

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra Fyziologie živočichů



Bakalářská práce

**SLEDOVÁNÍ FENOTYPU HUNTINGTONOVY
NEMOCI U ZVÍŘECÍCH MODELŮ**

Žaneta Dosoudilová

Vedoucí práce: Mgr. Monika Baxa

Praha 2013

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 dne 27. dubna 2013

.....

Žaneta Dosoudilová

Ráda bych poděkovala své vedoucí práce Mgr. Monice Baxa za trpělivost, výborné rady a vedení při tvorbě této práce. Za pomoc nejen při sepisování práce dále děkuji MUDr. Jiřímu Klempířovi, Ph.D.

Abstrakt

Huntingtonova choroba (HD) je vážné dědičné neurodegenerativní autozomální onemocnění postihující jedince bez rozdílu pohlaví, které je charakterizováno neurodegenerací striata a dalších oblastí mozku. Příznaky nemoci se mohou lišit svým rozsahem, mají však mnohé společné rysy – motorické poruchy, kognitivní a behaviorální změny, imunitní deficit. Pacienti jsou odkázáni na speciální péči a umírají během několika následujících let od projevu prvních známek nemoci. V současnosti je HD neléčitelná. Mechanismus patofyziologie onemocnění není doposud uspokojivě popsán. Společně s pokrokem metod genového inženýrství a snahou mnoha rodin, v níž se HD vyskytuje, je nyní HD předmětem četných vědeckých a lékařských studií. Ke snaze nalézt vhodnou terapii pro HD by mohly dopomoci studie na modelových organismech. Každý zvířecí model je ale optimální jenom tehdy, když pozorovaný fenotyp onemocnění koreluje se symptomy u pacientů. Jenom tak, na nich bude možné ověřit hypotézy o patogenitě nemoci a stanovit možnosti terapie.

Klíčová slova:

Huntingtonova choroba, zvířecí genetické modely, neurodegenerace, huntingtin, transgeneze

Abstract

Huntington's disease (HD) is a severe autosomal inherited neurodegenerative disorder that affects individuals regardless of gender. HD is characterized by neurodegeneration in striatum and other brain areas. Although symptoms of the disease can be various, they have many common features - motor disorders, cognitive and behavioral changes, immune deficiency. Patients are dependent on a special care and die due within the next few years since the first signs of the disease. Currently no known cure of HD is available. Mechanism of pathophysiology of the disease has not been sufficiently described. Along with the progress of genetic engineering, and the effort of many families in which HD occurs, HD is now the subject of numerous scientific and medical studies. Studies on model organisms could be helpful to solve these problems. However, only animal models whose phenotype correlates with the phenotype of HD patients is suitable for the research. This would be the only safe way how to verify hypotheses on the pathogenesis of the disease and determine treatment options.

Key words:

Huntington's disease, neurodegeneration, huntingtin, genetic animal models, transgenesis

Seznam použitých zkratek

CAG	cytosin – adenosin – guanin
CHAT	cholin-acetyltransferáza
cDNA	cyklická deoxyribonukleová kyselina
DARPP32	dopaminem a cAMP-regulovaný fosfoprotein 32
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
GABA	γ -aminomáselná kyselina
GAD	dekarboxyláza glutamové kyseliny
HD	Huntingtonova choroba
HTT	huntingtin
IT-15	„interesting transcript 15“
MRI	zobrazování pomocí magnetické rezonance
mRNA	messenger RNA, informační RNA
ORF	otevřený čtecí rámec
PCR	polymerázová řetězová reakce
PET	pozitronová emisní tomografie
polyQ	polyglutaminový řetězec
RISC	RNA-indukovaný silencing komplex
siRNA	silencing RNA

Obsah

Úvod	2
1. Huntingtonova choroba	3
1.1. Historie a prevalence.....	3
1.2. Etiologie.....	4
1.3. Neuropatologie.....	6
1.4. Diagnostika	8
1.5. Neurochemie	9
1.6. Možností léčby	13
2. Modely Huntingtonovy choroby	15
2.1. Chemické modely	15
2.2. Genetické modely	16
2.2.1. Genetické metody používané k transgenezi	17
2.2.2. Hlodavčí modely.....	19
2.2.2.1. Myši exprimující zkrácenou délku huntingtin	19
2.2.2.2. Myši exprimující full-length huntingtin.....	20
2.2.2.3. Knock-in myši	21
2.2.2.4. Modely potkanů	22
2.2.3. Modely velkých savců.....	23
2.2.3.1. Transgenní model primáta	23
2.2.3.2. Transgenní model ovce	24
2.2.3.3. Transgenní modely prasat.....	27
2.2.4. Shrnutí využití zvířecích modelů	32
Závěr	33
Reference	34

Úvod

Huntingtonova choroba (HD) je zatím neléčitelné dědičné neurodegenerativní autozomální onemocnění postihující jedince bez rozdílu pohlaví, které je charakterizované fenotypem s pomalými progresivními změnami chování a osobnosti, postupnou demencí a pohybovými poruchami (Purdon a kol., 1994). HD je způsobena nestabilní expanzí CAG (cytosin – adenosin – guanin) tripletů v kódující oblasti IT-15 genu na chromosomu 4, která kóduje protein huntingtin (HTT). Huntingtin je v nemutované formě přítomen u všech obratlovců, má vliv na správný vývoj mozku (Zuccato a kol., 2010) a je významný pro přežití a správné fungování neuronů (Zuccato a Cattaneo, 2007). Exon 1 genu HTT obvykle obsahuje sekvenci 6-35 po sobě jdoucích glutaminů, zatímco u pacientů postižených HD se nachází obvykle více než 40 CAG opakování (Roos, 2010). Nástup a závažnost onemocnění tedy souvisí s počtem CAG repetit (Andrew a kol., 1993; Roos, 2010). Jelikož je HD podmíněna mutací v jediném genu, inzerce tohoto mutovaného genu do genomu subhumánních primátů, hlodavců, ovcí nebo prasat vyvolává onemocnění (Zuccato a kol., 2010). Tato jediná mutace dodá proteinu HTT zcela nové, toxické vlastnosti, škodlivé pro mozkové buňky. Zároveň také snižuje neuroprotektivní funkci nemutovaného HTT. Přesné mechanismy patofyziologie HD nejsou zatím objasněny. V současné době je možno použít pouze lidské vzorky získané *post mortem* a tak výzkum HD významně závisí na zvířecích modelech, které byly prozatím úspěšně používány k výzkumu patologie, molekulárních cílů a terapeutik neurodegenerativních onemocnění (Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba), ale také například *diabetes mellitus*. Zároveň se pracuje na vytvoření modelů HD, kterých fenotyp by koreloval s projevy HD u pacientů (Zuccato a kol., 2010).

Cílem této práce je shrnout dosavadní poznatky o Huntingtonově chorobě, jejím výzkumu na zásadních zvířecích modelech a poukázat na možnosti jejich využití s ohledem na klady a zápory jednotlivých modelů. V první kapitole je blíže popsán průběh a HD, její diagnostika a možné cíle léčby. Druhá část přináší stručný přehled savčích modelů HD společně s přehledem genetických metod použitých k jejich vytvoření. Práce dále porovnává modely mezi sebou. Poukazuje na důležitost výzkumu neurodegenerativních onemocnění na zvířecích modelech a navrhuje možné terapeutické cíle.

1. Huntingtonova choroba

1.1. Historické pozadí a prevalence

Poprvé byla Huntingtonova choroba (HD) zaznamenána v roce 1374 jako bezejmenná epidemie, občas také zvaná „taneční mánie“. O několik desítek let později definoval Paracelsus tyto mimovolní pohyby termínem chorea, což svědčí o jejich původu v centrální nervové soustavě (Zuccato a kol., 2010). První popis pacienta trpícího chorobou dnes nazývanou Huntingtonova Ch. Watersem se datuje do roku 1842 (Bruyn, 1968). Charakter onemocnění zůstal neznámý dalších třicet let – tedy do roku 1872, kdy přišel s přesným popisem onemocnění americký lékař George Huntington. Krátký článek s názvem *On Chorea* publikoval v *Medical and Surgical Reporter of Philadelphia* v témže roce. V nadcházejících desetiletích bylo objasněno mnohé z neuropatologie choroby. Lékaři si poprvé všimli zhoršení v centrální oblasti mozku pacientů s HD a identifikovali *nucleus caudatus* (ocasaté jádro - část striata) jako hlavní cíl buněčné apoptózy. Zásahu na velkém zájmu o výzkum HD má především americký eugenik Ch. Davenport, jehož studie, ve které mapoval rodiny s výskytem HD, je vůbec největší studií rodin s HD. Později, v padesátých letech dvacátého století, diagnostikoval A. Negrette HD desítkám osob ze společenství žijícím v okolí jezera Maracaibo ve Venezuele. Na stejném místě byl o dvacet let později N. Wexlerovou objeven gen zodpovědný za HD (Zuccato a kol., 2010). Gen byl identifikován na čtvrtém chromozomu (Gusella a kol., 1983). O deset let později se podařilo nalézt přesný lokus HTT genu v kódující oblasti IT-15 na krátkém raménku chromozomu 4p16.3 (Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993).

Prevalence HD je nyní celosvětově odhadována na 5-8 ze 100 000 obyvatel (Kumar a kol., 2010; Zuccato a kol., 2010). S největší frekvencí se HD vyskytuje v Západní Evropě a zemích s obyvateli evropského původu. Naopak nejnižší frekvence výskytu HD je v Africe, Číně, Finsku a Japonsku (Kumar a kol., 2010).

1.2. Etiologie

Jak bylo již vzpomenuto v úvodu, Huntingtonova choroba je autozomálně dominantně dědičné onemocnění způsobené zvýšeným počtem CAG opakování v genu kódujícím protein huntingtin lokalizovaném na krátkém raménku chromozomu 4p16.3 (Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993). Wild-type huntingtin má počet CAG repetice v rozmezí 6-26. HD je spojena s počtem 36 CAG a více. Repetice dlouhá 36-39 CAG vede k úplné penetranci onemocnění s velmi pozdním nástupem. Počet CAG v rozmezí 29-35, tzv. střední alely, je nestabilní. Jedinec je zcela zdravý, ale tyto alely jsou náchylné na mutace a může tak prodloužením úseku dojít ke zmnožení počtu až na hranici penetrance a tato mutace může být předána potomstvu, u kterého se HD projeví. Wild-type huntingtin má v organismu řadu nezastupitelných funkcí. Hraje roli v synaptických funkcích, je nezbytný pro správný embryonální vývoj, případně má antiapoptotický a ochranný účinek proti toxickým vlivům mutantního huntingtinu (Roos, 2010). Byla popsána inverzní korelace mezi délkou polyglutaminového řetězce a věkem nástupu nemoci – čím delší polyQ, tím časnější nástup HD (Andrew a kol., 1993). Nejčastější formou HD u více než 90 % všech případů je tzv. klasická forma HD (Roos, 2010).

Formy HD podle věku při nástupu příznaků:

Forma klasická - počínající věk mezi 35. – 50. rokem věku (cca 90 % případů)

Forma juvenilní - počínající do 20. roku věku (cca 5 % případů)

Forma s pozdním počátkem - počínající až po 60. roce věku (cca 5 % případů)

(podle Roos, 2010)

Průběh a příznaky klasické formy

Prvotní příznaky HD jsou nespecifické behaviorální projevy, patří mezi ně deprese, někdy provázená hubnutím, nezájmem a ztrátou chuti k jídlu. Její diagnostika je i v pozdějších fázích nemoci problematická, jelikož úbytky váhy, ztráta chuti k jídlu a apatie se vyskytují i u nedepresivních HD pacientů. Deprese může pacienta dovést k sebevraždě, nejvíce jich spadá do počátečního období, do fáze klinického testování pacienta. Dále se často vyskytuje úzkost spojená s obavami z dalšího průběhu nemoci. Z psychických poruch se

často projevuje agrese, včetně fyzické agrese k okolí. Pasivita a ztráta zájmů jsou považovány za součást apatie. Psychózy se objevují především v pozdějších fázích onemocnění, ve většině případů společně s poklesem kognitivních funkcí. Klinický obraz je srovnatelný s paranoidní schizofrenií. V časných stádiích je příznačnější hypersexualita, jež může způsobit značné problémy ve vztazích s okolím. V pozdějších fázích naopak převažuje hyposexualita. Dalšími příznaky jsou kognitivní poruchy, které mohou být přítomny dlouho před prvními motorickými příznaky, ale mohou být velmi mírné po celou dobu onemocnění až do jejich pokročilých fází, patří sem např. demence nebo poruchy krátkodobé paměti a učení (Roos, 2010).

Brzy po těchto změnách se objevují motorické dysfunkce, zejména mimovolní pohyby (chorea, dystonie). Zpočátku se pohyby týkají končetin nebo jen prstů a obličejových svalů, později záškuby hýbou celým tělem a způsobují tak nemožnost výkonu cílených pohybů. Chůze a řeč se stávají nejistými, z počátků může okolí připadat pacient jako neustále opilý či neurotický, přidávají se problémy s polykáním (což může způsobit udušení), inkontinence a kachektizace. Dystonie je charakteristická pomalejšími pohyby se zvýšeným svalovým tonem, vedoucími k abnormálnímu držení těla, rotaci trupu nebo končetin. Dystonie může být první známkou nemoci a vést k předběžné diagnóze. Dále nemocní trpí tiky, dobře viditelnými hlavně v obličeji. Chorea, také dříve nazývaná jako „tanec svatého Víta“ se projevuje pohyby podobnými kroucení při tanci a svíjení. Jelikož se šubavé pohyby týkají i končetin, ztěžují nebo znemožňují pacientům chůzi. Na rozdíl od ataxie nebo parkinsonismu se jedná až do velmi pozdní fáze nemoci o hyperkinetickou poruchu pohybu. Mimovolní pohyby v pozdějších fázích nemoci ustávají a svalstvo celého těla je spíše ztuhlé. Nemocný je tak téměř nepohyblivý a stává se zcela závislým na péči okolí. Obvykle pacient umírá během 17-20 let od prvních příznaků, nejčastější příčina smrti je infekce v důsledku oslabené imunity nebo druhotné komplikace (Roos, 2010). Degenerace postihuje také některé periferní tkáně (Björkqvist a kol., 2005). Nejvýraznější degenerace mimo centrální nervový systém byla u pacientů, ale i u zvířecích modelů HD, objevena ve varlatech, kde se výrazně snižuje počet zárodečných buněk, ze kterých se vyvíjí spermatické buňky a spermatické buňky. Stěny semenného kanálku výrazně zesilují a snižuje se tak jeho průřez. V důsledku těchto jevů je negativně ovlivněna spermiogeneze. *Post mortem* získané vzorky varlat některých pacientů s HD byli analyzovány jako aspermatické. Degenerace zárodečných a Sertoliho buněk ve varlatech je pravděpodobně způsobena přímou toxicitou mutantního HTT, který je zde exprimován ve větší míře (Van Raamsdonk a kol., 2007). Dalšími periferními tkáněmi s prokázanou expresí

mutovaného HTT jsou srdce, játra, plíce, ledviny a slezina, u modelových myší tyto orgány vlivem exprese HTT zvyšují svou hmotnost (Van Raamsdonk a kol., 2006).

K sekundárním příznakům onemocnění patří již od počátečních fází HD ztráta hmotnosti, přisuzovaná dříve choree. Nebyla však prokázána souvislost ani s choreou, ani s počtem opakování CAG a uvažuje se spíše o souvislosti se ztrátou neuronů v hypothalamu, která způsobuje nejspíše i sníženou chuť k jídlu, obtížnější manipulaci s potravinami a ztížené polykání. Dysfunkce hypothalamu také částečně vysvětluje poruchy spánku (Zuccato a kol., 2010). Nemocní často trpí poruchami řeči, která se postupně stává méně srozumitelnou (Roth a kol., 2006). Již dlouhou dobu je známo, že u pacientů s HD je již od počátku nemoci narušen čich. Ačkoliv jsou pacienti schopni detekovat pachy, nejsou schopni určit, co přesně cítí a předpokládá se porucha olfaktorického systému (Hamilton a kol., 1999).

1.3. Neuropatologie

Příčinou projevů HD je rozsáhlá neurodegenerace v mozku. Neurony odumírají apopticky, čili vysoce organizovanou řízenou formou buněčné smrti, běžnou v řadě biologických procesů a patologických stavů. V centrálním nervovém systému je apoptóza způsobena nesprávným konformačním poskládáním proteinů u celé řady neurodegenerativních onemocnění včetně HD. Tato onemocnění se společně vyznačují selektivní neurodegenerací a akumulací proteolytických fragmentů mutantního proteinu s nesprávnou konformací v neuronech (Yang a kol., 2010).

Nejčastěji dodnes používaný systém pro posouzení závažnosti degenerace u HD byl vyvinut neuropatologem J. P. Vonsattlem na Kolumbijské Univerzitě. Posuzuje se z *post mortem* vzorků striata a klasifikuje onemocnění do 5 stupňů podle závažnosti neurodegenerace. 0. stupeň je při zběžném vyšetření k nerozeznání od zdravého mozku. Při histologickém vyšetření je rozpoznatelná ztráta 30-40 % neuronů v přední části ocasatého jádra. U stupně 1 rozpoznáváme atrofii, ztrátu neuronů a astrogliosis i v zadní části a v některých případech i v těle ocasatého jádra. Stupně 2 a 3 jsou charakterizovány progresivní závažnou celostriatální atrofií. Stupeň 4 zahrnuje nejvíce závažné případy HD s atrofií striata s až 95 % ztrátou neuronů (Vonsattel a kol., 1985).

Neuropatologické studie odhalily atrofii, neurodegeneraci a gliosi v bazálních gangliích a jim přilehlých oblastech a ve strukturální mozkové kůře (Bruyn, 1968; Vonsattel a kol., 1985). Neuropatologické změny jsou selektivní, nervová degenerace počíná ve striatu, odkud se nejdříve šíří do střední oblasti ocasatého jádra po mesiolaterálním a kaudorostrálním gradientu směrem ven do subregionů putamenu a pallida, subthalamických jader a hipokampu. Ztráta nepřímých neuronových drah ze striata do pallida může mít za následek zvýšený výskyt mimovolních pohybů (Kumar a kol., 2010). Nejvíce postižené neurodegenerací jsou středně velké ostnité neurony, které tvoří značnou část striatálních neuronů. Tyto neurony jsou přímo regulovány dopaminergními vstupy ze *substantia nigra pars compacta* a glutamatergními vstupy z mozkové kůry a thalamu a projektovány zpět do výstupních jader bazálních ganglií (vnitřní segment *globus pallidus*, *substantia nigra reticulata* a ventrální pallidum) nebo nepřímo, vnějším segmentem *globus pallidus* a subthalamickým jádrem (Gil a Rego, 2008). Ostatní oblasti mozku významně ovlivněné HD jsou *substantia nigra*, mozková kůra, hipokampus (Spargo a kol., 1993), angulární gyry temenního laloku (Macdonald a kol., 1997), Purkyňovy buňky v mozečku (Jeste a kol., 1984), hypothalamus (Kremer a kol., 1991) a centromediální parafascikulární komplex thalamu (Heinsen a kol., 1999). Poškození neuronů mimo bazální ganglia je však méně rozsáhlé (Vonsattel a kol., 1985).

V časném symptomatickém stádiu HD nemusí k neurodegeneraci docházet, na druhou stranu jsou hojné důkazy o dysfunkci neuronů u asymptomatických pacientů (Myers a kol., 1991; Mizuno a kol., 2000; Gomez-Tortosa a kol., 2001). Kortikální neurony vykazují snížené množství nervových vláken, neurofilamentů, tubulinu a mikrotubul-asociovaného proteinu 2 společně s complexinem 2 v nízkých koncentracích (DiProspero a kol., 2004). Tyto prvky jsou spojeny se synaptickými funkcemi, cytoskeletální integritou a axonálním transportem a hrají důležitou roli v kortikální dysfunkci patogeneze onemocnění (Walker, 2007).

Spojitosť mezi biochemií a patogenezi Huntingtonovy choroby potvrzují četne neuropatologické studie podtrhující úlohu malých a středně velkých ostnitých neuronů striata, které obsahují inhibiční neurotransmitter GABA (kyselina γ -amino-máselná) (Ferrante a kol., 1991), a dynorfin, enkefalin nebo substanci P jako ko-transmitery. Podle použitého ko-transmiteru a typu dopaminového receptoru, který je exprimován, se pak liší striatální projekce přímých a nepřímých drah. Neurony přímé dráhy obsahují substanci P a přednostně

exprimují dopaminové D1 receptory, které po aktivaci stimulují enzym adenylátcyklázu, zatímco neurony nepřímé dráhy obsahují enkefalin a přednostně exprimují D2 receptory, které po aktivaci enzymu adenylátcyklázu inhibují (Reiner a Anderson, 1990). Změna úrovně exprese neurotransmiterů ovlivňujících zejména glutamátové, GABAergní a dopaminové receptory, je dalším charakteristickým znakem HD (Cha a kol., 1998).

1.4. Diagnostika

Průběh života člověka s jedním rodičem trpícím Huntingtonovou chorobou může být rozdělen do rizikové, preklinické a klinické fáze. Riziková fáze končí, když se diagnostikuje, zda osoba nese zvýšený počet CAG opakování v genu kódujícím HTT. Pokud je u ní diagnostikována HD, nastává preklinická fáze končící v momentě prvních motorických příznaků HD (Roos, 2010). Stále rostou důkazy o tom, že se kognitivní a psychiatrické symptomy onemocnění vyskytují až 16 let před motorickými projevy (Björkqvist a kol., 2008), ale za období počátku onemocnění, tedy i počátku klinické fáze, je považováno období nástupu motorických poruch (Margolis a Ross, 2003), ačkoliv vše spíše nasvědčuje korelaci s prvními psychiatrickými změnami (Roos, 2010).

Diagnóza je založena na pozorování klinických příznaků. Onemocnění chorobou se hodnotí na základě neurologického pozorování projevů typických pro extrapyramidová onemocnění ve spojení s genetickým testováním na přítomnost rozšířeného CAG opakování v genu IT-15 (Paulsen, 2011). Potvrzuje se rodinnou anamnézou HD (Roos, 2010). Pro osoby se zvýšeným rizikem HD je vždy nelehké rozhodnutí, zda se dát otestovat v době, kdy ještě nevykazují žádné viditelné příznaky HD. Ti, kteří již mají potomky, pak toto riziko přenáší i na ně. Preklinická diagnóza vyžaduje extrémní opatření proti chybné interpretaci výsledků, jelikož jejich obdržení je pro pacienty velice stresující záležitost. Doba, kdy nemoc nastoupí, se taktéž nedá přesně určit. Fáze, kdy je u pacienta objevena expanze CAG repetice a geneticky prokázána mutace, ale zatím nevykazuje motorické příznaky, se nazývá prodromální (Paulsen a kol., 2006). Bylo dokázáno, že objem striata v době klinické diagnózy HD na základě pozorovaných motorických poruch je již menší o 50% (Aylward a kol., 2004). Striatální atrofii lze pozorovat na elektorencefalogramu (EEG), či zobrazovacími studiemi podkorových struktur, včetně axiální počítačové tomografie (CT) a magnetická rezonance (MRI). Tyto metody účinně prokazují striatální atrofii u pacientů s již klinickými příznaky HD

(Oliva a kol., 1993). Pro preklinické studie se úspěšně využívá pozitronová emisní tomografie (PET), pomocí níž je možné detekovat hypometabolismus glukózy ve striatu, značící jeho atrofii, ještě předtím, než lze dysfunkce prokázat pomocí axiální CT nebo MRI (Hayden a kol., 1986).

K posouzení závažnosti kognitivního deficitu využívá valná většina HD klinik jednotnou unifikovanou stupnici - Unified Huntington Disease Rating Scale (Huntington Study Group, 1996). Test zahrnuje 3 části – test s číselnými symboly, Stroopův test a test slovní produkce. Pro správné vyhodnocení je nutné také odhadnout a zahrnout původní intelekt (Paulsen, 2011). Podle Peavy a kol., je pro kompletní diagnostiku HD také důležité určit do té doby podceňovanou míru demence a navrhl definici demence při HD jako poruchu nejméně dvou kognitivních oblastí, ve smyslu snížení schopností nebo zhoršený průběh těchto funkcí (Peavy a kol., 2010). Aplikací této definice na klinický vzorek prokázal jeho platnost a použitelnost pro budoucí diagnostiku (Paulsen, 2011).

Ještě před projevy motorickými lze pozorovat také změny imunologické. Imunitní systém je při HD v neustále aktivovaném stavu, což způsobuje imunitní dysfunkce a patologické stavy. Toto lze identifikovat v krevním vzorku z monocytů exprimujících mutantní huntingtin, který autonomně aktivuje imunitní buňky. Podobný vzor jako u monocytů byl sledován u makrofágů v mikroglíích myších modelů HD (Björkqvist a kol., 2008). Druhou možností genetického testování HD je detekce cytokinů z plasmy, případně mozkomíšního moku. Cytokiny, látky sekretované jako součást odezvy imunitnímu systému, jsou při HD nacházeny v plasmě ve zvýšených koncentracích. Cytokiny byly u pacientů preklinicky detekovány jak v plasmě, tak v mozkomíšním moku, kde jsou produkovány mikroglíemi, dokonce 16 let před prvními motorickými příznaky. Aktivace mikroglíí vede k excitotoxicitě – produkci volných radikálů a oxidativnímu stresu, následovanému aktivací kaspázy a počínající apoptózou neuronů (Björkqvist a kol., 2008).

1.5. Neurochemie

Existuje několik důležitých nevyřešených otázek týkajících se progresivní nervové degenerace, včetně porozumění sledu událostí, které k neurodegeneraci a buněčné smrti vedou, a nalezení důvodu selektivní zranitelnosti konkrétních typů neuronů ve striatu. Různé

typy buněčného poškození se mohou protínat a vést jak jednotlivě tak vzájemně k neuronální degeneraci a nakonec smrti (Zuccato a kol., 2010).

Poškození neuronální DNA mohou způsobit volné radikály, k jejichž produkci vede nadbytek glutamátu (Albin a kol., 1990) a následná nepříznivě vysoká produkce vápníku, při které volné radikály unikají. Radikály také poškozují proteiny neurofilamentů (Ayala a kol., 2007), sloužících jako neurální kostra. Nervové struktury, které vykazují dysfunkce a degenerují při HD, jsou vzájemně propojeny (kortiko-striální spojení, striální výběžky do *globus pallidus* a *substantia nigra*, *substantia nigra* a *globus pallidus* výběžky do thalamu a výběžky thalamu do mozkové kůry). Existuje zde nespočet synaptických interakcí, které mohou přispět k pozorování změn u HD. Od průkopnické studie (Wong a kol., 1982), ve které bylo poukázáno na problémy v syntéze glutamátu u kortiko-striálních neuronů, je vyšetřování těchto drah jádrem mnoha dalších pokusů s cílem porozumět mechanismům patologie HD (Kumar a kol., 2010). Excitotoxicita může být definována jako buněčná smrt následkem toxického působení excitačních aminokyselin (Roberts a kol., 2005). Glutamát je v CNS savců hlavním excitačním neurotransmiterem (Engelsen, 1986). Neurotoxicita se obvykle projevuje po delším vystavení neuronů působení glutamátu, které obvykle souvisí s nadměrným přílivem vápenatých iontů a vody do buňky. Nadbytek vápníku vede k aktivaci enzymů štěpících proteiny, membrány a nukleové kyseliny v buňce. Selektivní neurodegeneraci ostnitých projekčních neuronů striata vysvětluje hypotéza, která v kontextu HD uvádí, že nadměrná aktivace glutamátových receptorů zvyšuje uvolňování glutamátu z kortikální aferentní dráhy, následně způsobí snížené vstřebávání glutamátu gliemi a přesytení postsynaptických glutamátových receptorů ve striatu změnu kalciové homeostázy. Tento jev vyvolá mitochondriální dysfunkce vedoucí ke ztrátě neuronů (DiFiglia a kol., 1990). Nejvíce zranitelné jsou striální neurony s vysokou expresí NMDAR (N-methyl-D-aspartátový receptor), proto se jednalo o jeden z prvních glutamátových receptorů studovaných na myších modelech HD (Kumar a kol., 2010).

90 % neuronů striata tvoří středně velké ostnité neurony, které jsou GABAergní, což znamená, že jsou inhibovány neurotransmiterem GABA. GABAergní projekční neurony degenerují hned od počátku progresu HD (Faull a kol., 1993). V *post mortem* vzorcích mozku byly nalezeny snížené hladiny GABA a jejího syntetického enzymu GAD (glutamic acid decarboxylase). Narušení GABAergních systémů není omezeno pouze na striatum, snížené hladiny GABA společně se sníženou hladinou synaptického enzymu GAD nacházíme také v

hipokampu a mozkové kůře (Reynolds a Pearson, 1987). Ačkoli spojení mezi biochemickými změnami a patogenezí není ještě zcela objasněno, dokazují neuropatologické studie význam nerovnováhy mezi inhibičními a excitačními neurotransmitery u neuronů nepřímých drah a jejich podíl na fenotypu HD, zejména choree a mimovolních pohybech (Kumar a kol., 2010).

Neostriatum je hustě inervováno dopaminergními vlákny vedoucími ze *substantia nigra*. Dopaminergní a glutamatergní systémy úzce interagují se středními ostnatými neurony striata - dopaminergní synapse se nachází hlavně na krku dendritů středních ostnatých neuronů, zatímco glutamatergních kortikální aferentní synapse jsou specificky umístěny na hlavách stejných dendritů (Smith a kol., 1994). Nedávné studie naznačují, že dopaminy mohou také ovlivňovat striatální interneuronovou aktivitu, která reguluje činnosti středních ostnatých neuronů a tím je nepřímo ovlivnit (Bracci a kol., 2002). Dopamin a jeho metabolity mohou generovat vznik reaktivních kyslíkových radikálů a působit neurotoxicky (Ramaswamy a kol., 2007). Při HD dochází zpočátku především ke ztrátě D2 (dopamin 2) receptorů, výskyt D1 (dopamin 1) receptorů je pouze mírně snížen v *substantia nigra* a *globus pallidus*. Jak nemoc postupuje, zranitelnost obou receptorů se v mozku zvyšuje, což naznačuje, že ztráta dopaminergních vláken přispívá k patofyziologii HD (Reddy a kol., 1999), společně se ztrátami acetylcholinu a enzymu cholin-acetyltransferázy (CHAT). CHAT exprese klesá také v dalších oblastech mozku, v *nucleus accumbens*, *septal nuclei* a hipokampu. Acetylcholinové receptory muskarinového typu M2 mají ve striatu a *globus pallidus* sníženou expresi, zatímco v *substantia nigra pars reticulata* a mozkové kůře se jejich výskyt nemění. Snížené hladiny cholinu byly také pozorovány ve vzorcích cerebrospinalní tekutiny pacientů s HD (Kumar a kol., 2010).

V některých experimentálních modelech HD byly pozorovány změny exprese adenosinových receptorů typu A2A a signalizace. Adenosin je purinergní endogenní nukleosid, který funguje jako neuromodulátor. Jeho funkci zprostředkovávají specifické receptory - A1, A2A, A2B, A3 (Fredholm a kol., 2001). Jednotlivé typy adenosinových receptorů mají jedinečnou buněčnou a regionální distribuci v bazálních gangliích a koncentrují se zejména v *nucleus caudatus* a putamenu. Nejvyšší exprese A2A receptorů se nachází v těle striata, které se podílí na řízení komplexních pohybových aktivit (Yin a Knowlton 2006). A2A receptory mohou díky své zvýšené distribuci ve striatu fungovat jako potenciální biomarker HD užitečný pro monitorování progresu onemocnění a posuzování účinnosti neuroprotektivních strategií (Kumar a kol., 2010). Na zvířecích modelech HD byly

objevy neuroprotektivní účinky antagonistů A2A receptoru, spočívající zejména v potlačení účinku pre-synaptických receptorů na uvolňování glutamátu. Možné využití v léčbě HD a mechanickou podstatu tohoto jevu je třeba dále objasnit (Gianfriddo a kol., 2004).

U pacientů HD byl zjištěn deficit systému hypotalamus-hypofýza-pohlavní žlázy (HPG). V HPG ose nejprve hypotalamus uvolní gonadotropin-uvolňující hormon (GnRH), který stimuluje uvolňování luteinizačního hormonu (LH) a folikuly stimulujícího hormonu (FSH) z předního laloku hypofýzy. Následně LH stimuluje Leydigovy buňky ve varlatech k vylučování testosteronu, zatímco FSH interaguje se Sertoliho buňkami a stimuluje vývoj spermií. U mužů s HD byly prokázány snížené hladiny testosteronu, LH a FSH (Markianos a kol., 2005) a poukazuje na ovlivnění osy HPG, jejíž deficit se negativně odráží na spermatogenezi, která může být dokonce zastavena (Van Raamsdonk a kol., 2007).

V oblasti prvních 550 aminokyselin huntingtinu se nachází štěpící místa pro kaspázu-3 a kalpain. Bylo zjištěno, že kaspázou-3 a kalpain-zprostředkovanou sekvenční proteolýzou mutantního huntingtinu se tvoří N-terminální fragmenty, které jsou více toxické a náchylné k tvorbě a hromadění jaderných agregátů (Kim a kol., 2009), což přispívá k buněčné smrti (Gil a Rego, 2008).

Již v rané fázi HD se vyskytují dysfunkce energetického metabolismu neuronů. Metabolické dráhy a mitochondriální funkce jsou napojeny na řadu buněčných procesů souvisejících s produkcí a zpracováním volných radikálů. Oxidační poškození narušuje bioenergetické funkce a vede k poruchám tvorby ATP, způsobujícím ztrátu hmotnosti a atrofii kosterního svalstva (Gil a Rego, 2008). V oblastech souvisejících s HD se snižuje metabolismus glukózy, čehož lze využít jako biomerkeru pro mapování neurodegenerace. Mitochondrie jsou zároveň zdrojem i cílem volných radikálů, způsobujících oxidativní stres, vedoucí k neuronálním dysfunkcím a ztrátám (Kumar a kol., 2010; Zuccato a kol., 2010).

Chronicky zvýšené hladiny cytokinů a chemokinů mohou mít škodlivé následky přispívající k patogenezi v periferních tkáních, stejně jako k neurodegeneraci CNS (Björkqvist a kol., 2008). Například interferon-gamma (IFN- γ) a interleukin (IL-6) jsou dvě klíčové signální molekuly imunitního systému, aktivují makrofágy a stimuluje produkci dalších cytokinů, které způsobují zánět a mohou také přispívat ke ztrátě svalové hmoty a kachexii, pozorované u pacientů s HD. Periferní monocyty izolované z krve pacientů s HD vykazují deficity migrace na imunitní podnět, podobné výsledky byly také pozorovány *in vivo* na myších modelech (Kwan

a kol., 2012). Poměr kynurenin:tryptofan – indikátor pro probíhající zánět, je v séru pacientů s HD vyšší (Stoy a kol., 2005). Další neurochemické charakteristiky HD vzhledem k omezenému rozsahu práce neuvádím.

1.6. Možnosti léčby

Jelikož je HD autozomálně dominantní, stačí k rozvinutí choroby pouze jedna zděděná kopie mutované alely. U recesivních chorob se v rámci genové terapie dodá kopie nepoškozeného genu a díky tomu se fenotyp nemoci již nemůže projevit. Bohužel HD je tímto způsobem neléčitelná a jediná zatím dostupná léčba je symptomatická nebo paliativní. Pacientům je nabízeno užívání neuroleptik, které ale do jisté míry utlumují veškeré funkce a jejich použití je nutno pečlivě zvážit. Pacienti také často užívají antidepresiva. Proti nadměrnému hubnutí je zapotřebí zvýšit denní příjem energie nad 5000 kalorií (Roth a kol., 2006). Některá farmaka mohou zlepšovat i motorické symptomy. Zejména nízké dávky antagonistů dopaminu (např. haloperidol nebo flufenazin) se osvědčily k tlumení chorey, podrážděnosti, halucinací a bludů. Bradykineze může být zmírněna podáním agonistů dopaminu (např. bromocriptin). Poruchy spánku a denní spavost mohou být léčeny klonazepamem, poruchy spojené úzkostí lze potlačit anxiolytiky (White a kol., 1992). Další látky a léčebné strategie jsou ve fázi testování na buněčných kulturách a na zvířecích modelech HD (Zuccato a kol., 2010).

Nabízí se také možnost zásahu do fáze přepisu mutovaného genu do RNA. Slibná se v tomto ohledu zdá být metoda RNA silencingu neboli RNA interference, kdy je asociována exogenně syntetizovaná molekula siRNA s komplementární částí v mRNA, která je takto zacílena a post-transkripčně je komplexem RISC (RNA-indukovaný silencing komplex) katalyzováno štěpení cílového úseku mRNA. Dochází k post-transkripčnímu silencingu (umlčení) daného genu, tzn., že gen se sice přepisuje, ale jeho mRNA není schopna vytvořit bílkovinný produkt, v případě HD mutovaný huntingtin (Zuccato a kol., 2010).

Nedávné publikace ukazují, že hladina brain derived neurotropic factor (BDNF) koreluje s psychickými, kognitivními a motorickými funkcemi a může posloužit jako biomarker úspěšnosti léčby (Teixiera a kol., 2010). Velkou nadějí jsou látky inhibující excitotoxicitu a vznik HTT agregátů, které přirozeně zvyšují produkci BDNF v mozku a inhibují

mitochondriální dysfunkce vedoucí k rozvoji nemoci. A dále látky zabraňující excitotoxicitě způsobené nadbytkem uvolňovaného glutamátu a zvýšením činnosti NMDA receptoru (např. riluzol, memantin, lamotrigin, remacemid, ifenprodil, blokátory vápníkové signalizace, inhibitory dopaminových drah aj.) (Zuccato a kol., 2010).

Další terapeutické strategie se zaměřují na kaspázovou aktivitu a proteolýzu huntingtinu, opírající se o nedávný objev (Graham a kol., 2006), kdy mutace kaspázového štěpícího místa zabraňuje neurodegeneraci a zlepšuje fenotyp onemocnění u myšího modelu (Zuccato a kol., 2010).

Přesná funkce huntingtinových agregátů nebyla doposud objasněna. Ačkoliv se inkluze jeví mnohdy jako toxické a jejich výskyt koreluje s patologií, novější studie ukazují, že tvorba agregátů může prodloužit život buněk exprimujících mutantní huntingtin. Stále je třeba objasnit a identifikovat vznik různých typů agregátů a jejich otáznou ochrannou nebo toxickou funkci. Přesto jsou výzkumy nových léků zatím zaměřeny převážně na blokaci jejich vzniku. Mutantní huntingtin narušuje energetický metabolismus a buněčné dýchání, což vede ke snížení intracelulární hladiny ATP a podporuje apoptózu, oxidační stres a zvyšuje citlivost neuronů k excitotoxicitě. Další potencionální neuroprotektivní funkci mají proto antioxidanty a látky podporující mitochondriální funkce (např. koenzym Q₁₀, kreatin, cystamin, blokátory MPTP (mitochondrial permeability transition pore)) (Zuccato a kol., 2010).

Předmětem výzkumu je také možnost náhrady odumřelých neuronů embryonálními kmenovými buňkami. Pro vývoj účinných léčiv i terapií je třeba bližší pochopení patofyziologie HD, která je předmětem desítek studií. Vzhledem k nemožnosti studovat některé aspekty nemoci na žijících pacientech roste potřeba zvířecích modelů kopírujících fenotyp HD pro testování fyziologie a rozvoj účinných terapií *in vivo*. Většina léků byla zatím testována pouze pre-klinicky na myších (nebo jiných) modelech a jen zřídka došlo ke klinickému testování pacientů s HD. Rozdíly mezi modelovými zvířaty a člověkem ztěžují predikci účinnosti nových léků. Ačkoliv např. myší modely sdílí některé aspekty fenotypu HD, žádný z nich nevykazuje celé spektrum fenotypů lidské HD. V ideálním případě je pro testování monoterapie s potenciálním léčebným účinkem třeba systematické hodnocení na více než jednom zvířecím modelu (např. model exprimující pouze N-terminální část HTT a full-length model exprimující celou délku HTT) (Zuccato a kol., 2010).

2. Modely Huntingtonovy choroby

U neurodegenerativních onemocnění, kde lze laboratorně vyšetřovat pouze *post mortem* vzorky pacientů, je potřeba vyvinout modelové organismy opravdu vysoká. HD je způsobena mutací pouze jediného genu, proto se nabízí jeho přenos do jiných organismů za účelem vyvolání nemoci a studování jejího vývoje. Za pomoci transgeneze je dnes možno i přes mezidruhové bariéry přenést mutovanou kopii genu z jednoho druhu na jiný a sledovat progresi onemocnění. Transgenní organismy se využívají nejen u neurodegenerativních onemocnění (Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, Huntingtonova choroba), ale i u *diabetes mellitus*, cystické fibrózy nebo ke studiu kardiovaskulárních chorob (Aigner a kol., 2010).

2.1. Chemické modely

První modely HD byly vyvinuty ještě předtím, než byl v roce 1993 identifikován gen způsobující mutaci. Chemické modely fungující na principu excitotoxicity některých aminokyselin pro neurony striata, napodobující neurodegeneraci, jež při HD probíhá v mozku pacientů, byly vyvinuty v 70. letech minulého století. Neurony striata obsahují velké množství glutamátových receptorů, jelikož v této části mozku je glutamát nejběžnějším neurotransmiterem. Aktivací ionotropních glutamátových receptorů dochází k rozsáhlé buněčné smrti neuronů – typickou pro excitační aminokyseliny a podle nich nazývanou excitoxická buněčná smrt. Glutamátové receptory některých HD modelů jsou selektivně zranitelné také 3-nitropropionovou kyselinou, mitochondriálním toxinem ovlivňujícím energetický metabolismus, což naznačuje, že během HD dochází k narušení metabolismu neuronů (Walker 2007). Přímé vstříkávání neurotoxinu - kyseliny kainátové nebo cholinové, do striata hlodavců vyvolává léze, obdobné neurodegeneraci pozorované u pacientů s HD (McGeer a McGeer, 1976). Lze tak odvodit, že excitotoxicita má velký podíl na neurodegenerační apoptóze při HD. Vstříkávání mitochondriálních toxinů – kyseliny malonové a kyseliny 3-nitropropionové, do mozku potkanů napodobuje také behaviorální změny, jaké známe od pacientů s HD, což dokazuje, že mitochondriální dysfunkce mají vliv na patogenezi (Brouillet a kol., 1999). Tyto modely mohou být využity ke studiu

neuroreparačních a neuroprotektivních terapií, nedokáží však věrně reprodukovat patofyziologické mechanismy nemoci vyvolané mutovaným genem (Zuccato a kol., 2010).

2.2. Genetické modely

K expresi mutace způsobující HD bylo geneticky upraveno široké spektrum živočišných druhů. Prvním vyvinutým modelem pro studium HD byla myš (Marsh a kol., 2003). Na modelu myši a *Drosophily* byl objeven vztah délky polyglutaminového řetězce a závažnosti patologie HD (Marsh a kol., 2003). Možná souvislost nástupu neurodegenerace na délce polyglutaminového řetězce byla objevena u háďátka obecného, *Caenorhabditis elegans*, (Faber a kol., 1999). U octomilek, *Drosophila melanogaster*, byla objevena více než 50 % podobnost v genové výbavě s člověkem a plně funkční nervový systém. Lze u nich manipulovat s cizorodými geny a regulovat jejich expresi ve specifické tkáni (Wang a Qin, 2006). HD byla první choroba, která byla na octomilkách modelována. Mouchy exprimující N-terminální fragment huntingtinu se zmnoženými repeticemi CAG trpěly na degeneraci očí, ztrátu hybnosti a sníženou životaschopnost (Gunewardena a kol., 2003). I přes jednobuněčnost představují kvasinky *Sacharomyces cerevisiae* lehce manipulovatelný genetický materiál a lze na tomto modelu studovat faktory způsobující mutace HD (Wang a Qin, 2006).

Ačkoliv i u bezobratlých modelů lze pozorovat jisté projevy HD shodné s člověkem, je pro výzkum stěžejní použití modelů obratlovců, konkrétně savců. Myší modely byly široce používány k odhalování patogeneze i jiných neurodegenerativních poruch mozku (patří sem Alzheimerova nemoc, Parkinsonova nemoc, amyotrofická laterální skleróza aj.) a k rozvoji jejich léčby. Nicméně, většina z těchto myších modelů nevykazuje pro nemoc příznačné patologie mozku a nebyly v nich nalezeny ani apoptické neurony s DNA fragmenty (Yang a kol., 2010). Mnohem zajímavější a perspektivnější z pohledu nalezení možné terapie jsou modely velkých savců.

Přípravou transgenních modelů se zabývá genové inženýrství, které za poslední desetiletí zaznamenalo velký rozvoj. Upravená DNA, která se má do organismu vnést - genový konstrukt, se obvykle skládá ze strukturního genu, příslušného promotoru, markerového genu (díky němuž je snazší expresi genu v daném organismu potvrdit) a terminální sekvence. Zvířecí modely HD dělíme do dvou kategorií. Na modely exprimující N-

terminální fragment, tedy pouze zkrácenou délku HTT genu. Nejčastěji se jedná o první jeden nebo dva exony lidského genu HTT s prodlouženou glutaminovou repeticí (polyQ). Druhou skupinou jsou modely, které exprimují celou délku mutovaného huntingtinu polyQ – tzv. full-length modely (Wang a Qin, 2006).

2.2.1. Genetické metody používané k transgenezi

Pro přípravu zvířecího modelu HD je třeba laboratorně připravit DNA ve formě genového konstrukt, který je vnesen do genomu modelového zvířete. Samotná transgeneze může probíhat několika způsoby, nejpoužívanější jsou DNA mikroinjekce, přenos jader neboli klonování, lentivirová transgeneze, přenos genů spermii a využití nukleáz zinkového prstu (Aigner a kol., 2010).

DNA mikroinjekce

Genový konstrukt je skleněnou kapilárou mikroinjekčně vpraven do oplozených oocytů – embryí ve fázi prvojader (zygot), kdy se zatím mateřská a otcovská genetická informace nespojila a je oddělená. Konstrukt se umísťuje do spermiového prvojádra. Po zákroku se embrya přenesou do vejcovodu náhradních matek. Úspěšnost této metody není vysoká, integrace genů dosahuje pouze několikaprocentní úspěšnosti a svůj vývoj ukončí pouze malá část z velkého počtu embryí (řádově se používají stovky až tisíce). Vzhledem k problematickému a nákladnému odběru embryí u velkých zvířat se tato metoda využívá vzácně (touto metodou byl generován např. dále popsaný model transgenní ovce) a je využívána převážně pro myší modely, u kterých není získání velkého množství embryí tak problematické a finančně náročné a i přes nižší procento úspěšnosti zabudování nové informace do mateřské DNA je DNA mikroinjekce nejrozšířenější metodou generace transgenních myší (Aigner a kol., 2010).

Přenos jader

Spolehlivou metodou transgeneze, používanou hlavně u modelů hospodářských zvířat (ovce, prase), je přenos jader somatických buněk (SCNT, somatic cell nuclear transfer) neboli klonování. Příprava na transgenezi SCNT zahrnuje odběr dárcovských buněk a jejich genetickou modifikaci na buňky transgenní, enukleace zralých oocytů v metafázi II, vpravení dárcovského jádra do cytoplasmy oocytu elektrickými impulzy s následnou *in vitro* kultivací a přenosem embryí do synchronizovaných příjemkyň (Aigner a kol., 2010). Účinnost této

metody se blíží k 10 % živě narozených mláďat z celkového počtu vložených embryí. Úspěšné zabudování transgenů a syntéza mutovaného HTT je prokázána až po narození mláďat z odebrané tkáně. Tato metoda je hojně využívána také z ekonomických důvodů, kdy je oproti mikroinjekcím celý proces méně finančně nákladný (Aigner a kol., 2010).

Lentivirová transgeneze

Tato metoda využívá vlastností virů ze skupiny retrovirů, které mají genetickou informaci zapsanou v RNA a v hostitelské buňce ji zpětně přepisují do DNA, kterou zabudují do genomu hostitele, pomnoží se v ní a buňku poškozují. Napadají buňky ve stádiu metafáze, kdy se buňka dělí. Lentiviry, patřící mezi retroviry, napadají i nedělící se buňky a proto je lze využít k transgenezi již oplozených embryí. Lentivirové vektory jsou vyrobeny nahrazením části jejich genomu novou genetickou informací. Dokážou pronikat do buněk a zabudovat tuto novou informaci do genomu, ale následně buňku již nemohou poškodit. Velikostí lentivirového genomu je omezena i velikost vloženého transgenů, která by neměla přesahovat délku 10 kb. Tato metoda je účinnější, než mikroinjekce DNA a díky menší finanční náročnosti se používá převážně u prasat a skotu (Aigner a kol., 2010). Touto metodou byl také vytvořen model transgenního makaka a Liběchovského miniprasete, popsanych dále.

Přenos genů spermiemi

Metoda SMGT (sperm mediated gene transfer) je založena na schopnosti spermií vázat exogenní DNA a následně ji přenést do vajíčka. Poprvé byla použita u modelu transgenní myši. Genový konstrukt je přidán do kultivačního média ke spermiím, které ho na sebe během několika minut navážou. Při následném oplození oocytů *in vitro* je konstrukt zabudován do embryonální DNA. Tato technika překvapila svou vysokou účinností (až 33 % narozených myší exprimovalo transgen), ale bohužel se jí dlouhou dobu nedařilo úspěšně zopakovat a přesto, že není metoda široce používána, je stále předmětem zkoumání. Zdá se, že vhodný výběr spermií je pro úspěšnost přenosu klíčový a jsou proto snahy zvýšit šanci na úspěch například poškozením membrán spermií nebo vnesení spermií intracytoplasmatickou injekcí do oocytu (Aigner a kol., 2010).

Využití nukleáz zinkového prstu u knock-out modelů

První použití ZFN (zinc-finger nucleases) pro generaci transgenního modelu bylo u modelu potkana s cílenou modifikací – knock-outem. Zinkový prst je součástí řady proteinů, jeho funkcí je vazba proteinů na DNA. Nukleázy rozkládají vazby nukleových kyselin. ZFN použitý k transgenezi potkana byl upraven k vyhledávání konkrétního lokusu genu a v kombinaci s homologní rekombinací lze způsobit cílenou delecí nebo modifikaci. Do embryí byl mikroinjekčně vpraven společně s plasmidem nebo mRNA (Geurts a kol., 2009). Metoda je vhodná pro druhy, u kterých nejsou dostupné klonovací techniky (potkani).

2.2.2. Hlodavčí modely

2.2.2.1. Myši exprimující zkrácenou délku huntingtinu

Prvním modelem myši exprimující zkrácenou délku HTT jsou linie R6. Představují je dvě linie – R6/1 a R6/2, jež byla zároveň prvním a nejstudovanějším myším modelem Huntingtonovy choroby. Linie R6/2 vznikla vložením zkráceného fragmentu o délce 1,9 kb skládajícího se z exonu 1 a promotoru lidského HTT genu se 144 CAG repeticemi do genomu myši R6/2 myši vykazují progresivní neurologický i motorický fenotyp napodobující fenotyp pacientů HD. Objevují se choreické mimovolní pohyby, svalové záškuby, dále myši trpí hyperureózou a vykazují progresivní úbytky hmotnosti. Objem mozku a striata se od 5. týdne věku viditelně snižuje až do 12. - 15. týdne, kdy obvykle nastává smrt. Od 3. týdne věku se také objevují deficity paměti a na testech motorických funkcí (např. na zařízení Rotarod) byl od 5. týdne věku objeven motorický deficit zahrnující ztrátu koordinace, ztíženou pohyblivost a chůzi (Mangiarini a kol., 1996). Linie R6/1 myši disponuje menším počtem CAG repetic a projevuje se méně závažným fenotypem. Obě R6 linie charakterizuje výskyt jaderných inkluzí mutovaného huntingtinu v mozkových neuronech, jejichž počet s progresí nemoci rapidně stoupá (Davies a kol., 1997). Jelikož u obou linií dochází k velice častému nástupu nemoci a její rychlému rozvoji, představují spíše analogii juvenilní formy HD a více než k výzkumu mechanismů raných stádií nemoci a neuropatologie slouží pro testování terapií HD a farmakologické studie (Wang a Qin, 2006).

Linie myši N171-82Q, které exprimují prvních 171 aminokyselin lidského huntingtinu pod kontrolou myšího prionového promotoru s 82 CAG repeticemi, vykazuje podobný behaviorální deficit jako myši R6 linie, včetně ztráty koordinace, třesu, hypokineze a poruch

chůze. Imunohistochemickou reakcí s protilátkou proti prvním 17tim aminokyselinám na N-konci huntingtinu (AP194) byly objeveny intranukleární inkluze a neuritické agregáty N-fragmentů HTT. U současně vyvinuté kontrolní linie (N171-18Q) s 18 CAG repeticemi nebyly agregáty ani jaderné inkluze N-koncového huntingtinu nalezeny. Toto zjištění dokazuje, že N-koncové fragmenty huntingtinu s rozšířeným polyQ jsou neurotoxické a jsou náchylné k vytváření intranukleárních inkluzí a neuritických agregátů. U N171-82Q myši byly často pozorovány malé struktury v neuropilech, reagující na značení s protilátkami AP194 (Schilling a kol., 1999). Podobné shluky mutantního huntingtinu byly pozorovány v neuritech kůry a striata pacientů HD (DiFiglia a kol., 1997). Vzhledem k nižšímu počtu CAG repetic oproti R6/2 linii je nástup příznaků HD opožděn a proto je tento model využíván více ke studiu presymptomatických terapií (Zuccato a kol., 2010).

2.2.2.2. Myši exprimující full-length huntingtin

Doposud bylo vytvořeno několik různých myších modelů exprimujících plnou délku HTT. Na těchto modelech lze lépe sledovat mechanismy neurotoxicity a raná stadia HD (Wang a Qin, 2006). Prvním modelem full-length myši byl IT-15 cDNA klon s patologickým počtem 48 a 89 CAG repetic řízený cytomegalovirovým promotorem. Byl u něho pozorován fenotyp podobný HD s behaviorálním i motorickým deficitem (Brooks a Dunnett, 2012) provázeným neurodegenerací a gliosí ve striatu, mozkové kůře, thalamu a hipokampu (Reddy a kol., 1998).

Později byly k expresi full-length HTT upraveny myši s umělým kvasnicovým chromozomem – YAC linie (Hodgson a kol., 1999). Podle počtu CAG repetic byly linie pojmenované YAC18, 46, 72, 128, přičemž nejvíce studované byly myši YAC128 s jednotným fenotypem napodobujícím fenotyp pacientů HD. U těchto myší byla zjištěna selektivní neuronální degenerace striata a kortexu spolu s motorickými a behaviorálními změnami počínajícími v různém věku (Hodgson a kol., 1999). Imunoreaktivita HTT se postupně rozšiřuje ze striata do kortikálních neuronů, hipokampu a mozečku. Neurodegenerace je provázena motorickými i kognitivními projevy. Myši byly například podrobeny testům na Rotarodu i tzv. Open field testu (pohyb ve volném prostoru) s viditelným deficitem (Hodgson a kol., 1999). V mozku YAC128 myší nebyly objeveny jaderné inkluze typické pro N-koncové fragmenty s rozšířenými polyQ (Van Raamsdonk a kol., 2005).

Další full-length model vytvořila skupina Y. Tanaka (Tanaka a kol., 2006). Myši exprimují podmíněně plnou délku HTT v mozku pod kontrolou prionového promotoru vlivem Tet-transaktivátoru, kdy může být exprese genu zapnuta nebo vypnuta podáním tetracyklinu nebo jeho analogů (např. doxycyklinu). V nepřítomnosti Tet-transaktivátoru vykazují myši fenotyp zahrnující mimovolní pohyby, ataxii, třes, ztrátu koordinace pohybu, progresivní snižování hmotnosti a zkrácenou délku života. Ve striatu a kortexu byly objeveny jaderné inkluze i cytoplasmatické agregáty, zejména jako nahromaděné N-terminální produkty štěpení. Takovýto fenotyp je velmi podobný fenotypu výše popsaných transgenních myší exprimujících N-terminální fragmenty mutovaného HTT. Výsledky naznačují, že proteolytické procesy v neuronech by mohly být součástí patogeneze HD a představují potenciálně atraktivní terapeutický cíl. Tento myší model může být použit pro výzkumy patogenních mechanismů a preklinické terapeutické studie HD (Tanaka a kol., 2006).

Posledním uvedeným příkladovým modelem full-length HTT myší je model s umělým bakteriálním chromozomem (BACHD) nesoucím 97 CAG tripletů (Gray a kol., 2008). Myši vykazují motorický deficit na Rotarodu a selektivní neurodegeneraci striata a kortexu s počátkem již ve 2 měsících věku. V 1 roce věku mají myši pouze malé množství agregátů mutovaného HTT ve striatu a kortexu, což naznačuje, že množství agregovaného huntingtinu není nutně spojeno s pomalu progresivními selektivními patologickými procesy u těchto myší (Yang a kol., 2008). Vzhledem k relativně pozdnímu nástupu neuropatologických příznaků představuje tento model vhodný cíl pro studie patogeneze HD a některé terapeutické studie (Gray a kol., 2008). Jedním z nejspolehlivějších ukazatelů kognitivní dysfunkce je u mnohých myších modelů, včetně YAC a BACHD modelů, schopnost reverzního učení, jelikož u hlodavců tato funkce spadá právě pod řízení mediálního nebo dorzo-mediálního striata (Brooks a Dunnet, 2012).

2.2.2.3. Knock-in myši

Knock-in metoda je cílená inserce, zahrnující vložení kódující proteinové sekvence cDNA na přesný lokus chromozomu. Myší knock-in modely byly vytvořeny inzercí patogenní CAG repetice do endogenního myšího genu HTT na chromozomu 5 (Shelbourne a kol., 1999) nebo nahrazením myšího exonu 1 lidským exonem 1 s polyQ (Ishiguro a kol., 2001).

První typ modelu byl vytvořen vložením úseku 72-80 CAG repetit do endogenního myšského Hdh genu (homolog lidského HD genu). Myši exprimující full-length mutantní HTT vykazovaly abnormální sociální chování i bez zjevné neurodegenerace. Vzhledem k tomu, že psychiatrické změny, včetně podrážděnosti a agrese, jsou běžné u HD pacientů, jsou výsledky v souladu s hypotézou, že některé klinické příznaky HD mohou být způsobeny patologickými procesy, které předcházejí viditelnou neurodegeneraci. Potvrzuje to předpoklad, že účinná léčba HD vyžaduje pochopení těchto dysfunkčních procesů a nejen snahu zabránit předčasné smrti neuronů (Shelbourne a kol., 1999).

Další myši, představující přesné genetické repliky HD, byly vytvořeny cílenou náhradou části genu s malým počtem CAG opakování na homologu lidského HD genu (Hdh) větším počtem CAG repetit v rozmezí, které zapříčiňuje u lidí rozvoj HD. Myši s alelami přibližně 150 CAG jednotek dlouhými vykazují pozdní nástup behaviorálních a neuroanatomických změn. Příznaky zahrnují motorický deficit, poruchy chůze, gliosi a tvorbu neuronových intranukleárních inkluzí s převahou ve striatu. Tento model se liší od prvního popsaného knock-in modelu nejen způsobem vzniku, ale i delší CAG repetit a více závažným fenotypem. Jedná se o první knock-in myšský model HD se zvýšenou imunoreaktivitou na gliový fibrilární kyselý protein ve striatu, což naznačuje, že tyto myši mají neuronální poškození a gliosi, jaké známe z průběhu HD u lidí (Lin a kol., 2000). Knock-in modely mohou usnadnit výzkum raných molekulárních mechanismů HD a objasnit cestu od genotypu k fenotypu HD. Replikují obecné projevy HD včetně kognitivních deficitů a behaviorálních dysfunkcí, jež se u pacientů HD objevují dlouho před prvními známkami onemocnění (Zuccato a kol., 2010).

2.2.2.4. Modely potkanů

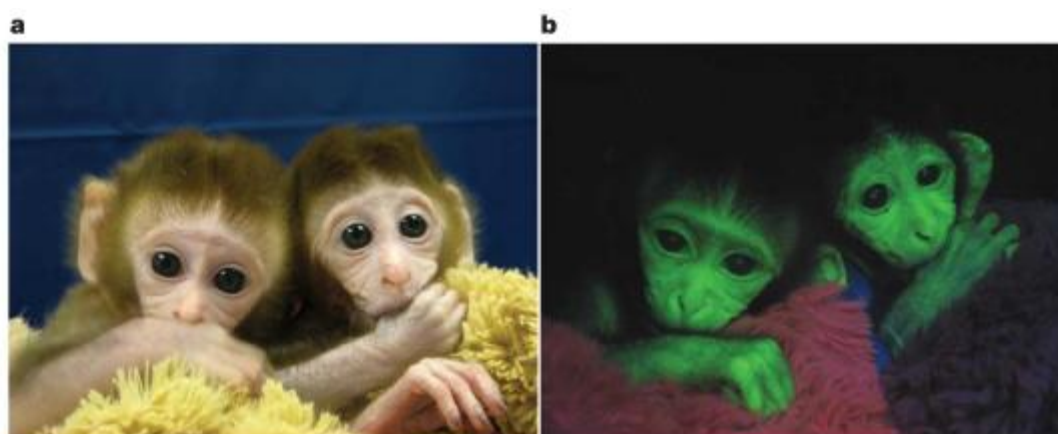
U potkanů je možné využít velkou škálu behaviorálních i motorických testů, které umožní určit rozsah neurologických deficitů a mohou sloužit jako ideální *in vivo* model pro terapeutické postupy. V roce 2008 došlo k úspěšné izolaci potkaních embryonálních kmenových buněk (Buehr a kol., 2008), díky čemuž můžeme vytvořit geneticky přesné modely neurodegenerativních onemocnění včetně HD a výzkum na tomto poli má slibnou budoucnost (Zuccato a kol., 2010).

2.2.3. Modely velkých savců

2.3.2.1. Transgenní model primáta

Díky velice podobným fyziologickým, neurologickým a genetickým vlastnostem mezi lidmi a vyššími primáty mohou lidoopi sloužit jako velmi užitečné modely pro pochopení lidské fyziologie a patofyziologie chorob a pro vývoj terapie. Pro výzkum HD byl vyvinut transgenní model *Makak rhesus* exprimující mutantní huntingtin. Model byl vytvořen injikováním zralých opičích oocytů vysoko titrovaným lentivirem exprimujícím exon 1 lidského genu HTT s 84 CAG repeticemi (HTT-84Q) a lentivirem exprimujícím zelený fluorescenční protein (GFP) pod kontrolou lidského polyubiquitin promotoru do periviteliního prostoru. Po *in vitro* oplození se vyvinulo 89 (ze 108 původních) zygot ve 4-8 buněčná embrya a 30 z nich bylo přeneseno do 8 náhradních matek. Z těchto příjemkyň 75 % (6 z 8) zabřezlo a narodilo se 5 živých mláďat. Z toho dva páry dvojčat byly porozeny císařským řezem. Mláďata (rHD4, rHD5) necelý den po porodu zemřela. Třetí opice (rHD3) zemřela měsíc po porodu. Všechna mláďata exprimovala mutovaný HTT i GFP (*Obr. 1*). V mozku byly následně pozorovány typické projevy HD - jaderné inkluze a agregáty HTT. Opice vykazovaly také typické klinické příznaky HD - dystonii a choreu. Přeživší opice (rHD1, rHD2) nesly 1-2 kopie genu. Zemřelá mláďata (rHD3, rHD4, rHD5) měla 2 a více integračních míst a zřejmě proto mohly vykazovat vážnější fenotypy a zemřely brzy po narození. Opice měly rozdílnou délku polyQ řetězce, konkrétně v rozmezí 27-88 CAG repetit. Uhynulé opice měly dýchací obtíže a vykazovaly motorické deficity. rHD3 opice vykazovala dystonii a choreu od 2. dne a měla polykací obtíže, rHD2 mírné mimovolné pohyby od věku 1 týdne. rHD1 opice s počtem CAG repetit na úrovni zdravého člověka byla bez symptomů se zdála zcela zdravá. Vyšší exprese mutantního HTT je zřejmě spojena s časnými úmrtími. Mutantní HTT byl přítomen i v periferních tkáních mrtvých opic v podobě oligomerů. Úroveň exprese transgenního HTT se v různých tkáních lišila. Western Blot a imunohistochemie prokázaly přítomnost agregátů nebo inkluzí HTT ve striatu a kortexu rHD4 a rHD5. V mozku těchto dvou opic byla exprese HTT vysoká, ale bez významného rozdílu mezi regiony. HTT se v neuronech hromadil v jádrech a tvořil drobné agregáty mimo těla buněk. Výsledky imunohistochemického testu naznačují, že tyto agregáty byly původně lokalizovány v axonech a dendritech a zapojeny v neuronových procesech. Zjištění je v souladu s objevenými agregáty v mozku pacientů HD a myších modelech, u kterých neuropilové HTT

agregáty souvisí s axonální degenerací. Nebyla odhalena žádná zřejmá degenerace striata. Kromě rHD1 byly u všech opic pozorovány motorické dysfunkce různého stupně (tato skutečnost byla dále zkoumána pouze u rHD2 a rHD3). Obě tyto opice vykazovaly různě obtížnou koordinaci pohybu spojenou s choreou nebo dystonií. Četnost a věk nástupu mimovolných pohybů závisely na délce CAG repetice a na počtu integrovaných míst. Závažnost onemocnění byla hodnocena, podobně jako u lidí, na škálové stupnici. Pro opice neexistuje standardizovaná stupnice závažnosti onemocnění, proto bylo hodnocení založeno na stupnici vytvořené pro lidské pacienty HDRS (Huntington's disease rating scale), pouze upravené pro opičí mláďata. 80 je nejvyšší hodnota odrážející nejzávažnější symptomy, hodnoceny byly pouze opice rHD1-3. Časná smrt opic nesoucích vyšší počet kopií transgenu podporuje teorii, že N-terminální mutanty jsou vysoce patogenní. Jelikož jsou obě přeživší opice samci, bude jejich sperma během života shromažďováno a v budoucnu mohou posloužit jako zakladatelé opičí transgenní linie (Yang a kol., 2008).



Obr. 1 - Transgenní HD opice rHD-1 (vlevo) a rHD-2 (vpravo). (a) fotka pořízená při denním světle a (b) fotka pořízená při UV světle (b) fluorescenčně ukazující expresi GFP u HD opic.

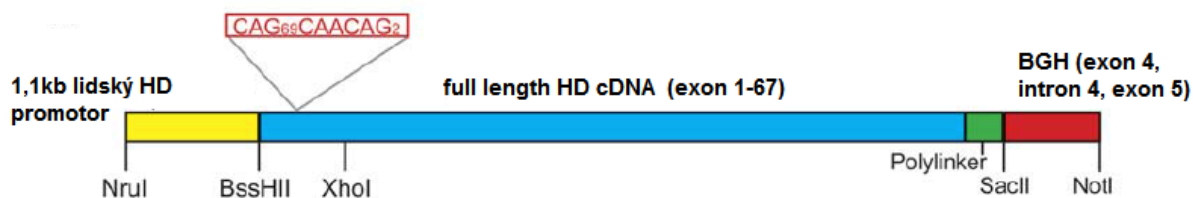
(podle Yang a kol., 2008)

2.2.3.2. Transgenní model ovce

Dalším druhem velkého savce vytvořeného jako model HD je ovce *Ovis aries*. Právě ovce jsou podle mnohých ideálním modelem pro tuto neurodegenerativní poruchu, jelikož jsou dostupné, poměrně učenlivé a dají se vcelku levně chovat ve svém přirozeném prostředí, tedy ve výběhu na pastvě. Žijí déle než 10 let, což je pro studium chronických účinků transgenního HTT důležité. Mohou být ideálním modelem pro farmakologické testy, jejich bazální ganglia a mozková kůra mají stavbu obdobnou lidskému mozku. Lze využívat

dostupné *in vivo* metody k zobrazení mozku (např. PET nebo MRI) a určovat anatomicko-patologické změny ve vztahu k symptomům, což představuje cenný pohled do mechanismu progresu patologických procesů. Ovce také představují vhodný chirurgický model pro testování náhrady buněk nebo dodávky agens pro genovou terapii, jež by mohly pomoci vyřešit terapii HD u lidí (Jacobsen a kol., 2010). V současné době jsou ovce hojně používaným modelem, např. pro studium fetálního a neonatálního vývoje, srdeční patologie, kostní regenerace či jako modely pro stanovení chirurgických postupů pro mnohé operace, včetně oprav aneurysmat nebo srdečních chlopní (Scheerlinck a kol., 2008).

Jacobsen a kol. založili linii šesti transgenních ovcí, které exprimují full-length lidský HTT gen. Ovčí homolog HTT byl izolován pomocí RT-PCR (Real-time polymerase chain reaction), která umožnila diferenciaci lidského transgenu od ovčí wild-type (netransgenní) cDNA. Full-length ovčí transkript obsahoval otevřený čtecí rámec s 9381 nukleotidy, odpovídající délce 3127 aminokyselin, v porovnání s lidskou sekvencí se jedná o 88 % shodu ve složení aminokyselin. Počet CAG opakování na exonu 1 je mezi ovčími plemeny polymorfní (10-17 CAG), překrývá se tedy rozsahem s počtem CAG opakování u zdravých lidí. HD transgenní ovce byly vytvořeny pomocí 11,6 kb dlouhého transgenního fragmentu (Obr. 2) obsahujícího full-length lidskou HTT cDNA navázanou na 1,1 kb lidské genomové DNA bezprostředně před exon 1 obsahující promotor. Pro zvýšení exprese transgenu byl na 3' konec lidské cDNA připojen růstový hormon skotu (BGH) zahrnující exon 4 a exon 5 a intron 5. Vzhledem k tomu, že je HD nepřímo úměrná počtu CAG opakování (Huntington's Disease Collaborative Research Group 1993), byl vybrán CAG trakt se 69 opakováními a zařazen na vhodnou pozici HTT cDNA. Předpokládalo se, že takto dlouhá repetice je dostatečná k rozvoji fenotypu HD, stejně jako je tomu u lidí.



Obr. 2 – schéma transgenního fragmentu obsahujícího full-length lidskou HTT cDNA s exony 1-67 HTT genu připojenou k 5' 1,1 kb fragmentu lidského promotoru. 3' UTR (netransitovaný region) je genomový fragment BGH (hovězí růstový hormon) genu (podle Jacobsen a kol., 2010)

Výsledný transgenní fragment byl v mikroinjekcích vstříkovaný do prvojader jednobuněčných zygot australských Merino ovcí. Ze 413 zygot se vytvořily blastocysty a byly po trojic přeneseny do vejcovodů příjemkyň. Ze 150 živě narozených jehňat zemřelo 16 do 48 hodin od porodu, 7 jehňat se narodilo již mrtvých – ani jedno z nich nebylo transgenní. Ze zbývajících 127 jehňat bylo pouze 6 potvrzeno jako transgenních (tj. 4,7 % úspěšnost). Integrace transgenu byla analyzována fluorescenční *in situ* hybridizací (FISH) metafázních jader, které odhalily jedinečnou integraci transgenu u 5 ze 6 zvířat. U 2 transgenních jehňat byl prostřednictvím PCR odhalen vysoký počet kopií transgenu (9-14) a zároveň u nich byla zjištěna nízká exprese mRNA přepsané z transgenu. Naopak jehňata s 1-8 kopiemi měly mnohem vyšší úroveň exprese HTT mRNA.

Imunologické značení potvrdilo přítomnost substance P (SP) ve striatálních neuronálních axonech vybíhajících do *globus pallidus* a dále potvrdilo přítomnost oddělených segmentů *globus pallidus* (vnitřní a vnější segment) v mozku ovcí. Zapojení striatálních SP-reaktivních axonů do přímých drah bylo objeveno i u člověka. Srovnatelná anatomie ovčích bazálních ganglií s lidským mozkem je výhodou pro srovnávací neuropatologické charakterizace a následnou kvantifikaci progresu choroby v HD transgenní ovčí linii. Imunologické značení se třemi protilátkami (SP, enkefalin a calbindin) neodhalilo ztráty GABAergních neuronů ve striatu ani makro/mikroskopické změny imunoreaktivity přímých a nepřímých neuronových drah bazálních ganglií. Dalším zkoumáním receptorů, které jsou u lidí s HD zranitelné (kanabinoidní receptor typu 1 [CB1] a dopamin-cAMP-regulovaný fosfoprotein 32 [DARPP32] receptor) byly odhaleny mírné neuropatologické změny. Makroskopická analýza *globus pallidus* a *nucleus caudatus* ukázala pokles CB1 imunoreaktivity u 1 měsíc starého transgenního jehněte (o 4,8 % oproti wild-type) a výraznější pokles potom u stejného jehněte ve věku 7 měsíců (o 6,9 %). Hustota axonálních a dendritických procesů v pozorovaných oblastech se u těchto zvířat viditelně snížila, což předpokládá souvislost s nefunkčností CB1 receptorů, která může způsobovat poruchy hybnosti. Nejvýraznější objevenou neuropatologickou změnou byla výrazná ztráta imunoreaktivity DARPP32 v *globus pallidus* (o 28 %) a putamenu (o 7,6 %) u 7 měsíčního jehněte. Obdobný jev nacházíme v presymptomatickém striatu pacientů s HD u D1 dopaminového receptoru. Reakcí s polyQ protilátkami nebyly objeveny žádné jaderné inkluze typické pro HD (Jacobsen a kol., 2010).

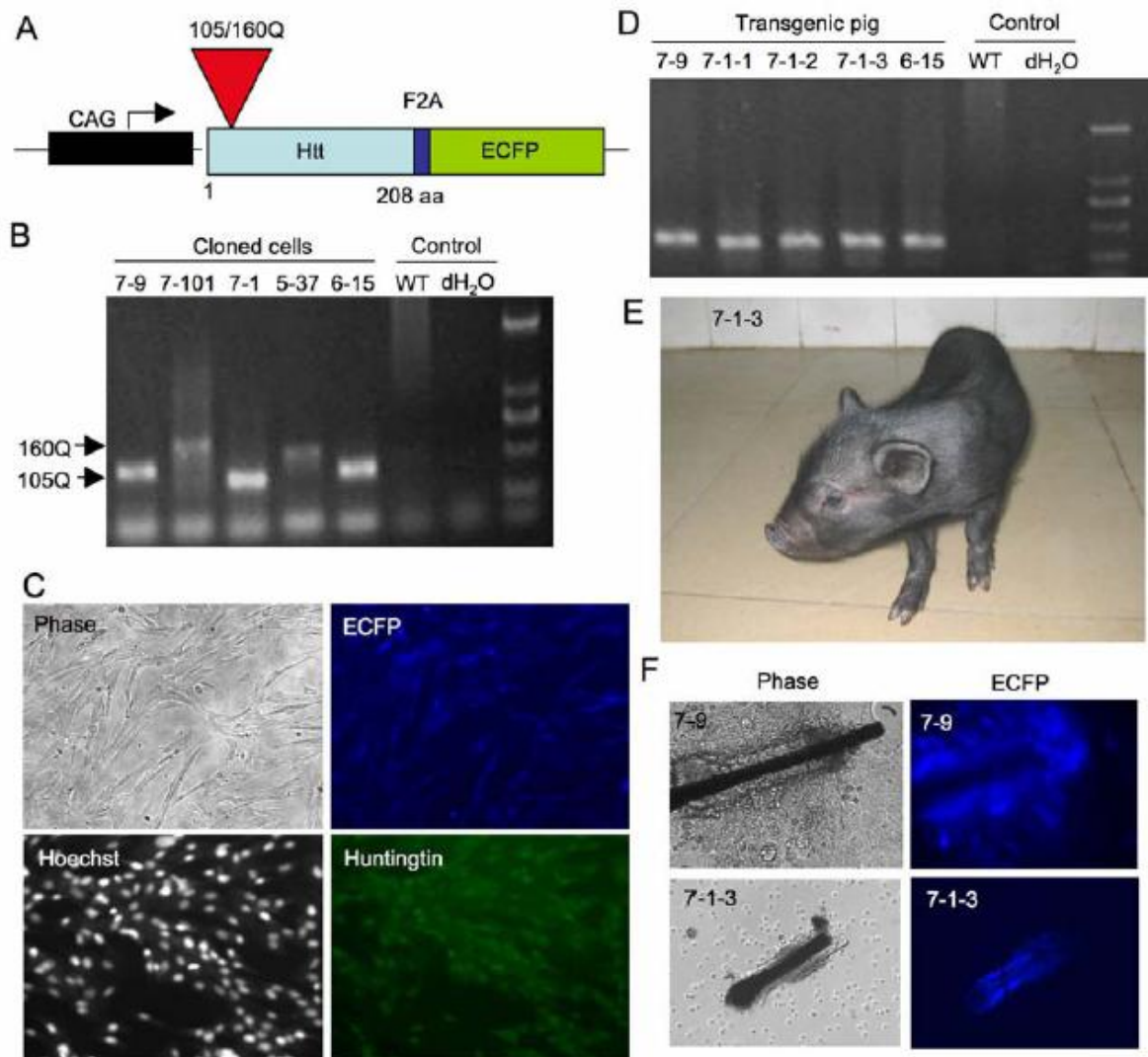
2.2.3.3. Transgenní modely prasat

Prasata jsou hojně využívána k výzkumu lidských onemocnění již po desítky let, v současnosti se uplatňují jako velice užitečné modely neurodegenerativních a genetických onemocnění. Důvodem je lidem velice podobná anatomie, imunologie, neurobiologie, genetika a vývoj orgánů (Aigner a kol., 2010). Odpadá zde etický problém, který provází testování na primátech. Ke snímkování a vyhodnocování výsledků lze použít standardní metody, jako v lidském výzkumu. Pro genomové aplikace je prase díky vysoké homologii sekvencí a chromozomálních struktur s lidskou DNA velice využívaným biomedicínským modelem (Lunney, 2007). Prasata mají na rozdíl od jiných laboratorních modelů poměrně dlouhou životnost (12-15 let), snadno se množí a velice brzy, již v 5-6 měsících, dosahují pohlavní zralosti a mohou se množit. V porovnání s modely primátů je využití prasat podporováno také z ekonomických a etických důvodů (Yang a kol., 2010). V posledních letech byl úspěšně definován prasečí genom, což spolu s rozvojem metod progenetických modifikací usnadnilo vývoj prasečích modelů. Prasečí homolog HTT genu má velký ORF z 9417 nukleotidů kódujících 3139 aminokyselin. Jeho předpokládaná velikost je 345 kDa, což poukazuje na 96% shodu s lidským HTT genem. Počet CAG repetice v prasečím HTT genu je polymorfní – od 8 do 14 CAG, tento počet spadá u lidí do zdravé normy. Stejně jako lidé mají prasata 2 HTT transkripty o délce 11 a 13 kB (Matsuyama a kol., 2000).

První transgenní prasata byla vytvořena metodou mikronukleární mikroinjekce s mutovanou prasečí cDNA, schopnou exprimovat mutovaný huntingtin obdobně jako mutovaná lidská DNA, do prvojader oocytů. Vektorová DNA měla do exonu 1 vloženo 75 CAG repetice pod kontrolou neuronspecifického enolázového potkaního promotoru. Vzhledem k tomu, že je úspěšnost této metody velmi nízká a je potřeba použít stovek až tisíců embryí, se u prasat využívá pouze zřídka. Celková úspěšnost metody je stanovena na 1,24 % (Aigner a kol., 2010). Mnohem spolehlivější metodou transgeneze u prasat je klonování. Běžně se pro modelování HD užívá druh tibetské miniaturní prase, které se svou velikostí těla a orgánů velmi blíží člověku. Tento druh se snadno množí a dosahuje pohlavní dospělosti již v 5 měsících věku. Možnost sledovat transgenní a wild-type jedince ze stejných vrhů nám usnadňuje genetické mapování (Lunney, 2007).

Miniaturní prase exprimující 208 AK HTT genu

Yang a kol. vyvinuli model tibetských miniaturních prasat v roce 2008. Genový konstrukt (*Obr. 3A*) obsahoval fragment prvních 208 aminokyselin lidského HTT s 105Q (N208-105Q) spojený s cyan-fluorescenčním proteinem (ECFP) malým virovým peptidem F2A, který se v savčích buňkách dokáže sám rozštěpit a oddělí fragment N208-105Q a ECFP. Transgeny byly exprimovány pod kontrolou kuřecího β -aktinového promotoru a cytomegalovirového enhanceru, aby se později mohly exprimovat ve všech tkáních. Po transfekci vektoru do primárních fibroblastů embryí elektroporací bylo vybráno celkem pět buněčných linií (*Obr. 3B*) exprimujících transgen a zároveň ECFP (*Obr. 3C*). Vektory byly následně přeneseny metodou přenosu jader do 26 prasnic, z nichž 6 zabřezlo a čtyřem se narodilo 5 živých mláďat. Všechny těchto 5 selat bylo transgenních (*Obr. 3D*) a vzešlo z 2355 embryí linie N208-105Q buněk, embrya z linie N208-160Q buněk se nevyvinula, což naznačuje, že delší polyglutaminový řetězec je toxický a zabraňuje embryonálnímu vývoji. Fibroblasty z narozených selat prokázaly expresi ECFP (*Obr. 3F*). Southern blot analýzou genomové DNA se prokázala existence více kopií transgenu a různý počet integračních míst (3-4). Tři selata zemřela krátce po porodu, jevila se slabá a byla neschopná přibírání na váze. Jedno z nich před smrtí vykazovalo hyperkinezi, podobnou choree u HD pacientů. Takto časná smrt připomíná stejný osud transgenních HD opic exprimujících 83-88 polyQ. Čtvrté sele zemřelo po 25 dnech. Pouze jediné sele přežilo (*Obr. 3E*). Buňky prasete, jež je stále naživu, exprimují ve srovnání s buňkami 4 zemřelých selat nejnižší úroveň HTT se 105polyQ. Úroveň exprese mutantního HTT může přispívat k životaschopnosti transgenních prasat. Pro porovnání byl vytvořen obdobný model transgenních myší stejnými N208-105Q konstrukty. Myši F₁ generace se narodily bez symptomů a živé, zatímco jejich rodiče (zakladatelé linie) zemřely ve věku 5-6 měsíců. V jejich mozku byla objevena exprese transgenního HTT stejně jako u prasat, avšak zobrazovací vyšetření mozku myší neodhalilo u prasat typický výskyt apoptotických neuronů. Nebyly nalezeny ani jaderné fragmenty a to i přes přítomnost kaspáza-3 aktivních buněk, což naznačuje, že různé živočišné druhy reagují na kaspázovou aktivaci odlišně. Zároveň bylo procento kaspázových buněk vyšší u prasat než myší. V prasečím mozku bylo nalezeno více kaspáza-3-positivních neuronů, převážně ve striatu a kůře a pouze tyto neurony vykazovaly apoptózu. Doplňkové vyšetření periferních tkání prasat nepotvrdilo výskyt apoptotických buněk mimo CNS, což naznačuje specifitu neuronální apoptózy obdobnou u lidské HD. Exprese N-terminálních mutantů HTT fragmentů



Obr. 3 Prasečí HD transgenní model (podle Yang a kol., 2010)

A – genový konstrukt N208-105Q

B – klonované buňky, PCR snímek 5 buněčných linií (7-9, 7-101, 7-1, 5-37, 6-15) wild-type (WT) a H₂O kontroly

C – exprese ECFP a HTT v klonovaných buňkách

D – PCR snímek potvrzující expresi transgenu N208-105Q z fibroblastů narozených selat (7-9, 7-1-1, 7-1-2, 7-1-3, 6-15), wild-type (WT) a H₂O kontroly

E – sele 7-1-3

F – fibroblasty selat 7-9 a 7-1-3 exprimující ECFP

urychluje průběh nemoci, což pravděpodobně způsobilo postnatální úmrtí i časnou apoptózu. Ukazuje se, že prasečí neurony jsou více náchylné k toxicitě proteinů v nesprávné konformaci. Vzhledem k delší době březosti v porovnání s myší (113 – 115; 21 dní) může v prenatálním období vzniknout více toxických mutantních proteinů a tím pádem dochází k závažnější neurodegeneraci mozku. Úroveň exprese mutantního HTT také závisí na fázi buněčného cyklu, ve kterém se dárcovské buňky nachází a stavu oocyty při oplození (Yang a kol., 2010).

Miniaturní prase exprimující 548 AK HTT genu

V posledních letech byl v Liběchově vyvinut model miniaturního prasete exprimujícího prvních 548 aminokyselin HTT genu pod kontrolou lidského HTT promotoru. K jeho vytvoření byla zvolena metoda lentivirové transdukce embryí. Pro transgenezi byl připraven lentivirový vektor obsahující N-terminální zkrácenou formu lidského HTT genu nesoucího prvních 548 AK HTT se 145 CAG opakováními (HIV-1-HD-548aaHTT-145Q konstrukt). Transgenní prasata byla generována mikroinjekcemi konstruktů (vektorů) do periviteliního prostoru jednobuněčných embryí (50-100 vektorů na 1 zygotu). Takto časná lentivirová transdukce na počátku embryonální syntézy DNA zvyšuje šanci začlenění transgenu do cDNA. Oplozená embrya byla *in vitro* kultivována do fáze blastocysty, poté byla laparoskopicky vpravena do akceptorových prasnic. Po standardní době těhotenství se v prvním vrhu F₀ generace narodilo 6 selat, z nichž jedna prasnice byla transgenní. Dvě netransgenní selata zemřela brzy po porodu. Podíl transgenních jedinců, vyjádřený jako poměr počtu živě narozených potomků ku počtu transgenních, je zde 16,7 %. F₀ transgenní prasnice byla nakryta netransgenním kancem a ve vzniklé F₁ generaci se narodilo dalších 17 selat, z nichž 5 bylo transgenních. Zárodečný přenos transgenu je 29,4 %. Z 92 narozených selat F₂ generace 73 přežilo (je zde 20,7 % perinatální úmrtnost, která je srovnatelná s perinatální úmrtností wild-type prasat) a 37 z nich bylo transgenních, což představuje 40,2 % transgenní přenos. Podíl transgenních a wild-type selat v této generaci umožnil vytvoření 2 experimentálních skupin, navzájem srovnatelných. Pět F₂ kanců a jedna prasnice vyprodukovali 51 živých wild-type a 30 transgenních selat F₃, perinatální úmrtnost zde byla 14,2 % a míra transgeneze 34,9 %. F₀ transgenní prasnice byla taky spářena s F₁ transgenním kancem za produkce 4 transgenních selat, z nichž nebylo ani jedno homozygotní. Všem narozeným selatům byla provedena biopsie tkání a byla testována exprese transgenního konstruktů metodou PCR. U prvních 3 generací selat byl mutantní HTT gen pomocí FISH analýzy detekován na chromozomu 1. Za předpokladu přítomnosti 2 alel endogenního prasečího HTT integrovala všechna transgenní selata 1 kopii transgenu do svého genomu a navíc PCR analýza ampikonu fragmentu DNA odhalila, že integrovaný transgen obsahuje 124 CAG/CAA repetice namísto původních 145 (Baxa a kol., 2012). Podobné zkrácení počtu polyglutaminových opakování bylo pozorováno u pacientů s HD (Wheeler a kol., 2007). Vývoj a chování všech generací selat se jevil ve srovnání s wild-type jako normální. Transgenní selata se ihned po narození byla schopna postavit a měla stejnou porodní váhu s

netransgenními. Pohlavně dospěla a byla schopna reprodukce v předpokládaném věku 5 měsíců. U F₁ kanců byl pozorován značný pokles plodnosti od věku 12 měsíců do 26 měsíců. Počet spermií v ejakulátu výrazně poklesl (střední hodnota 2,45-3,65.10⁹ spermií v ejakulátu oproti 8,15-12,48. 10⁹ spermií v ejakulátu wild-type). Také klesla schopnost spermií penetrovat cez *zonu pellucidu* vajíčka. V F₀ generaci nebyly pozorovány žádné významné změny chování a motorických funkcí až do věku 40 měsíců a v F₁ generaci do věku 30 měsíců. Vzorky mozku získané ze 4 měsíčního transgenního F₂ prasete byly podrobeny biochemické analýze. Mutované proteinové fragmenty HTT byly nalezeny ve všech oblastech CNS včetně motorické kůry, putamenu, *nucleus caudatus*, hipokampu, hypothalamu, thalamu, mozečku a míchy, v očekávané velikosti 120 kDa. Periferní tkáně včetně tenkého střeva, plic, jater, ledvin, vaječníků a kůže také exprimovaly mutantní HTT protein, zatímco v žaludku, srdci, kosterním svalstvu a slezině byla exprese velmi nízká až nulová. Densitometrickou analýzou bylo prokázáno, že úroveň exprese mutantního HTT v různých oblastech mozku a míchy byly srovnatelné s hladinou endogenního prasečího huntingtinu. V porovnání s wild-type prasetem v experimentálním páru je tato exprese podstatně vyšší. Testem imunoreaktivity s anti-HTT protilátkou byla exprese nejvíce detekována ve striatu. Kortex, *nucleus caudatus* a putamen vykazovaly imunoreaktivitu s převahou v oblasti šedé kůry nad bílou kůrou mozkovou. Nebyl zjištěn žádný rozdíl v intenzitě imunoreakce anti-HTT transgenních a wild-type (Baxa a kol., 2012). Ačkoliv v lidském mozku detekuje tato protilátka jaderné inkluze HTT (DiFiglia a kol., 1997), nebyly zde žádné nalezeny. Výsledky ukázaly, že mutantní protein byl robustněji exprimován v mozku transgenních prasat 10 a 16 měsíců starých. Homogenáty z motorické kůry, putamenu, *nucleus caudatus* a mozečku 16 měsíců starých wild-type a transgenních prasat byly testovány mEM48 protilátkou, jež byla u jiných modelů HD úspěšně použita k detekci jaderných agregátů HTT, ani ty zde však nebyly nalezeny. Imunofluorescenční analýza *nucleus caudatus* a putamenu F₂ wild-type a transgenních prasat ve věku 4, 10 a 16 měsíců, prokázala robustní expresi DARPP32 v neostriálních neuronech a neuropilech. Kvantitativní analýza sourozeneckých párů 16 měsíců starých ukázala, že průměrný počet DARPP32 pozitivních neuronů v mm³ *nucleus caudatus* a putamenu byla nižší u transgenních jedinců, ale rozdíl nebyl významný. Významnější byl fakt, že u wild-type prasat byl signál intenzity DARPP32 v těchto oblastech vyšší než u transgenních. Tyto poznatky je potřeba ověřit u většího počtu experimentálních dvojic (Baxa a kol., 2012). Míra transgeneze a životaschopnost potomků produkovaných lentivirovou transgenezí byla vyšší, než při využití klonovací strategie. Genom lentivirových prasat neovlivňoval přežití a

normálního vývoje, celková perinatální úmrtnost transgenních selat byla 17,2 %, což je číslo velmi blízké perinatální úmrtnosti wild-type prasat. Transgenní HD prasata generovaná prostřednictvím strategie klonování a vložení N-terminální mutantního HTT měla závažný fenotyp a před smrtí vykazovala choreu a přítomnost apoptických buněk v mozku (Yang a kol., 2010).

2.3. Shrnutí využití zvířecích modelů

Buněčné a zvířecí modely HD prokazují, že N-koncové fragmenty HTT s rozšířeným počtem CAG opakování jsou pro modelová zvířata patogenní, protože jsou tyto fragmenty náchylnější k tvorbě nesprávných konformačních proteinů a tvorbě proteolytických agregátů HTT v CNS. U myší jsou fragmenty HTT toxičtější než mutantní protein a působí cytotoxicky na mozkovou tkáň. U myších modelů se často nedaří kopírovat fenotyp typický pro lidskou HD, nevykazují výraznou apoptózu a neurodegeneraci mozku společně s typickým fenotypem HD a navíc, je jejich mozek neporovnatelně menší oproti mozku lidskému. Proto je nutnost vytváření modelů velkých zvířat, tzv. "large animal models", které se člověku podobají fyziologicky, anatomicky (např. velikost a kapacita orgánů), imunologicky a mají s ním porovnatelnou délku života. Bylo vytvořeno několik velkých modelů jako ovce, primáti a prasata. Rozdíl mezi jednotlivými druhy, stejně jako úroveň exprese transgenů, může určit povahu neurologického fenotypu a neurodegenerace. Transgenní opičí model, který exprimuje exon 1 HTT s rozšířeným polyQ, ne však plnou délku genu, vykazuje vážnější neurologické příznaky než HD myší model s vysokou expresí N-terminálního mutantního HTT. Opice také vykazuje významnou axonální patologii, jakou známe od pacientů s HD (Yang a kol., 2008). Transgenní ovce exprimující mutantní full-length HTT s repeticí 73 polyQ může přežít jako zdravý jedinec, pouze vykazuje mírný pokles v aktivitě středních ostnitých neuronů striata a nízká exprese mRNA (Jacobsen a kol., 2010). Velký rozvoj zaznamenaly v posledních letech modely transgenních miniaturních prasat, která jsou snadno množitelná, mají dlouhý život a v mnoha aspektech se člověku podobají více, než jiné modely. Pro jejich využití mluví také ekonomická a etická výhodnost jejich používání. Prasečí indukované pluripotentní kmenové buňky (iPCs) jsou novým zdrojem pro generování geneticky modifikované prasečích modelů (Cheng a Xiao, 2009).

Závěr

Z přehledu nejpoužívanějších zvířecích modelů Huntingtonovy choroby v této práci lze usoudit, že v posledních letech zaznamenala věda velký pokrok ve vývoji modelů neurologických onemocnění, zejména použitím genetických modifikací. Vzhledem k tomu, že Huntingtonova choroba je stále neléčitelná, a protože je výzkum omezen pouze na *post mortem* vzorky pacientů, je potřeba využití genetických zvířecích modelů vysoká. Každý použitý modelový druh má svá úskalí a hodí se pro výzkum odlišných aspektů HD. Podle metody použité k vytvoření modelu a také typu transgenu vykazují modelová zvířata různě závažné fenotypy, které však nemusí vždy přesně kopírovat fenotyp HD u lidí. Modely velkých zvířat jsou zvláště užitečné, svou velikostí a stavbou mozku jsou blízko člověku a lépe napodobují neuropatologické procesy onemocnění a vykazují obdobné fenotypy s pacienty HD. Navíc, možné testování nových léčiv a potenciálních terapeutických postupů je mnohem bezpečnější na modelech, u kterých velikost mozku (a těla) odpovídá lidskému organismu. Využití těchto modelů pro další výzkum, vedoucí k lepšímu pochopení patogenity a mechanismů nemoci, má obrovský potenciál a dává naději na brzký vývoj účinné terapie zpomalující nebo zastavující HD.

Reference

- Aigner, B., Renner, S., Kessler, B., Klymiuk, N., Kurome, M., Wünsch, A., Wolf, E. 2010. Transgenic pigs as models for translational biomedical research. *J Mol Med* 88. 653–664.
- Albin, R.L., Young, A.B., Penney, J.B., Handelin, B., Balfour, R., Anderson, K.D., Markel, D.S., a kol. 1990. Abnormalities of striatal projection neurons and N-methyl-D-aspartate receptors in presymptomatic Huntington's disease. *N Engl J Med* 322. 1293–1298.
- Ayala, A., Venero, J.L., Cano, J., Machado, A. 2007. Mitochondrial toxins and neurodegenerative diseases. *Front Biosci* 12. 986–1007.
- Andrew, S.E., Goldberg, Y.P., Kremer, B., Telenius, H., Theilmann, J., Adam, S., Starr, E., Squitieri, F., Lin, B., Kalchman, M.A. 1993. The relationship between trinucleotide (CAG) repeat length and clinical features of Huntington's disease. *Nat Genet* 4. 398–403.
- Aylward, E.H., Sparks, B.F., Field, K.M., a kol. 2004. Onset and rate of striatal atrophy in preclinical Huntington disease. *Neurology* 63. 66–72.
- Baxa, M., Hruska-Plochan, M., Juhas, S., Vodicka, P., Pavlok, A., Juhasova, J., Miyanochara, A., Nejime, T., Klima, J., Macakova, M., Marsala, S., Weiss, A., Kubickova, S. 2012. A Transgenic Minipig Model of Huntington's Disease. *JHD* 2(1) 47-68
- Björkqvist, M., Fex, M., Renstrom, E., Wierup, N., Petersen, A., Gil J, Bacos K, Popovic N, Li JY, Sundler F, Brundin P, Mulder H. 2005. The R6/2 transgenic mouse model of Huntington's disease develops diabetes due to deficient beta-cell mass and exocytosis. *Hum Mol Genet* 14. 565–574.
- Björkqvist, M., Wild, E.J., Thiele, J., Silvestroni, A., Andre, R., Lahiri, N., Raibon, E., Lee, R.V., Benn, C.L., Soulet, D., Magnusson, A., Woodman, B., Landles, C., Pouladi, M.A., Hayden, M.R., Khalili-Shirazi, A., Lowdell, M.W., Brundin, P., Bates, G.P., Leavitt, BR, Moller T, Tabrizi SJ. 2008. A novel pathogenic pathway of imine activation detectable before clinical onset in Huntington's disease. *J Exp Med* 205. 1869–1877.
- Bracci, E., Centonze, D., Bernardi, G., Calabresi, P. 2002. Dopamine excites fast-spiking interneurons in the striatum. *J Neurophysiol* 87. 2190–2194.
- Brooks, S.P., Dunnett, S.B. 2012. Cognitive deficits in animal models of basal ganglia disorders. *BRB* 92. 29-40.
- Brouillet, E., Conde, F., Beal, M.F., Hantraye, P. 1999. Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals. *Progress in Neurobiology* 59. 427–468
- Bruyn, G.W. 1968. Huntington's chorea: historical, clinical and laboratory synopsis. In *Handbook of Clinical Neurology*. Volume 6. Edited by: Vinken PJ, Bruyn GW. Elsevier Amsterdam. 298-378.
- Buehr, M., Meek, S., Blair, K., Yang, J., Ure, J., Silva, J., McLay, R., Hall, J., Ying, Q.L., Smith, A. 2008. Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts. *Cell* 135. 1287–1298.
- Davies, S.W., Turmaine, M., Cozens, B.A., DiFiglia, M., Sharp, A.H., Ross, C.A., Scherzinger, E., Wanker, E.E., Mangiarini, L., Bate,s G.P. 1997. Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell* 90. 537–548.
- DiFiglia, M. 1990. Excitotoxic injury of the neostriatum: a model for Huntington's disease. *Trends Neurosci* 13. 286–289.

- DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K.O., Davies S.W., Bates, G.P., Vonsattel, J.P., Aronin, N. 1997. Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science* 277. 1990–1993.
- Engelsen, B. 1986. Neurotransmitter glutamate: its clinical importance. *Acta Neurol Scand* 74. 337–355.
- Faber, P.W., Alter, J.R., MacDonald, M.E., Hart, A.C. 1999. Polyglutaminemediated dysfunction and apoptotic death of a *Caenorhabditis elegans* sensory neuron. *Proc Natl Acad Sci USA* 96. 179–184.
- Faull, R.L.M., Waldvogel, H.J., Nicholson L.F.B., Synek, B.J.L. 1993. The distribution of GABA_A benzodiazepine receptors in the basal ganglia in Huntington's disease and in quinolinic acid lesioned rats. *Prog Brain Res* 99. 105–123.
- Ferrante, R.J., Kowal, N.W., Richardson, E.P. 1991. Proliferative and degenerative changes in striatal spiny neurons in Huntington's disease: a combined study using the section-Golgi method and calbindin D28k immunocytochemistry. *J Neurosci* 11. 3877–3887.
- Fredholm, B.B., Ijzerman, A.P., Jacobson, K.A., Klotz, K.N., Linden, J. 2001. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* 53. 527–552.
- Geurts, A.M., Cost, G.J., Freyvert, Y., Zeitler, B., Miller, J.C., Choi, V.M., Jenkins, S.S., Wood, A., Cui, X., Meng, X., Vincent, A., Lam, S., Michalkiewicz, M., Schilling, R., Foeckler, J., Kalloway, S., Weiler, H., Ménoret, S., Anegón, I., Davis, G.D., Zhang, L., Rebar, E.J., Gregory, P.D., Urnov, F.D., Jacob, H.J., Buelow, R. 2009. Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. *Science* 325(5939). 433.
- Gianfriddo, M., Melani, A., Turchi, D., Giovannini, M.G., Pedata, F. 2004. Adenosine and glutamate extracellular concentrations and mitogen-activated protein kinases in the striatum of Huntington transgenic mice. Selective antagonism of adenosine A2A receptors reduces transmitter outflow. *Neurobiol Dis* 17. 77–88.
- Gil, J.M., Rego, A.C. 2008. Mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease. *Eur J Neurosci* 27. 2803–2820.
- Gomez-Tortosa, E., MacDonald, M.E., Friends, J.C., et al. 2001. Quantitative neuropathological changes in presymptomatic Huntington's disease. *Ann Neurol* 49. 29–34.
- Graham, R.K., Deng, Y., Slow, E.J., Haigh, B., Bissada, N., Lu, G., Pearson, J., Shehadeh, J., Bertram, L., Murphy, Z., Warby, S.C., Doty, C.N., Roy, S., Wellington, C.L., Leavitt, B.R., Raymond, L.A., Nicholson, D.W., Hayden, M.R. 2006. Cleavage at the caspase-6 site is required for neuronal dysfunction and degeneration due to mutant huntingtin. *Cell* 125. 1179–1191.
- Gray, M., Shirasaki, D.I., Cepeda, C., Andre, V.M., Wilburn, B., Lu, X.H., Tao, J., Yamazaki, I., Li, S.H., Sun, Y.E., Li, X.J., Levine, M.S., Yang, X.W. 2008. Full-length human mutant huntingtin with a stable polyglutamine repeat can elicit progressive and selective neuropathogenesis in BACHD mice. *J Neurosci* 28. 6182–6195.
- Gunawardena, S., Her, L.S., Bruschi, R.G., Laymon, R.A., Niesman, I.R., Gordesky-Gold, B., Sintasath, L., Bonini, N.M., Goldstein, L.S. 2003. Disruption of axonal transport by loss of huntingtin or expression of pathogenic polyQ proteins in *Drosophila*. *Neuron* 40. 25–40.
- Hamilton, J.M., Murphy, C., Paulsen, J.S. 1999. Odor detection, learning, and memory in Huntington's disease. *J Int Neuropsychol Soc*. 5(7). 609–615.

Hayden, M., Martin, W., Stoessel, A., Clark, C., Hollenberg, S., Adam, M.J., Ammann, W., Harrop, A., Rogers, J., Ruth, T., Sayre, C., Pate B.D. 1986. Positron emission tomography in the early diagnosis of Huntington's disease. *Neurology* 36. 888-894.

Heinsen, H., Rub, U., Bauer, M. 1999. Nerve cell loss in the thalamic mediodorsal nucleus in Huntington's disease. *Acta Neuropathol Berl* 97. 613–622.

Hodgson, J.G., Agopyan, N., Gutekunst, C.A., Leavitt, B.R., LePiane, F., Singaraja, R., Smith, D.J., Bissada, N., McCutcheon, K., Nasir, J., Jamot, L., Li, X.J., Stevens, M.E., Rosemond, E., Roder, J.C., Phillips, A.G., Rubin, E.M., Hersch, S.M., Hayden, M.R. 1999. A YAC mouse model for Huntington's disease with full-length mutant huntingtin, cytoplasmic toxicity, and selective striatal neurodegeneration. *Neuron* 23. 181–192.

Huntington's disease Collaborative Research Group. 1993. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* 72. 971–983.

Huntington Study Group. 1996. Unified Huntington's Disease Rating Scale: reliability and consistency. *Mov Disorders* 11. 136-142.

Cha, J.H., Kosinski, C.M., Kerner, J.A., Alsdorf, S.A., Mangiarini, L., Davies, S.W., Penney, J.B., Bates, G.P., Young, A.B. 1998. Altered brain neurotransmitter receptors in transgenic mice expressing a portion of an abnormal human huntington disease gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 95. 6480–6485.

Cheng, L., Xiao, L. 2009. Pig induced pluripotent stem cells: a new resource for generating genetically modified pigs. *Regen Med* 4(6). 787-789.

Ishiguro, H., Yamada, K., Sawada, H., Nishii, K., Ichino, N., Sawada, M., Kurosawa, Y., Matsushita, N., Kobayashi, K., Goto, J., Hashida, H., Masuda, N., Kanazawa, I., Nagatsu, T. 2001. Age-dependent and tissue-specific CAG repeat instability occurs in mouse knock-in for a mutant Huntington's disease gene. *J. Neurosci. Res.* 65. 289–297.

Jacobsen, J.C., Bawden, C.S., Rudiger, S.R., McLaughlan, C.J., Reid, S.J., Waldvogel, H.J., MacDonald, M.E., Gusella, J.F., Walker, S.K., Kelly, J.M., Webb, G.C., Faull, R.L.M., Rees, M.I., Snell, R.G. 2010. An ovine transgenic Huntington's disease model. *Hum Mol Genet* 19. 1873–1882.

Jeste, D.V., Barban, L., Parisi, J. 1984. Reduced Purkinje cell density in Huntington's disease. *Exp Neurol* 85. 78–86.

Kim, M.W., Chelliah, Y., Kim, S.W., Otwinowski, Z., Bezprozvanny, I. 2009. Secondary structure of Huntingtin amino-terminal region. *Structure* 17. 1205–1212.

Kremer, H.P., Roos, R.A., Dingjan, G.M., Bots, G.T., Bruyn, G.W., Hofman, M.A. 1991. The hypothalamic lateral tuberal nucleus and the characteristics of neuronal loss in Huntington's disease. *Neurosci Lett* 132. 101–104.

Kumar, P., Kalonia, H., Kumar, A. 2010. Huntington's disease: pathogenesis to animal models. *Pharmacological reports* 62. 1-14. ISSN 1734-1140.

Kwan, W., Träger, U., Davalos, D., Chou, A., Bouchard, J., Andre, R., Miller, A., Weiss, A., Giorgini, F., Cheah, C., Möller, T., Stella, N., Akassoglou, K., Tabrizi, S.J., Muchowski, P.J. 2012. Mutant huntingtin impairs immune cell migration in Huntington disease. *J Clin Invest* Dec 3. 122(12). 4737-47

Lunney, J.K. 2007. Advances in swine biomedical model genomics. *Int J Biol Sci* 3. 179–184.

Macdonald, V., Halliday, G.M., Trent, R.J., McCusker, E.A. 1997. Significant loss of pyramidal neurons in the angular gyrus of patients with Huntington's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* 23. 492–95.

- Mangiarini, L., Sathasivam, K., Seller, M., Cozens, B., Harper, A., Hetherington, C., Lawton, M. et al. 1996. Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell* 87. 493–506.
- Manyam, B.V., Giacobini, E., Colliver, J.A. 1990. Cerebrospinal fluid acetylcholinesterase and choline measurements in Huntington's disease. *J Neurol* 237.281–284.
- Margolis, R.I., Ross, C.A. 2003. Diagnosis of Huntington's Disease. *Clinical Chemistry* 49:10. 1726-1732.
- Markianos, M., Panas, M., Kalfakis, N., Vassilopoulos, D. 2005. Plasma testosterone in male patients with Huntington's disease: relations to severity of illness and dementia. *Ann Neurol* 57. 520–25.
- Marsh, J.L., Pallos, J., Thompson, L.M. 2003. Fly models of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 12 (2). 187–193.
- Matsuyama, N., Hadano, S., Onoe, K., Osuga, H., Showguchi-Miyata, J., Gondo, Y., Ikeda, J.E. 2000. Identification and characterization of the miniature pig Huntington's disease gene homolog: evidence for conservation and polymorphism in the CAG triplet repeat. *Genomics* 69. 72–85.
- McGeer, E.G., McGeer, P.L. 1976. Duplication of biochemical changes of Huntington's chorea by intrastriatal injections of glutamic and kainic acids. *Nature* 263. 517–519.
- Mizuno, H., Shibayama, H., Tanaka, F., et al. 2000. An autopsy case with clinically and molecular genetically diagnosed Huntington's disease with only minimal non-specific neuropathological findings. *Clin Neuropathol* 19. 94–103.
- Myers, R.H., Vonsattel, J.P., Paskevich, M.A., Kiely, D.K., Stevens, T.J., Cupples, L.A., Richardson, E.P. Jr., Bird, E.D. 1991. Decreased neuronal and increased oligodendroglial densities in Huntington's disease caudate nucleus. *J Neuropathol Exp Neurol*. 729-742.
- Oliva, D., Carella, F., Savoardo, M., Strada, L., Giovannini, P., Testa, D., Filippini, G., Caraceni, T., Girotti, F. 199. Clinical and magnetic resonance features of the classic and akinetic-rigid variants of Huntington's disease. *Arch Neurol* 50. 17-19.
- Paulsen, J.S. 2011. Cognitive Impairment in Huntington's Disease: Diagnosis and Treatment. *Curr Neurol Neurosci Rep* 11. 474–483.
- Paulsen, J.S., Magnotta, V.A., Mikos, A.E. et al. 2006. Brain structure in preclinical Huntington's disease. *Biol Psychiatry* 59(1). 57–63.
- Peavy, G.M., Jacobson, M.W., Goldstein, J.L., et al. 2010. Cognitive and functional decline in Huntington's disease: Dementia criteria revisited. *Move Disord*. 25(9):1163–1169
- Purdon, S.E., Mohr, E., Ilivitsky, V., Jones, B.D. 1994. Huntington's disease: pathogenesis, diagnosis and treatment. *J Psychiatry Neurosci*. Nov;19(5). 359-367.
- Ramaswamy, S., McBride, J.L., Kordover, J.H. 2007. Animal models of Huntington's disease. *ILAR J*. 48. 356–373.
- Reddy, H.P., Maya, W., Danilo, A.T. 1999. Recent advances in understanding the pathogenesis of Huntington's disease. *Trends Neurosci* 22. 248–254.
- Reiner, A., Anderson, K.D. 1990. The patterns of neurotransmitter and neuropeptide co-occurrence among striatal projection neurons: conclusions based on recent findings. *Brain Res Brain Res Rev* 15. 251–265.

- Reynolds, G.P., Pearson, S.J. 1987. Decreased glutamic acid and increased 5-hydroxytryptamine in Huntington's disease brain. *Neurosci Lett* 78. 233–238.
- Roberts, T.J. 2005. 3-Nitropropionic acid model of metabolic stress: assessment by magnetic resonance imaging. *Methods Mol Med* 104. 203–220.
- Roos, R.A. 2010. Huntington's disease: a clinical review. *Orphanet J Rare Dis*. 5(1):40.
- Roth, J., Klempíř, J., Židovská, J. 2006. Huntingtonova nemoc. *Postgraduální medicína* 5. 517-522.
- Scheerlinck, J.-P.Y., Snibson, K.J., Bowles, V.M., Sutton, P. 2008. Biomedical applications of sheep models: from asthma to vaccines. *Trends Biotechnol* 26. 259–266.
- Shelbourne, P.F., Killeen, N., Hevner, R.F., Johnston, H.M., Tecott, L., Lewandoski, M., Ennis, M., Ramirez, L., Li, Z., Iannicola, C., Littman, D.R., Myers, R.M. 1999. A Huntington's disease CAG expansion at the murine Hdh locus is unstable and associated with behavioural abnormalities in mice. *Hum Mol Genet* 8. 763–774.
- Smith, Y., Bennett, B.D., Bolam, J.P., Parent, A., Sadikot, A.F. 2004. Synaptic relationships between dopaminergic afferents and cortical or thalamic input in the sensorimotor territory of the striatum in monkey. *J Comp Neurol* 344. 1–19.
- Spargo, E., Overall, I.P., and Lantos, P.L. 1993. Neuronal loss in the hippocampus in Huntington's disease: a comparison with HIV infection. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 56. 487–491.
- Stoy, N., Mackay, G.M., Forrest, C.M., et al. 2005. Tryptophan metabolism and oxidative stress in patients with Huntington's disease. *J Neurochem* 93. 611–23.
- Tanaka, Y., Igarashi, S., Nakamura, M., Gafni, J., Torcassi, C., Schilling, G., Crippen, D., Wood, J.D., Sawa, A., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Borchelt, D.R., Ross, C.A., Ellerby, L.M. 2006. Progressive phenotype and nuclear accumulation of an amino-terminal cleavage fragment in a transgenic mouse model with inducible expression of full-length mutant huntingtin. *Neurobiology Disease* 21. 381–391.
- Teixeira, A.L., Barbosa, I.G., Diniz, B.S., Kummer, A. 2010. Circulating levels of brain-derived neurotrophic factor: correlation with mood, cognition and motor function. *Biomarkers of Medicine*. 6. 871–87.
- Van Raamsdonk, J.M., Murphy, Z., Slow, E.J., Leavitt, B.R., Hayden, M.R. 2005. Selective degeneration and nuclear localization of mutant huntingtin in the YAC128 mouse model of Huntington disease. *Hum Mol Genet*. 14. 3823–3835.
- Van Raamsdonk, J.M., Gibson, W.T., Pearson, J., Murphy, Z., Lu, G., Leavitt, B.R., Hayden, M.R., 2006. Body weight is modulated by levels of full-length Huntingtin. *Hum Mol Genet*. 15. 1513–1523.
- Van Raamsdonk, J.M., Murphy, Z., Selva, D.M., Hamidizadeh, R., Pearson, J., Petersen, A., Björkqvist, M., Muir, C., Mackenzie, I.R., Hammond, G. L., Wayne Vogl, A., Hayden, M. R., Leavitt, B. R. 2007. Testicular degeneration in Huntington disease. *Neurobiology of Disease* 26. 512–520.
- Vonsattel, J.P., Myers, R.H., Stevens, T.J. 1985. Neuropathologic classification of Huntington's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 44. 559–577.
- Vonsattel, J.P. 2008. Huntington disease models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol* 115. 55-69.
- Walker, F.O. 2007. Huntington's Disease. *Semin Neurol* 27(2). 143-150.
- Wang, L.H., Qin, Z.H. 2006. Animal models of Huntington's disease: implications in uncovering pathogenic mechanisms and developing therapies. *APS* 27(10). 1287-1302.

- White, R.F., Vasterling, J.J., Koroshetz, W.J., Myers, R. 1992. Neuropsychology of Huntington's disease. RF White, ed. *Clinical syndromes in adult neuropsychology: the practitioners handbook*. London: *Elsevier Amsterdam* 213-251.
- Wong, P.T., McGeer, P.L., Rossor, M., McGeer, E.G. 1982. Ornithine aminotransferase in Huntington's disease. *Brain Res* 231. 466–471.
- Yang, D., Wang, C.E., Zhao, B., Li, W., Ouyang, Z., Liu, Z., Yang, H., Fan, P., O'Neill, A., Gu, W., Yi, H., Li, S., Lai, L., Li, X.J. 2010. Expression of Huntington's disease protein results in apoptotic neurons in the brains of cloned transgenic pigs. *Hum Molec Genet.* 19(20). 3983-3994.
- Yang, S.H., Cheng, P.H., Banta, H., Piotrowska-Nitsche, K., Yang, J.J., Cheng, E.C., Snyder, B., Larkin, K., Liu, J., Orkin, J., Fang, Z.H., Smith, Y., Bachevalier, J., Zola, S.M., Li, S.H., Li, X.J., Chan, A.W. 2008. Towards a transgenic model of Huntington's disease in a nonhuman primate. *Nature* 453. 921–924.
- Yin, H.H., Knowlton, B.J. 2006. The role of the basal ganglia in habit formation. *Nat Rev Neurosci* 7. 464–476.
- Zuccato, C., Cattaneo, E. 2007. Role of brain-derived neurotrophic factor in Huntington's disease. *Prog Neurobiol* 81. 294–330.
- Zuccato, C., Valenza, M., Cattaneo, E. 2010. Molecular Mechanisms and Potential Therapeutical Targets in Huntington's Disease. *Physiological Reviews* 90. 905–981.