synapse je natolik silná, že vytváří nejsilnější depolarizaci v celém nervovém systému (Eccles et al., 1966). Další vstup vzruchů do mozečku tvoří aferentní mechová vlákna ovlivňující Purkyňovy buňky nepřímo přes excitační synapse na granulárních buňkách. Axony Purkyňových buněk mají inhibiční synapse spojené s neurony v mozečkovém jádře, které je lokalizováno hluboko uvnitř bílé hmoty mozečku. Neurony uvnitř mozečkového jádra vytváří nejvíce výstupů jdoucích z mozečku a zajišťují spojení do celé centrální nervové soustavy (rev. Cerminara et al., 2015).

Ve svrchní molekulární vrstvě kůry mozečku se vyskytují paralelní vlákna z granulárních buněk a interneurony – hvězdičkové a košíčkové buňky, které zprostředkovávají Purkyňovým buňkám vstupy ze vzdálených paralelních vláken. V nejspodnější části se nachází granulární vrstva, ve které jsou hustě seřazeny malé granulární buňky. Paralelní vlákna z granulárních buněk stoupají do svrchní molekulární vrstvy, kde se větví do tvaru T, vedou několik milimetrů podél mozečkových závitů (fólií), aby se zde napojili na vlákna Purkyňových buněk. Každá granulární buňka vytváří synapse s velkým množstvím Purkyňových buněk (obr. 2; Apps & Garwicz, 2005; Cerminara et al., 2015).

Kortex mozečku obsahuje více nervových buněk, než celý zbytek centrální nervové soustavy dohromady, což odpovídá velké kapacitě jeho regulačních procesů (Herculano-Houzel, 2009).



Obr. 2 - Neurální propojení v cerebelárním kortexu; převzato a upraveno z (Apps & Garwicz, 2005)

Migrace vyvíjejících se Purkyňových buněk ze zárodečných zón neurální trubice probíhá až po porodu. V tomto stádiu se formují do jednovrstevné řady pod molekulární vrstvu mozečku (Uzmann, 1960; Miale & Sidman, 1961). Vývoj buněk dále prochází několika morfologickými a fyziologickými stádii. Během prvních devíti dní po porodu se buňka mění jen minimálně. V této době se ještě neprojevují ani charakteristiky Lc mutace. V dalším týdnu vývoje buňka prochází silnými morfologickými a fyziologickými proměnami, aby svůj vývoj dokončila zhruba do 18 postnatálního dne. Dospělá Purkyňova buňka se mění už jen minimálně, jen v nejranější fázi dospělého stádia ještě dochází k obrovskému nárůstu velikosti a komplexnosti jejího dendritického stromu (McKay & Turner, 2005).

Biscoe & Caddy (1979) uveřejnili první rozsáhlou studii, která zpracovávala vliv Lc mutace na počet a vlastnosti buněk mozečku. Během výzkumu byla zpracována data z experimentů na myších ve věku od 4. postnatálního dne (P4) až po P730. Výzkum ukázal, že velikost mozečku Lc mutantů je menší, než u zdravých myší, zatímco velikost neuronů je srovnatelná, mutované myši je však mají více stěsnané. První morfologické změny v mozečku těchto mutantů začínají být patrné mezi P3 a P4. Do té doby probíhá jeho vývoj standardním způsobem. V některých částech laloků začínají Purkyňovy buňky během P4 odumírat a objevuje se pyknotizace jader v molekulární vrstvě. V P5 se ve vrstvě Purkyňových buněk objevují první mezery. První velké ztráty Purkyňových buněk jsou zřejmé mezi P8-10 a do P26 je počet Purkyňových buněk zredukován na 10 % standardní velikosti. Tři měsíce od narození vymizí z mozečku poslední Purkyňovy buňky. Během prvního týdne vývoje se olivární neurony drží standardních počtů jako u zdravých jedinců. V druhém týdnu

života nastává jejich pozvolná degenerace a v P15 je počet těchto neuronů v mozečku Lc myši již o 40 % menší oproti zdravým jedincům. Tento pokles pokračuje dále až do vymizení 75 % olivních neuronů. Počet granulárních buněk je již v P4 menší o 25 % oproti standardu a jejich počet klesá až do 90 % zredukovaných buněk. U těchto dvou typů buněk tedy nedochází nikdy k úplnému vymizení. Navzdory redukcii počtu různých typů buněk, nejsou jádra mozečku ležící v nejhlubší vrstvě degenerací zasažena (Biscoe & Caddy, 1979).

4.2 Buněčná smrt Purkyňových buněk

Excesivní smrt Purkyňových buněk je jednoznačně způsobena Lc mutací. Příčiny a způsob, kterým buňky umírají, je stále cílem výzkumů a zdrojem mnoha otázek. Tento zásadní fenotyp Lc mutace byl zkoumán od začátku jejího objevení a v průběhu let bylo zjištěno několik možných důvodů a způsobů smrti Purkyňových buněk. Lc mutace je způsobena substitucí aminokyseliny alaninu threoninem v silně konzervované oblasti kódující transmembránovou doménu 3 v GluR δ 2. Tato výměna aminokyselin v primární struktuře mění vlastnosti GluR δ 2, a ten se tak stává stále otevřeným kanálem propustným pro kationty. Tuto selektivitu prokázal Zuo et al. (1997) nahrazením extracelulárního Na⁺ organickým kationtem NMDG⁺ (N-methyl-D-glukamin), po kterém se stále zvýšená depolarizace Lc Purkyňovy buňky (-32,8 mV) vrátila do hodnot naměřených u kontrolních buněk (-54,3 mV). V závěru studie autoři z výsledků vyvozují, že apoptotická buněčná smrt Purkyňových buněk zapříčiněná Lc mutací v GluR δ 2 je spojena s excitotoxickou smrtí způsobenou zvýšenou koncentrací intracelulárního Ca²⁺ (Zuo et al., 1997). Chronickou depolarizací je nejspíše zapříčiněna stálá a vysoká aktivita Na⁺-K⁺ ATPázy, která pro svou činnost vyžaduje zvýšení energetického přísunu a klade nároky na množství ATP v těle buňky. Stoupá tedy i aktivita mitochondriální cytochrom-oxidázy, aby pokryla požadavky na zvýšené množství ATP. Zvýšení buněčné respirace vede k nárůstu množství kyslíkových radikálů, které silně buňku poškozují (Vogel et al., 2001). Starší studie (Dumesnil-Bousez & Sotelo, 1992) popisující pozorované znaky, jako jsou axonální otoky, perinukleární kondenzace chromatinu a navíc rozšířené krysty ve zvětšených mitochondriích, vyhodnocuje tato fakta jako důkaz nekrotického způsobu smrti Purkyňových buněk. Tento názor je dále podpořen popisem nekrotických tělísek, která jsou pohlcována převážně makrofágy nebo v menší míře astrocyty.

Pro apoptotickou smrt Purkyňových buněk se vyslovil Norman et al. (Norman et al., 1995). Pod elektronovým mikroskopem našel v postižených Purkyňových buňkách typické apoptotické znaky, které se v kontrolních buňkách zdravých jedinců nevyskytovaly tj. axonální otoky, kondenzaci chromatinu, vznik nepravidelných záhybů membrány způsobených rozvolněným cytoskeletem, doprovázené omotáváním umírajících Purkyňových buněk gliemi. Další důkaz apoptotické smrti Purkyňových buněk Norman nachází v typické degradaci DNA na malé fragmenty, nalezené v Purkyňových buňkách před jejich smrtí. Jako třetí nezávislý důkaz apoptózy Norman dále sledoval expresi sulfatovaného glykoproteinu 2 (SGP2). Molekula SPG2 je sekretována Sertoliho

buňkami a vyskytuje se často v buňkách centrální nervové soustavy podstupujících programovanou buněčnou smrt (Michel et al., 1992). Pomocí *in situ* hybridizace vizualizoval expresi SPG2 mRNA, ta se podle očekávání silně exprimovala v Lc Purkyňových buňkách, zatímco v Purkyňových buňkách kontrolních jedinců nebyla detekována. Tyto důkazy společně s pozorovanými apoptickými tělísky, které již byly pohlceny gliemi, svědčí podle této studie o apoptotickém způsobu smrti.

Nárůst prokaspázy 3 v Purkyňových buňkách Lc mutantů, exprimované zhruba ve čtvrtině buněk v období od P12 do P20, pozoroval Selimi et al. (2000). Prokaspáza 3 je prekurzorem pro protein kaspázu 3 podílející se na aktivaci procesu apoptózy. Kaspázu 3 však vědci našli jen v několika roztroušených Purkyňových buňkách po celém mozečku. Tento fakt vysvětlili tím, že Purkyňovy buňky po aktivaci kaspázy 3 rychle degenerují a nebo apoptóza hraje pouze minoritní roli ve smrti Purkyňových buněk.

Řada výzkumů se zabývala změnou exprese pro-apoptotických a anti-apoptotických proteinů za účelem zablokování apoptózy. Tyto pokusy, navzdory pozorovaným morfologickým a molekulárním známkám apoptózy, nebyly příliš úspěšné. Zvýšení množství anti-apoptotického proteinu BCL-2 v mozečku Lc mutantů bylo docíleno zkřížením dvou transgenních kmenů myši exprimujících lidský Hu-bcl-2. Zvýšená exprese tohoto proteinu zpozdila nástup buněčné smrti, přesto nezamezila degeneraci Purkyňových buněk (Zanjani et al., 1998). Pokusy snažící se předejít procesu apoptózy blokací pro-apoptotického proteinu Bax byly rovněž neúspěšné (Selimi, Vogel, et al., 2000). Přestože zablokováním, či zesílenou expresí jen určitých proteinů, mohla být apoptóza ovlivňována jinými proteinovými drahami, byly těmito výsledky podpořeny názory, podle kterých je apoptóza pouze minoritní příčinou smrti Purkyňových buněk.

Posledním z diskutovaných způsobů buněčné smrti probíhajícím v Purkyňových buňkách Lc jedinců je autofagie. Podle studie (Yue et al., 2002) se na GluR δ 2 skrze protein nPIST váže Beclin1. nPIST je protein vážící se na C-konec GluR δ 2. Beclin1 je savčí protein ortologní k autofágickému genu kvasinek *Apg6/Vps30*, který se při zvýšené expresi účastní zahájení autofagie v kultivovaných lidských buňkách (Liang et al., 1999). Ve své studii autoři hypotetizují, že by chronickou aktivací GluR δ 2 mohlo dojít k uvolnění Beclinu1 a tím vzniku autofagie vedoucí k buněčné smrti neuronů.

V diskuzi studie se autoři přiklání k autofagickému typu smrti Purkyňových buněk z mnoha důvodů. Objevíli vazbu mezi GluR δ 2 a Beclin1 a proteiny Beclin a nPIST se vyskytují v autofagických vakuolách. Proto navrhuje hypotézu, podle které je vznik apoptózy zahájen aktivací proteinového komplexu GluR δ 2-nPIST-Beclin1. Na základě nefunkčnosti omezení exprese pro-apoptotického genu *Bax* autoři navrhuje, že smrt Purkyňových buněk probíhá drahou, která je na proteinu Bax nezávislá. Pozdější nálezy autofagosomů v otocích axonálních výběžků Purkyňových buněk však hypotézu o autofagické smrti poněkud zpochybňují. Tyto autofagosomy byly hojně lokalizovány v hlubokých jádrech mozečku, avšak ne v tělech nebo dendritech Purkyňových buněk (Wang et al., 2006). Autoři studie tohoto zjištění docílili zkřížením Lc myši s transgenním kmenem

exprimujícím protein light chain 3 (LC3) označený zeleným fluorescenčním proteinem (GFP). LC3 protein je silně asociován s mikrotubuly autofagosomů, a proto slouží jako marker autofagie. Pouze malá část Purkyňových buněk exprimovala GFP-LC3 protein v těle nebo dendritech po P14.

Zajímavé výsledky přinesl výzkum týmu Nishiyama et al. (2010). Autoři exprimovali GluR δ 2 nebo mutovaný GluR δ 2^{Lc} v heterologních buňkách HEK293 nebo v hipokampálních neuronech *in vitro*. Autofagie byla vyvolána v těchto buňkách, do kterých byl navíc přidán zesílený GFP-LC3. Změnami koncentrace extracelulárního Na⁺ nahrazením nepermeabilním NMDG⁺ a také vložení mutací do kanálu GluR δ 2^{Lc}, které zabraňovaly vstupu buď Ca²⁺ nebo všech kationtů dokázali, že zahájení autofagie a buněčné smrti závisí pouze na ustáleném vstupu Na⁺ a ne Ca²⁺. Delecí C-terminálních aminokyselin v GluR δ 2 nezbytných pro přichycení nPIST a tím pádem i k navázání Beclin1 nezabránili spuštění autofagie a zahájení buněčné smrti. Při dalším z pokusů buňky exprimující GluR δ 2^{Lc} vykazovaly pokles hladiny ATP a nárůst aktivity AMP-aktivované protein kinázy (AMPK) podle změn koncentrace extracelulárního Na⁺. AMPK je aktivována fosforylací podle úrovně intracelulárního poměru ATP/AMP a je nezbytná pro proces autofagie. Při pokusu blokace autofagie se ale nepodařilo procesu autofagie zabránit. Pokus s přerušením expimace genu *Atg5* nezbytného pro autofagii nezamezil a naopak spíše podpořil buněčnou smrt. V Lc Purkyňových buňkách byla navíc *in vivo* pozorována specifická aktivace calpainu, který je často spojován s nekrotickou smrtí buněk (Wang, 2000). Ze svých výsledků autoři soudí, že nárůstem intracelulárního Na⁺ klesá množství energie v buňce, což vyvolává autofagii. Purkyňovy buňky ale nakonec umírají nekrotickou buněčnou smrtí v důsledku poklesu hladiny ATP (Nishiyama et al., 2010).

Buněčná smrt Purkyňových buněk je stále neuzavřeným tématem. V současné době z výzkumů vyplývá, že smrt těchto cerebelárních neuronů nebude vedena přímočaře jedním typem buněčné smrti, spíše se bude jednat o souhru mnoha faktorů a drah vedoucích k této degeneraci.

Zajímavé jsou také možnosti, kterými se vědci pokoušeli degeneraci v závislosti na Lc mutaci v Purkyňových buňkách zastavit, nebo alespoň zmínit. I tento způsob nám může o významu mutace mnoho napovědět. Testovaný způsob prodloužení životnosti Purkyňových buněk byl založen na hypotéze, která předpokládá, že degenerace Purkyňových buněk v Lc mutantech je způsobená ustáleným depolarizujícím proudem vyvolávajícím excitotoxickou smrt. Zanjani et al. (2009) ve svém pokusu aplikovali na buněčnou kulturu od 1. do 14. dne *in vitro* 1-naftylacetyl spermin (NASP), což je syntetický analog pavoučího toxinu Joro. NASP patří mezi několik málo antagonistů glutamátových kanálů, které snižují stálý proud vtékajících iontů (Kohda et al., 2000) a působí jako blokátor otevřených typů iontových kanálů AMPA a kainátových receptorů (Koike et al., 1997). Zanjani a spol. potvrdili, že k silné depolarizaci membrány Purkyňových buněk dochází i v řezech kultivovaných buněk *in vitro* a změřili, že vtékající proud je u mutovaných Purkyňových buněk téměř 5krát větší v porovnání se zdravými kontrolami. V závěru své studie uvádějí, že aplikací NASP stouplо množství přeživších Lc mutovaných Purkyňových buněk na hladinu srovnatelnou

s počtem zdravých kontrol. NASP není schopen zcela blokovat dovnitř buňky vtékající proud skrze GluR δ 2^{Lc} (Kohda et al., 2000). Přesto možnost prodloužit přežití Purkyňových buněk a podpořit diferenciaci dendritů potvrzuje hypotézu autorů, že abnormality na dendritech Purkyňových buněk a jejich předčasná smrt, je spojena s mutací GluR δ 2^{Lc} a jí způsobeným průnikem iontového proudu do intracelulárního prostoru buňky.

5. Behaviorální vlastnosti Lurcher mutantů

Lc mutace přináší postiženým jedincům snížení výkonu v mnoha ohledech. Vliv na výsledky v různých typech behaviorálních testů má pohlaví, věk i kmen, ze kterého myši pocházejí, a měly by být v každém výzkumu zohledňovány. Mutace postihující mozeček nemá vliv pouze na motorické schopnosti, ale ovlivňuje i vyšší mozkové funkce jako jsou kognice a emoce. V testech bývají nejčastěji zkoumány motorické deficity, prostorová orientace, schopnost učení a úzkostné stavy. Všechny tyto schopnosti jsou často narušeny při různých chorobách nervové soustavy, ať už psychiatrických patologiích typu schizofrenie nebo úrazech mozku či zhoubných nádorech.

5.1 Motorické výkony a učení

Jak uvádí téměř každá studie zabývající se Lc mutací, postižení jedinci mají, stejně jako ostatní typy cerebelárních mutantů, oproti zdravým jedincům, sníženou tělesnou hmotnost (Thullier et al., 1997; Tůma et al., 2015). Fyzický vývoj Lc myši je zpožděný a většina postnatálních reflexů, například vyrovnávání osy těla (z angl. righting reflex) se vytváří později (Thullier et al., 1997). Svaly Lc mutantů jsou zpočátku vývoje slabší. K tomuto zjištění dospěl tým vědců Hilber & Caston (2001) metodou při které byla měřena doba, po kterou je myš schopna se udržet se na provázku zavěšená za přední packy. Ve statistice byl zohledněn i faktor, za kolik končetin se v průběhu pokusu držela. Výkon zdravých jedinců byl nejlepší u mladých zvířat ve 3. měsíci života. Doba udržení se na provázku klesala mezi 3. a 9. měsícem a mezi 9. a 15. měsícem života. Lc mutanti signifikantně zaostávali za výkonem zdravých myši ve věku 9. a 15. měsíců. Od 15. měsíce byli však srovnatelně zdatní se zdravými jedinci.

Dalším obvyklým testem používaným pro měření pohybové koordinace myši je rotarod. Rotarod je horizontálně umístěná tyč s podélnými vroubkami pro lepší udržení, která se točí definovanou rychlostí. Myš je na tyč umístěna kolmo a hlavou proti směru otáčení. V tomto testu se také měří čas, po který je myš schopna se udržet na rotarodu a zaznamenává se, jakou techniku k udržení rovnováhy používá – asynchronní, synchronní chůzi, nebo pevné držení. V tomto testu mají Lc mutanti opět velmi slabé výsledky. Na rotarodu byly všechny zdravé kontroly schopny v jakémkoliv věku zlepšovat své výsledky učním. Tato schopnost učení byla u Lc jedinců silně potlačena, byli schopni se učit jen slabě a pouze do 9 měsíců života, poté zcela ztratili schopnost učení (Hilber & Caston, 2001). U Lc jedinců nebyl na druhou stranu zaznamenán ani pokles v kvalitě

výkonu s věkem, což je ale nejspíše způsobeno tak nízkým výkonem v mládí, že se již nemohl dále zhoršovat (Hilber & Caston, 2001). Zajímavostí je, že při prvních 3 testech na rotarodu používají Lc mutanti zcela jinou strategii k udržení rovnováhy. Zatímco zdraví jedinci jsou schopni se rychle adaptovat a udržovat rovnováhu pomocí chůze či běhu, Lc myši se jen za pasivního otáčení pevně tisknou k rotarodu (Hilber & Caston, 2001). V jiných studiích uvádějí někteří autoři zlepšení výkonu Lc jedinců motorickým učením. Cendelín et al. (2008) například zaznamenali zlepšení výkonu v testu rotarodu. Z pohledu autorů k tomu mohlo dojít buď zachovanou slabou schopností učit se, nebo prostým zlepšením fyzické kondice, díky předcházejícím pokusům s plaváním. Toto zlepšení bylo pozorováno ale pouze při jednom testu a jen u mladých jedinců. Společně s rotarodem testoval Cendelín et al. fyzickou sílu na horizontální tyči a motorické schopnosti na nakloněném žebříčku. Ani v jedné disciplíně nebyli Lc myši schopny svůj výkon zlepšit učením se praxí. Je třeba zmínit, že tyto dva testy byly opakovány s dlouhými intervaly (4 týdny). Určité zlepšení výkonu podobné zdravým jedincům popsal Lalonde (Lalonde, 1994) pomocí svých testů s nakloněnými rovinami. V prvním testu byly myši umístěny do středu nakloněné desky podložky hlavou dolů. V pokusu byla měřena dvě kritéria, než se myš otočila hlavou nahoru a než dosáhla vrcholu desky. Ve druhém testování byla zvířata opět postavena na desku, ta se navíc nakláněla ze strany na stranu, nejdříve pod úhlem 30° a potom 60°. V tomto testu byl měřen čas, jak dlouho se myš udržela na pohybující se desce. Lc mutanti měli zhoršené výsledky v testu pohyblivé desky, ale ve srovnání s kontrolami dosahovali srovnatelné míry učení.

S mírou poznání, kterým v dnešní době disponujeme, se dá říci, že Lc mutanti mají výrazně sníženou motorickou schopnost učení. O celkově zhoršeném motorickém výkonu ve srovnání se zdravými jedinci referuje i mnoho dalších studií (Le Marec et al., 1997; Thullier et al., 1997; Hilber et al., 1998; Porrás-García et al., 2005).

Ve své studii Cendelín et al. (2010) měřili pomocí systému CatWalk parametry chůze a pomocí rotarodu motoriku u Lc jedinců. Cílem práce bylo zjistit, jakým způsobem se liší chůze Lc myší od zdravých jedinců. CatWalk systém má 85cm dlouhou a 8,5cm širokou uličku, ve které se mohou myši volně pohybovat. Přístroj měří rychlost chůze, pravidelnost kroku, úhel packy vůči ose těla a směru pohybu, délku doby kontaktu packy s podložkou, délku kroku atd. Vědci touto metodou zjistili jasné rozdíly mezi hodnotami chůze myší s cerebelární mutací a mezi zdravými kontrolami. Je zajímavostí, že veškeré rozdíly mezi chůzí byly smazány, pokud se přihlídně k rychlosti chůze, přestože chůze Lc jedince od zdravého je rozpoznatelná pouhým okem po chvíli pozorování. Takto se i v laboratorních chovech běžně mutantní myši od svých zdravých sourozenců rozpoznávají. Nutno podotknout, že systém analyzuje pouze záznamy s přímou chůzí, bez zastávek a váhání na místě. Tímto jsou z mého pohledu rovnou filtrovány typické motorické projevy cerebelárních ataxií, které ovlivňují charakteristickou chůzi Lc myší. Mutací není postihnuta koordinace končetin a přímým projevem jsou pouze veškeré třesy, ataxie, vrávorání atp. V testu rotarodu byly v této studii opět zaznamenány zhoršené výsledky Lc mutantů, což je protichůdný

výsledek k hodnotám zjištěným ze systému CatWalk. Ze závěru práce vyplývá, že postoj a chůze Lc myši se od zdravých jedinců liší pouze v závislosti na rychlosti pohybu.

5.2 Explorativní chování a prostorová orientace

V testu otevřené arény vykazují Lc myši více rozptýlenou aktivitu po celé ploše prostoru, než zdravé kontroly (Tůma et al., 2015). Tento test slouží k behaviorálnímu testování průzkumného chování. Myš je umístěna do středu otevřeného boxu a nechá se nerušeně prozkoumávat okolí. Veškerý pohyb je zaznamenáván a vyhodnocují se data jako je lokomoční aktivita, ušlá vzdálenost, průměrná rychlost pohybu atp. V dalším z behaviorálních testů je použita děrovaná deska. Myš umístěná na desce se snaží opět prozkoumávat okolí a s ním i jednotlivé díry. Při pokusu je zaznamenána ušlá vzdálenost a počet děr navštívených za minutu. Přestože Lc jedinci vykazují vyšší spontánní aktivitu, při průzkumu děrované desky prozkoumají menší počet děr, než zdraví jedinci. Podle Castona et al. (1998) je tento fenomén způsoben nižší motivací k průzkumu nového prostředí, ale také nedostatky v prostorové orientaci. Autor z těchto experimentů vyvozuje, že kromě průzkumného chování a kognice, se mozeček podílí i na motivačních procesech chování. Za zmínku stojí fakt, že v tomto výzkumu použil pro srovnání s Lc mutanty i myši s odstraněným mozečkem. Lc myši i kontrolní jedinci bez mozečku měli silně sníženou pohybovou aktivitu i počet prozkoumaných děr. Srovnáním výkonu Lc jedinců se zachovalým mozečkem a Lc myši s odebraným mozečkem dospěli výzkumníci k závěru, že ke standardnímu explorativnímu chování je nezbytný mozeček jako celek, jak jeho kortikální oblasti, tak i hluboká jádra. Lc mutanti s mozečkem měli vyšší průzkumnou činnost.

Často užívaným testem prostorových schopností bývá Morrisovo bludiště (Morris, 1984), kde se myš snaží dostat z vody nalezením viditelného nebo skrytého ostrůvku. I v tomto testu plavecké zdatnosti a prostorové orientace dosahují Lc jedinci horších výsledků a to i přesto, že rychlost plavání není, na rozdíl od chůze, nižší (Cendelín et al., 2008). V Morrisově bludišti jsou Lc mutanti schopni alespoň částečného zlepšení v nalezení skrytého ostrůvku. Lc myši mají problém ve správném směřování k viditelnému cíli v Morrisově bludišti z čehož vědci usuzují, kromě poškození orientace, také sníženou kvalitu zrakově orientované motorické koordinace (Lalonde et al., 1988; Porrás-García et al., 2005).

Ve své studii Hilber et al. (1998) zkoumal schopnost prostorového učení a paměti v závislosti na prostředí u Lc myši a zdravých jedinců před a po odstranění mozečku. Hilber ke svému pokusu používal úkoly zkoumající prostorové učení odvozené od Morrisova bludiště. Počet Lc myši schopných učení byl menší, než u zdravých jedinců, nikoliv však signifikantně. Navzdory pohybovým nedostatkům a zhoršené prostorové orientaci se většina Lc myši naučila splnit úkol stejně dobře, jako kontrolní jedinci. Delší dobu nutnou k opuštění bludiště Lc mutanty dávají autoři do souvislosti se způsobem orientace v prostoru. Jedním z názorů je, že zdravé myši jsou schopny vytvořit si kognitivní mapu, zatímco Lc myši, kvůli cerebelárnímu deficitu, řeší svou prostorovou

orientaci spíše pomocí asociací s prostředím, zapamatováním si umístění okolních věcí a místa ostrůvku. Lc myši s odebraným mozečkem před procesem učení byly schopny se i poté naučit opouštět labyrint stejně úspěšně jako zdravé myši a Lc myši bez odebraného mozečku. Z tohoto výsledku autoři vyvozují, že hluboká jádra mozečku nejsou nutná k tomuto typu učení. Kontrolní myši, kterým byl před testem odebrán mozeček, byly schopny se naučit cestu k opuštění labyrintu a byly schopny si pamatovat umístění ostrůvku i o týden později, i když ne s takovou přesností, jako zdravé myši s kompletním mozkiem. Když byl mozeček zdravým jedincům odebrán až po procesu učení, zcela zapoměly díky zákroku, lokalizaci únikového ostrůvku. Těmito výsledky autoři studie podložili názor, že mozeček není nezbytně nutný k plnění úkolů spojených s prostorovou orientací. Pokud však proces učení proběhl před odebráním mozečku, byla tato struktura nutná k udržení paměťové stopy (engramu). Získané poznatky odebráním mozečku u Lc myší byly od zdravých jedinců rozdílné. Odebrání cerebella Lc myším před učením sice nepostihlo schopnost učení, ale zcela znemožnilo udržení paměti. Byl-li mozeček odebrán až po učení, schopnost zapamatování si trasy byla přerušena, stejně jako u zdravých jedinců. Přihlédneme-li k tomu, že Lc myši mají zdegenerovaný téměř celý cerebelární kortex, odebrání mozečku se u nich dá srovnat s odebráním hlubokých cerebelárních jader. Zdá se, že hluboká jádra mají odlišnou úlohu u Lc jedinců a u zdravých myší. U zdravých jedinců nepoškozený mozeček není potřebný k plnění orientačních testů a udržení paměti. To však neplatí u Lc mutantů, u kterých se naopak hluboká jádra mozečku ukázala být nezbytná k udržení paměti. U zdravých jedinců má mozeček pouze tedy přechodnou funkci ve zpracování paměťové stopy a posílá engram do dalších částí nervové soustavy. Odstraněním mozečku dochází k přerušení spojení mezi mozečkem a ostatními částmi nervového systému podílejících se na paměti. Pro takovéto spojení fungující u zdravých jedinců, nikoliv však u Lc myší, je nezbytný nepoškozený kortex mozečku.

5.3 Chování Lurcher mutantů ve stresové zátěži

Lc myši vykazovaly oproti jiným jedincům, s odlišnou neurodegenerací mozečku, rozdílné chování v testu nuceného plavání, při kterém nepoužívaly pasivní nadnášení na vodní hladině ani po delší době testování. Lc myši byly mnohem více aktivní, nežli druhé zkoumané myši s jiným typem cerebelární mutace, u kterých se v průběhu testování objevovaly známky pasivity a sklony k depresivnímu chování. Závěr studie porovnávající výkony obou skupin mutantů konstatuje lepší výkony právě u Lc jedinců (Tůma et al., 2015).

Na závěr kapitoly bych rád zmínil sníženou kvalitu mateřského chování a časté případy infanticidy u Lc samic. Celková rozmnožovací schopnost je u mutantních samic snížena. Předporodní reprodukční schopnosti, chování a schopnost početí nejsou od zdravých jedinců odlišné. Stejně tak je shodná doba březosti a ani rychlost porodu není mutací ovlivněna. První rozdíl oproti zdravým samicím nastává v počtu narozených mláďat, který je u Lc samic menší. Přežití mláďat a zvýšená infanticida především u myši majících první vrh ukazuje zhoršené mateřské schopnosti. Toto chování je nejspíše způsobeno rozdílným zvládnutím stresu a odlišnými reakcemi i na mírné zvýšení stresových hormonů. Poškození Purkyňových buněk, centrálního inhibičního systému, a tím odlišné zpracovávání informací může vést k zanedbávání mláďat, zabíjení či pojídání vlastních mláďat a dalšímu nestandardnímu mateřskému chování. Tato hypotéza je podpořena studií (Poley, 1974) zabývající se zvýšením případů infanticidy a mateřského kanibalismu u hlodavců při zvýšeném stresu způsobeném prostředím. Závěrem studie píše autor o vlivu Lc mutace na anatomické a reprodukční poruchy, který je menší, než u jiných cerebelárních mutantů. Snížený počet zdárně prospívajících potomků je zapříčiněn disinhibicí a rozdílnou reakcí na stresové podmínky způsobených degenerací Purkyňových buněk uvnitř mozečku (Tůma et al., 2013).

6. Obdobné cerebelární degenerace

Mutací v myších genech způsobujících neurodegeneraci mozečku, ataxii a jiná postižení je celá řada. Každý z typů má jiné fenotypové projevy, a hodí se tak k jiným typům pokusů. Výčet těchto mutací zde uvedených je jen přehledem nejznámějších a nejpoužívanějších z nich. Kromě přirozených mutací se v dnešní době používají myši transgenní s upravenými geny konkrétních studovaných vlastností. Spontánní mutace vznikají stále, jako poslední uvádím mutaci ts3 popsanou teprve před dvěma roky (Miyoshi et al., 2014).

Hotfoot

Myši s mutací Hotfoot (*Grid2^{ho}*) mají postižený stejný gen, který je degenerován u Lc myši (Lalouette et al, 1998). Hotfoot mutace může být zapříčiněna několika alelami (Lalouette et al., 2001). Rozdíl mezi mutacemi Lc a Hotfoot spočívá v tom, že Hotfoot mutace zapříčiňuje ztrátu funkce způsobenou trvalým zachycením GluRδ2 v endoplazmatickém retikulu. V porovnání s ním,

v mutaci *Grid2^{Lc}* dochází ke změně funkce iontového kanálu GluR δ 2 receptoru (Matsuda & Yuzaki, 2002). Dalším z postižení těchto myší je nekróza části granulárních buněk a narušení inervace Purkyňových buněk (Guastavino et al., 1990).

Purkinje cell degeneration mice – PCD

Tento typ mutace se nachází na 13. chromozomu a má autosomálně recesivní charakter. Mutace je způsobena několika mutantními alelami v genu pro cytosolický ATP/GTP vazebný protein (Mullen et al., 1976; Fernández-González et al., 2002). Tento protein se u zdravých jedinců vyskytuje v Purkyňových buňkách, olfaktorických bulbech a v retině. Všechna tato místa jsou zasažena postupnou degenerací. Primární fenotyp se projevuje zánikem Purkyňových buněk začínajícím mezi 17. – 24. dnem postnatálního života (Mullen et al., 1976; Landis & Mullen, 1978). Sekundární ztráta 90 % granulárních buněk je způsobena zánikem synaptického spojení s Purkyňovými buňkami (Triarhou, 2010; Ghetti & Triarhou, 1987). Ve věku P300 je počet neuronů dolní olivy zredukován o 49 % (Ghetti & Triarhou, 1987). Dále v průběhu postnatálního života dochází ke ztrátám fotoreceptorů v retině (Mullen & Lavail, 1975). Degenerací Purkyňových buněk je zahájena aktivace astrocytů, mikroglíí a apoptotická smrt cerebelárních oligodendrocytů (Baltanás et al., 2013; Kyuhou et al., 2006).

PCD mutanti mají menší tělesnou váhu a to dokonce menší, než Lc mutanti (Tůma et al., 2015). Samci jsou sterilní kvůli nedostatečné pohyblivosti, malé koncentraci a abnormálnímu tvaru spermií. Plodnost samic je snížena. Neurologické symptomy jsou shodné s Lc postižením, ataxie se začíná projevovat okolo 21. dne postnatálního života (Mullen et al., 1976). PCD myši vykazují nedostatky v testech prostorové orientace (Goodlett et al., 1992) a mají problém se zlepšením svého výkonu tréninkem (Le Marec & Lalonde, 1997; Le Marec & Lalonde, 1998).

Staggerer

Název této myší mutace vypovídá o hlavní charakteristice postižených jedinců z angl. stagger - potácet se, motat se. Staggerer mutace je lokalizována na 9. chromozomu v genu *Rora^{sg}* a patří mezi autosomálně recesivní typ (Hamilton et al., 1996). Staggerer mutace je v mnohém Lc mutací podobná. Myši mají charakteristickou potácivou chůzi, trpí hypotonií a v cerebelárním kortexu mají málo granulárních buněk. Jedinci s mutací Staggerer, stejně jako jiní mutanti s degenerací mozečku mají menší tělesný vzrůst v porovnání se zdravými kusy. Zajímavostí je fakt, že Staggerer přes svůj menší tělesný vzrůst přijímají více potravy, než zdraví jedinci (Guastavino et al., 1991). Tento jev se vysvětluje změnou v ukládání hnědého tuku a dalšími metabolickými změnami. V mozečku mutantů dochází k degeneraci Purkyňových buněk, na níž navazuje ztráta až 60 % neuronů dolní olivy v důsledku ztráty spojení s cílovou buňkou. Homozygoti následkem silné cerebelární degenerace mají velice špatné výkony v motorických testech a nejsou schopni se

pravidelným tréninkem zlepšit (Lalonde, 1987a; Lalonde, 1987b). Heterozygoti mají v roce života postiženo degenerací shodně 35 % Purkyňových a granulárních buněk a 40 % neuronů dolní olivy (Zanjani et al., 1992).

Nervous

Mutace Nervous je autosomálně recesivní typ s výskytem na 8. chromosomu. Mutace vykazuje neúplnou penetranci a předpokládá se Nervous lokus na 5. chromosomu (De Jager et al., 1998; Campbell & Hess, 1996). Okolo 50. dne života zdegeneruje 80 % Purkyňových buněk ve vermis, 88 % podél předělu mezi vermis a hemisférami a 97 % Purkyňových buněk zdegeneruje v hemisférách. Od 15. dne života lze pozorovat nezvykle zakulacené mitochondrie v Purkyňových buňkách, k čemuž se časem přidává zřetelná degenerace hrubého endoplasmatického retikula a Golgiho komplexu. Nezasažených 10 % Purkyňových buněk obsahuje mitochondrie s normálním tvarem (Landis, 1973).

Nervous myši trpí, stejně jako ostatní mutanti s degenerativním onemocněním mozečku, ataxií, menší tělesnou velikostí, ale také hyperaktivitou. Mají snížený výkon oproti kontrolám v typických testech jako je Morisovo vodní bludiště, rotarod atd. (Lalonde & Strazielle, 2003). Kromě cerebelárního poškození mají Nervous mutanti poškozenou retinu. Fotoreceptory nejvíce zdegenerují mezi 13. – 19. postnatálním dnem, poté se degenerace zpomaluje. Po 17 měsících života postiženým myším zůstává pouze několik fotoreceptorů (LaVail et al., 1993).

Weaver

Weaver myši trpí semi-dominantní mutací lokalizovanou na 2. autosomálním chromosomu. Mutace kóduje missense chybu v genu pro G-protein, který je svou funkcí spojený s draslíkovým kanálem (Patil et al., 1995). Na rozdíl od ostatních zde popsanych typů mutací jsou v tomto případě Purkyňovy buňky relativně ušetřeny, zatímco poškozené jsou především granulární buňky trpící apoptickou degenerací (Migheli et al., 1995; Wullner et al., 1995). Kromě granulárních buněk mají Weaver myši z 23-25 % zredukovaný počet neuronů v jádře mozečku (Maricich et al., 1997). Homozygotům zůstává 72 % a heterozygotům dokonce 86 % standardního počtu Purkyňových buněk přítomných v mozečku zdravého jedince (Blatt & Eisenman, 1985). Myši Weaver mají problémy s prostorovou orientací v Morisově vodním bludišti a mají snížené explorativní chování. Mají též zhoršené motorické výkony při plnění úkolů z důvodů ataxie, hypertonie a třesu. Po odstranění vermis z mozečku mutantních jedinců vymizí svalový třes a dochází ke zlepšení motoriky (Grüsser-Cornehls et al., 1999).

ts3 - *Trichinella spiralis* resistance 3

Tuto novou mutaci představil japonský tým vědců Miyoshi et al. (2014). V mnoha ohledech je podobná Lc mutaci, přesto se od ní odlišuje, především horší mírou postižení. Mutace ts3 je autosomálně recesivní s pevnou fenotypovou expresí a je způsobena rozsáhlou delecí v kódujícím regionu genu *Grid2*. Znaky mutace jsou cerebelární atrofie, morfologické abnormality Purkyňových buněk, atypické synapse mezi Purkyňovými buňkami a paralelními vlákny a zredukovaný počet granulárních buněk. U těchto znaků byla pozorována mírná variace mezi jednotlivými kusy. První projevy mutace začínají být zřejmé okolo tří týdnů života. Hlavním symptomem je silná ataxie přecházející postupně až v ochrnutí předních končetin. Autoři uvádějí, že na základě zkušeností s jinými mutanty trpícími ataxií (patrně tedy mutací Lc) provedli imunohistologickou analýzu genů pro GluRδ2 a jeho ligand cerebellin1. Z naměřených hodnot zjistili, že k expresi těchto dvou genů nedochází buď vůbec, nebo jen v nedetekovatelném množství. U této nově objevené mutace bude potřeba objasnit ještě mnoho věcí, autoři popisují nekorelující hodnoty mezi cerebelární atrofií a behaviorálními abnormalitami a mnohé další.

7. Možnosti výzkumu

7.1 Rozdíly vlastností Lurcher jedinců v závislosti na kmenu původu

Lc mutace postihuje jedince několika různých myších kmenů. Fenotypové vlastnosti kmene mohou ovlivňovat či měnit následky Lc mutace. V rámci designování pokusu je proto důležité vybrat, kromě přílehlavé mutace, i správný kmen nenarušující zkoumané hodnoty, popřípadě vhodně je doplňující. Nejčastěji používanými kmeny s Lc mutací jsou B6CBA a C3H. První z důležitých poznatků je, že některé C3H myši trpí retinální degenerací, a proto nejsou vhodné na určité typy behaviorálních testů vyžadujících zřetelnou orientaci (Cendelín et al., 2014). Cendelín et al. ve své práci porovnává výkonnost Lc mutantů od obou těchto kmenů a zdravých jedinců. Z výsledků porovnávacích schopnosti v Morisově vodním labyrintu vyplývá, že rozdíly v kvalitě podaných výkonů jsou závislé na typu kmene, nikoliv na Lc postižení. Nižší výkony C3H kmene byly ve srovnání s B6CBA horší, jak u zdravých jedinců, tak i u myši s *Grid^{Lc}*. Tímto způsobem specifické vlastnosti kmene mění projevy Lc mutace. Lc mutace je svou patogenezi nadřazena kmenovým specifikům a není nijak ovlivňována charakteristickými vlastnostmi kmenového původu. Přesto kombinace Lc mutace s C3H kmenem zabraňovala těmto jedincům procesu učení v testu se skrytým ostrůvkem v Morisově bludišti. Výsledky svého zkoumání uzavírá Cendelín et al. konstatováním, že kmen B6CBA je vhodnější pro výzkum behaviorálních aspektů cerebelárních degenerací z hlediska toho, že B6CBA nekombinuje specifické vlastnosti kmene s abnormalitami Lc mutace.

7.2 Lurcher mutace v souvislosti s lidskými chorobami

Lc myši s přesně vymezenou mutací v části mozečku – v Purkyňových buňkách a zároveň s netknutými hlubokými jádry, jsou vhodným modelem pro výzkum funkcí mozečku. Zajímavou studii provedli v roce 1998 Schmahmann a Shermann na vzorku dvaceti pacientů majících léze zasahující posteriorní laloky mozečku a vermis. Pacienti trpěli poruchami velmi podobnými těm, které se projevují u Lc myši, např. poruchou exekutivních funkcí, paměti atd. (Schmahmann & Sherman, 1998). Tyto klinické projevy se souhrnně označují jako Cerebelární kognitivně afektivní syndrom. Díky výzkumu mozečku u Lc mutantů můžeme dnes více rozumět zejména těmto typům poruch.

V poslední dekádě se také objevují významné souvislosti mezi narušenou funkcí mozečku a mnohými psychiatrickými poruchami. Některé projevy široké škály nemocí, jako jsou například autismus, schizofrenie, ADHD, dyslexie a mnohé jiné, jsou právě díky výzkumům Lc myši přičítány špatné funkci mozečku a Purkyňových buněk. Autistické poruchy mohou být způsobené cerebelární degenerací ve formě ztráty Purkyňových buněk, která může vést k dysfunkci prefrontálního kortexu (PFC - z angl. prefrontal cortex) (rev. Palmen et al., 2004). Tímto tématem se zabývá studie (Mittleman et al., 2008) ve které se vědci zaměřili na souvislosti mezi funkcí mozečku a výlevem dopaminu v PFC. Výzkum byl prováděn na Lc myších, které díky poškozenému cerebelárnímu kortexu a zachovalým hlubokým jádrům mozečku byly vhodným modelem. Při pokusu *in vivo* bylo pomocí elektrické stimulace Purkyňových buněk nebo *dentatus nucleus* zjišťováno, zda bude docházet k výlevu dopaminu v PFC. U kontrolních zvířat došlo pomocí elektrické stimulace vrstvy Purkyňových buněk k signifikantnímu vybuzení výlevu dopaminu v PFC. Stejnou stimulací hlubokých mozečkových jader *dentatus nucleus* u zdravých jedinců došlo opět k výlevu dopaminu v PFC o srovnatelné velikosti, pouze s kratší dobou trvání. Při pokusu na Lc myších byly naměřené výsledky jiné. Přestože elektrickou stimulací Purkyňových buněk Lc mutantů nebyl navozen dopaminový výlev, stimulací jader *dentatus nucleus* u Lc mutantů došlo k signifikantnímu zvýšení výlevu dopaminu. Doba výlevu byla ve srovnání se zdravými jedinci delší. Těmito výsledky autoři studie prokazují závislost uvolňování dopaminu v PFC na funkčnosti výstupu Purkyňových buněk. Zároveň tak bylo prokázáno, že *dentatus nucleus* u Lc mutantů zůstává alespoň z části funkční.

Studie (Martin et al., 2010) se zaměřila na souvislosti mezi aktivitou, explorativním a opakujícím se chováním a množstvím degenerovaných buněk u Lc mutantů. Právě repetitivní chování a hyperaktivita bývá častým znakem vývojových poruch včetně autismu, na který byl tento výzkum zvláště zaměřen. Jeden z opakujících se poznatků ve studiích *post mortem* získaných mozků autistických pacientů je silná redukce počtu Purkyňových buněk (rev. Palmen et al., 2004). K pokusům s aktivitou, explorativním a repetitivním chováním byla použita chimérická zvířata vytvořená spojením Lc embrya a embrya ze zdravého jedince. Tyto chimérické myši měly počet degenerovaných Purkyňových buněk v rozpětí od 0 % až po 100 %. K získání celistvého obrazu o funkci mozečku byli také testováni zdraví jedinci a Lc mutanti. Změřením aktivity pomocí testu

pohybu v otevřené aréně byla zjištěna negativní korelace mezi počtem zachovalých Purkyňových buněk a aktivitou myši.

Pomocí testu děrované desky byla zkoumána explorativní činnost měřením počtu pročmukaných děr. Také v tomto testu se objevila negativní korelace mezi počtem Purkyňových buněk a množstvím prozkoumaných děr v případě zdravých myši a chimérických jedinců. To může být ovšem způsobeno i celkově zvýšenou aktivitou chimerických myši se sníženým počtem Purkyňových buněk. Lc mutanti měli v tomto testu nejmenší výkonost. To odpovídá i výsledkům starších studií (Caston et al., 1998).

Třetím testem sledujícím repetitivní chování bylo spojení páčkového dávkovače s odměnou. Za mačkání páčky dostávaly myši malou dávku sladkého kondenzovaného mléka. Počet zmáčknutí nutný pro vydání odměny každý den aritmeticky narůstal. Během vydávání odměny z dávkovače zhaslo světlo v kleci a rozsvítilo se uvnitř zásobníku s mlékem. Po tuto dobu bylo dále snímáno zmáčknutí páčky, ale nebylo počítáno do počtu potřebného k vydání mléka. Test skončil ve chvíli, kdy pokusná myš nezmáčkla dávkovač po dobu 5 minut.

Chimerické myši s menším počtem Purkyňových buněk mačkaly páčku signifikantně více, než zdravé kontroly. Menší frekvence zmáčknutí páčky pozorovaná u Lc myši může být zapříčiněna jejich nedostatkem v motorice.

Stejně jako předešlé dva pokusy, tak i zvýšené mačkání páčkového dávkovače bylo negativně spjato se zachovalým počtem Purkyňových buněk. Z těchto výsledků vyplívá vliv poruch mozečku na nárůst aktivity a repetitivního chování. Vyšší počet prohledaných děr může být přičítán zvýšené motivaci k průzkumu, stejně tak ale opakované prohledávání může být bráno jako repetitivní chování shodné s mačkáním dávkovací páčky (Martin et al., 2010).

Studiem abnormalit struktury mozečku, cerebelárních neuronů a vlivu těchto postižení na chování spojené s autismem a jinými poruchami se zabývají mnohé současné studie. Mnoho z nich využívá k výzkumu těchto problémů právě Lc myši. Tento myší model je tedy pro lidské zdraví velkým přínosem (Dickson et al., 2016; Cairns et al., 2016).

8. Závěr

Ve své práci jsem shrnul poznatky o Lc mutaci, které byly učiněny za 56 let výzkumu od prvního popisu takto postižených myši. Přínos Lc mutantů k poznání mnoha funkcí mozečku je nepopíratelný. Zaměření výzkumů se z počátku soustředilo především na kvantitativní stránku degenerace, počty úmrtí jednotlivých typů neuronů a vývojový průběh těchto dějů. Nejsilnější proces neurodegenerace probíhá během prvních tří týdnů postnatálního života. Do tří měsíců od narození ztratí Lc myši veškeré Purkyňovy buňky. Granulární buňky jsou zredukovány o 90 % a z původního počtu oliverních neuronů se zachová pouze 25 %. Zaměření výzkumných prací se znatelně změnilo po důležitém objevu charakteristiky mutace v GluR δ 2 a jejím vlivu na vlastnosti receptoru. Záměnou dvou aminokyselin ve vysoce konzervované oblasti 3. transmembránové domény se GluR δ 2 mění ve stále otevřený kanál propustný pro kationty, především Na⁺, čímž je způsobena konstantní depolarizace membrány Purkyňových buněk. Postupně byly shromažďovány důkazy o probíhající apoptóze, autofagii či nekroze v umírajících Purkyňových buňkách. Skutečný důvod buněčné smrti bude nejspíše kombinací těchto smrtelných drah, ale tato otázka zůstává dodnes nezodpovězena.

Hledání vazebného ligandu pro GluR δ 2, zaměstnávající mnoho výzkumných týmů, bylo v nedávné době úspěšně ukončeno objevem proteinu Cerebelin1. Tato molekula plní v mozečku mnoho důležitých funkcí, převážně v oblasti synapsí Purkyňových buněk a paralelních vláken.

Poznatky o vlivu mutace na paměť, fyzický výkon zvířat a mnohé další behaviorální aspekty nám dávají možnost poznávat souvislosti mezi neurodegenerací jednotlivých částí mozečku a poruchami s nimi souvisejícími.

Desítky let získávání co nejpřesnějších informací o mutaci, jejích molekulárních znacích a behaviorálních projevech v současnosti sklízí ovoce. Lc myši se stávají nedílnou součástí výzkumů lidských chorob a poruch souvisejících se špatnou funkcí mozečku. Budoucí výzkumy uskutečněné s Lc mutací budou dále objasňovat příčiny lidských nemocí a možnosti jejich léčby. Stejně tak bude jistě v dohledné době objasněna otázka procesu degenerace Purkyňových buněk.

9. Použitá literatura

- Apps, R. & Garwicz, M., 2005. Anatomical and physiological foundations of cerebellar information processing. *Nature reviews. Neuroscience*, 6(4), pp.297–311.
- Araki, K. et al., 1993. Selective expression of the glutamate receptor channel delta 2 subunit in cerebellar Purkinje cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 197(3), pp.1267–76.
- Baltanás, F.C. et al., 2013. Differential glial activation during the degeneration of Purkinje cells and mitral cells in the PCD mutant mice. *Glia*, 61(2), pp.254–272.
- Blatt, G.J. & Eisenman, L.M., 1985. A qualitative and quantitative light microscopic study of the inferior olivary complex in the adult staggerer mutant mouse. *Journal of neurogenetics*, 2(1), pp.51–66..
- Burnashev, N. et al., 1995. Fractional calcium currents through recombinant GluR channels of the NMDA, AMPA and kainate receptor subtypes. *The Journal of physiology*, 485 (Pt 2, pp.403–18.
- Caddy, T.W.K. & Biscoe, T.J., 1978. Structural and Quantitative Studies on the Normal C3H and Lurcher Mutant Mouse. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London.*, 5(5), pp.167 – 198.
- Cairns, J. et al., 2016. Abnormalities in the Structure and Function of Cerebellar Neurons and Neuroglia in the Lc/+ Chimeric Mouse Model of Variable Developmental Purkinje Cell Loss. *The Cerebellum*.
- Campbell, D.B. & Hess, E.J., 1996. Chromosomal localization of the neurological mouse mutations tottering (tg), Purkinje cell degeneration (pcd), and nervous (nr). *Molecular Brain Research*, 37(1-2), pp.79–84.
- Caston, J. et al., 1998. Role of the cerebellum in exploration behavior. *Brain Research*, 808(2), pp.232–237.
- Cendelín, J., Korelusová, I. & Vožeh, F., 2008. The effect of repeated rotarod training on motor skills and spatial learning ability in Lurcher mutant mice. *Behavioural Brain Research*, 189(1), pp.65–74.
- Cendelín, J. et al., 2014. The effect of genetic background on behavioral manifestation of Grid2Lc mutation. *Behavioural Brain Research*, 271, pp.218–227.
- Cendelín, J., Voller, J. & Vožeh, F., 2010. Ataxic gait analysis in a mouse model of the olivocerebellar degeneration. *Behavioural Brain Research*, 210(1), pp.8–15.
- * Cerminara, N.L. et al., 2015. Redefining the cerebellar cortex as an assembly of non-uniform Purkinje cell microcircuits. *Nature Reviews Neuroscience*, 16(2), pp.79–93.
- Dickson, P.E. et al., 2016. Cerebellar contribution to higher and lower order rule learning and cognitive flexibility in mice. *Neuroscience*, pp.1–11.

- Dumesnil-Bousez, N. & Sotelo, C., 1992. Early development of the Lurcher cerebellum: Purkinje cell alterations and impairment of synaptogenesis. *Journal of Neurocytology*, 21(7), pp.506–529.
- Eccles, J.C., Llinas, R. & Sasaki, A.K., 1966. The excitatory synaptic action of climbing fibres on the Purkinje cells of the cerebellum. *The Journal of physiology*, 182(2), pp.268–296.
- Fernández-González, A. et al., 2002. Purkinje cell degeneration (pcd) phenotypes caused by mutations in the axotomy-induced gene, *Nna1*. *Science (New York, N.Y.)*, 295(5561), pp.1904–6.
- Ghetti, B., Norton, J. & Triarhou, L.C., 1987. Nerve cell atrophy and loss in the inferior olivary complex of ‘Purkinje cell degeneration’ mutant mice. *The Journal of comparative neurology*, 260, pp.409–422.
- Goodlett, C.R., Hamre, K.M. & West, J.R., 1992. Dissociation of spatial navigation and visual guidance performance in Purkinje cell degeneration (pcd) mutant mice. *Behavioural Brain Research*, 47(2), pp.129–141.
- Grüsser-Cornehls, U., Grüsser, C. & Bährle, J., 1999. Vermectomy enhances parvalbumin expression and improves motor performance in weaver mutant mice: An animal model for cerebellar ataxia. *Neuroscience*, 91(1), pp.315–326.
- Guastavino, J.M., Bertin, R. & Portet, R., 1991. Effects of the rearing temperature on the temporal feeding pattern of the staggerer mutant mouse. *Physiology and Behavior*, 49(2), pp.405–409.
- Guastavino, J.M., Sotelo, C. & Damez-Kinselle, I., 1990. Hot-foot murine mutation: behavioral effects and neuroanatomical alterations. *Brain Research*, 523(2), pp.199–210.
- Hamilton, B. a et al., 1996. Disruption of the nuclear hormone receptor RORalpha in staggerer mice. *Nature*, 379(6567), pp.736–739.
- Herculano-Houzel, S., 2009. The human brain in numbers: a linearly scaled-up primate brain. *Frontiers in human neuroscience*, 3, p.31.
- Hilber, P. et al., 1998. Differential roles of cerebellar cortex and deep cerebellar nuclei in learning and retention of a spatial task: Studies in intact and cerebellectomized Lurcher mutant mice. *Behavior Genetics*, 28(4), pp.299–308.
- Hilber, P. & Caston, J., 2001. Motor skills and motor learning in Lurcher mutant mice during aging. *Neuroscience*, 102(3), pp.615–623.
- Hirai, H. et al., 2005. *Cbln1* is essential for synaptic integrity and plasticity in the cerebellum. *Nature neuroscience*, 8(11), pp.1534–1541.
- De Jager, P.L. et al., 1998. A high-resolution genetic map of the nervous locus on mouse chromosome 8. *Genomics*, 48(3), pp.346–53.

- De Jager, P.L. et al., 1997. A new allele of the lurcher gene, lurcher. *Mammalian Genome*, 8(9), pp.647–650.
- Kohda, K. et al., 2003. Heteromer formation of delta2 glutamate receptors with AMPA or kainate receptors. *Brain research. Molecular brain research*, 110(1), pp.27–37.
- Kohda, K., Wang, Y. & Yuzaki, M., 2000. Mutation of a glutamate receptor motif reveals its role in gating and delta2 receptor channel properties. *Nature neuroscience*, 3, pp.315–322.
- Kohler, M. et al., 1993. Determinants of Ca²⁺ permeability in both TM1 and TM2 of high affinity kainate receptor channels: diversity by RNA editing. *Neuron*, 10(3), pp.491–500.
- Koike, M., Iino, M. & Ozawa, S., 1997. Blocking effect of 1-naphthyl acetyl spermine on Ca(2+)-permeable AMPA receptors in cultured rat hippocampal neurons. *Neuroscience research*, 29(1), pp.27–36.
- Kyuhou, S., Kato, N. & Gemba, H., 2006. Emergence of endoplasmic reticulum stress and activated microglia in Purkinje cell degeneration mice. *Neuroscience letters*, 396(2), pp.91–96.
- Lalonde, R., 1987a. Exploration and spatial learning in staggerer mutant mice. *Journal of Neurogenetics*, 4(6), pp.285–291.
- Lalonde, R., 1987b. Motor abnormalities in staggerer mutant mice. *Experimental brain research*, 68(2), pp.417–420.
- Lalonde, R., 1994. Motor learning in lurcher mutant mice. *Brain Research*, 639(2), pp.351–353.
- Lalonde, R., Lamarre, Y. & Smith, A.M., 1988. Does the mutant mouse lurcher have deficits in spatially oriented behaviours? *Brain Research*, 455(1), pp.24–30.
- Lalonde, R. & Strazielle, C., 2003. Motor coordination, exploration, and spatial learning in a natural mouse mutation (nervous) with Purkinje cell degeneration. *Behavior Genetics*, 33(1), pp.59–66.
- Lalouette, A. et al., 2001. Neurobiological effects of a null mutation depend on genetic context: Comparison between two hotfoot alleles of the delta-2 ionotropic glutamate receptor. *Neuroscience*, 105(2), pp.443–455.
- Lalouette, A., Guénet, J.L. & Vríz, S., 1998. Hotfoot mouse mutations affect the delta 2 glutamate receptor gene and are allelic to lurcher. *Genomics*, 50(1), pp.9–13.
- Landis, S.C., 1973. Ultrastructural changes in the mitochondria of cerebellar Purkinje cells of nervous mutant mice. *Journal of Cell Biology*, 57(3), pp.782–797.
- Landis, S.C. & Mullen, R.J., 1978. The development and degeneration of Purkinje cells in pcd mutant mice. *The Journal of comparative neurology*, 177(1), pp.125–43.

- LaVail, M.M. et al., 1993. Retinal degeneration in the nervous mutant mouse. I. Light microscopic cytopathology and changes in the interphotoreceptor matrix. *The Journal of comparative neurology*, 333(2), pp.168–181.
- Liang, X.H. et al., 1999. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature*, 402(6762), pp.672–676.
- Lomeli, H. et al., 1993. The rat delta-1 and delta-2 subunits extend the excitatory amino acid receptor family. , 315(3), pp.318–322.
- Lorivel, T., Roy, V. & Hilber, P., 2014. Fear-related behaviors in lurcher mutant mice exposed to a predator. *Genes, Brain and Behavior*, 13(8), pp.794–801.
- Le Marec, N., Caston, J. & Lalonde, R., 1997. Impaired motor skills on static and mobile beams in lurcher mutant mice. *Experimental Brain Research*, 116(1), pp.131–138.
- Le Marec, N. & Lalonde, R., 1997. Sensorimotor learning and retention during equilibrium tests in Purkinje cell degeneration mutant mice. *Brain Research*, 768(1-2), pp.310–316.
- Le Marec, N. & Lalonde, R., 1998. Treadmill performance of mice with cerebellar lesions: 1. Purkinje cell degeneration mutant mice. *Behav Neurosci*, 112(1), pp.225–232.
- Maricich, S.M. et al., 1997. Failed cell migration and death of purkinje cells and deep nuclear neurons in the weaver cerebellum. *J.Neurosci.*, 17(0270-6474 (Print)), pp.3675–3683.
- Martin, L.A., Goldowitz, D. & Mittleman, G., 2010. Repetitive behavior and increased activity in mice with Purkinje cell loss: a model for understanding the role of cerebellar pathology in autism. , 31(3), pp.544–555.
- Matsuda, K. et al., 2010. Cbln1 Is a Ligand for an Orphan Glutamate Receptor d2, a Bidirectional Synapse Organizer. *Science (New York, N.Y.)*, 328(May), pp.363–369.
- Matsuda, S. & Yuzaki, M., 2002. Mutation in hotfoot-4J mice results in retention of delta2 glutamate receptors in ER. *European Journal of Neuroscience*, 16(8), pp.1507–1516.
- McKay, B.E. & Turner, R.W., 2005. Physiological and morphological development of the rat cerebellar Purkinje cell. *The Journal of physiology*, 567(Pt 3), pp.829–50.
- McKim, E.J. et al., 2014. Glutamate dysfunction associated with developmental cerebellar damage: Relevance to autism spectrum disorders. , 13(3), pp.346–353.
- Miale, I.L. & Sidman, R.L., 1961. An autoradiographic analysis of histogenesis in the mouse cerebellum. *Experimental neurology*, 4, pp.277–296.
- Migheli, A. et al., 1995. Detection of apoptosis in weaver cerebellum by electron microscopic in situ end-

- labeling of fragmented DNA. *Neuroscience Letters*, 199(1), pp.53–56.
- Michel, D. et al., 1992. Possible functions of a new genetic marker in central nervous system: the sulfated glycoprotein-2 (SGP-2). *Synapse (New York, N.Y.)*, 11(2), pp.105–11.
- Mittleman, G. et al., 2008. Cerebellar modulation of frontal cortex dopamine efflux in mice: Relevance to autism and schizophrenia. *Synapse*, 62(7), pp.544–550.
- Miyoshi, Y. et al., 2014. A new mouse allele of glutamate receptor delta 2 with cerebellar atrophy and progressive ataxia. *PLoS ONE*, 9(9).
- Morris, R., 1984. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 11(1), pp.47–60.
- Mullen, R.J., Eicher, E.M. & Sidman, R.L., 1976. Purkinje cell degeneration, a new neurological mutation in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73(1), pp.208–12.
- Mullen, R.J. & Lavail, M.M., 1975. Two new types of retinal degeneration in cerebellar mutant mice. *Nature*, 258(5535), p.528.
- Nichollis, J.G. et al., 2013a. Cytoarchitektura kůry mozečku. In *Od neuronu k mozku*. Praha: Academia, pp. 470 – 471.
- Nichollis, J.G. et al., 2013b. Struktura iontových kanálů. In *Od neuronu k mozku*. Praha: Academia, pp. 56 – 57.
- Nishiyama, J. et al., 2010. Reevaluation of neurodegeneration in lurcher mice: constitutive ion fluxes cause cell death with, not by, autophagy. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 30(6), pp.2177–2187.
- Norman, D.J. et al., 1995. The lurcher gene induces apoptotic death in cerebellar Purkinje cells. *Development*, 121, pp.1183–1193.
- * Palmen, S.J.M.C. et al., 2004. Neuropathological findings in autism. *Current Diagnostic Pathology*, 10(2), pp.93–105.
- Patil, N. et al., 1995. A potassium channel mutation in weaver mice implicates membrane excitability in granule cell differentiation. *Nature genetics*, 11(2), pp.126–129.
- Phillips, R.J.S., 1960. ‘Lurcher’, a new gene in linkage group XI of the house mouse. *Journal of Genetics*, 57(1), pp.35–42.
- Poley, W., 1974. Emotionality related to maternal cannibalism in BALB and CS7BL mice. *Animal learning & behavior*, 2(4), pp.241–244.

- Porrás-García, E. et al., 2005. Purkinje cell loss affects differentially the execution, acquisition and prepulse inhibition of skeletal and facial motor responses in Lurcher mice. *European Journal of Neuroscience*, 21(4), pp.979–988.
- Selimi, F., Doughty, M., et al., 2000. Target-related and intrinsic neuronal death in Lurcher mutant mice are both mediated by caspase-3 activation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 20(3), pp.992–1000.
- Selimi, F., Vogel, M.W. & Mariani, J., 2000. Bax inactivation in lurcher mutants rescues cerebellar granule cells but not purkinje cells or inferior olivary neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 20(14), pp.5339–45.
- Schmahmann, J.D. & Sherman, J.C., 1998. The cerebellar cognitive affective syndrome. *Brain*, 121(4), pp.561–579.
- Takayama, C. et al., 1995. Light- and electron-microscopic localization of the glutamate receptor channel $\delta 2$ subunit in the mouse Purkinje cell. *Neuroscience Letters*, 188, pp.89–92.
- Thullier, F. et al., 1997. Neurobehavioral evaluation of lurcher mutant mice during ontogeny. *Developmental Brain Research*, 100(1), pp.22–28.
- Triarhou, L.C., 2010. Biological clues on neuronal degeneration based on theoretical fits of decay patterns: towards a mathematical neuropathology. *Folia neuropathologica / Association of Polish Neuropathologists and Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences*, 48(1), pp.3–10.
- Tůma, J. et al., 2015. Mutation-related differences in exploratory, spatial, and depressive-like behavior in pcd and Lurcher cerebellar mutant mice. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 9(May), p.116.
- Tůma, J., Cendelín, J. & Vožeh, F., 2013. Maternal infanticide and low maternal ability in cerebellar mutants Lurcher. *Neuroendocrinology Letters*, 34(7), pp.618–623.
- Uzman, L.L., 1960. The histogenesis of the mouse cerebellum as studied by its tritiated thymidine uptake. *The Journal of comparative neurology*, 114, pp.137–59.
- Vernet-der Garabedian, B. et al., 1998. Abnormal IL-1 β cytokine expression in the cerebellum of the ataxic mutant mice staggerer and Lurcher. *Molecular Brain Research*, 62(2), pp.224–227.
- Vogel, M.W. et al., 2001. Cytochrome oxidase activity is increased in +/Lc Purkinje cells destined to die. *Neuroreport*, 12(14), pp.3039–43.
- Wang, K.K.W., 2000. Calpain and caspase: Can you tell the difference? *Trends in Neurosciences*, 23(1), pp.20–26.

- Wang, Q.J. et al., 2006. Induction of autophagy in axonal dystrophy and degeneration. *J Neurosci*, 26(31), pp.8057–8068.
- Wang, Y. et al., 2003. A hot spot for hotfoot mutations in the gene encoding the delta2 glutamate receptor. *European Journal of Neuroscience*, 17(8), pp.1581–1590.
- Wullner, U. et al., 1995. Apoptotic cell death in the cerebellum of mutant weaver and lurcher mice. *Neuroscience Letters*, 200(2), pp.109–112.
- Yatsushiro, S. et al., 2000. Glutamate receptor subunit delta2 is highly expressed in a novel population of glial-like cells in rat pineal glands in culture. *Journal of Neurochemistry*, 75(3), pp.1115–1122.
- Yue, Z. et al., 2002. A novel protein complex linking the $\delta 2$ glutamate receptor and autophagy: Implications for neurodegeneration in lurcher mice. *Neuron*, 35(5), pp.921–933.
- * Yuzaki, M., 2003. The d2 glutamate receptor: 10 Years later. *Neuroscience Research*, 46(1), pp.11–22.
- Yuzaki, M., 2004. The delta2 glutamate receptor: a key molecule controlling synaptic plasticity and structure in Purkinje cells. *Cerebellum (London, England)*, 3(2), pp.89–93.
- Zanjani, H. et al., 1998. Overexpression of a Hu-bcl-2 transgene in Lurcher mutant mice delays Purkinje cell death. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences - Serie III*, 321(8), pp.633–640.
- Zanjani, H.S. et al., 2009. Death and survival of heterozygous lurcher purkinje cells in vitro. *Developmental Neurobiology*, 69(8), pp.505–517.
- Zanjani, H.S. et al., 1992. Neuronal cell loss in heterozygous staggerer mutant mice: a model for genetic contributions to the aging process. *Brain Res Dev Brain Res*, 67, pp.153–160.
- Zuo, J. et al., 1997. Neurodegeneration in Lurcher mice caused by mutation in delta2 glutamate receptor gene. *Nature*, 388(6644), pp.769–773.

* označené zdroje jsou review

Internetové zdroje:

<http://www.informatics.jax.org/marker/MGI:95813> (staženo dne 2. 5. 2016)