

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Nikola Butalová

Vzájemný vztah mutovaného huntingtinu a pre-rakovinového stadia u savčích buněk

Interplay between mutated huntingtin and precancerogenous status in mammalian cells

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Mgr. Monika Baxa

Praha, 2014

Prohlášení

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

V Praze dne 12. května 2014

.....

Nikola Butalová

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala své vedoucí práce Mgr. Monice Baxa za ochotu, trpělivost a odborné vedení při tvorbě této práce. Také bych ráda poděkovala své rodině a blízkým za morální podporu.

Abstrakt

Huntingtonova choroba je závažné dědičné onemocnění, které způsobuje odumírání nervových buněk. Nemoc postihuje jedince okolo 40. roku života. Projevuje se mimovolními pohyby končetin a progresivní demencí. Toto onemocnění je v současné době neléčitelné a vždy končí smrtí, která nastává do 15 let od projevů prvních příznaků. Na konci 20. století byl pozorován zvláštní vztah mezi Huntingtonovou chorobou a maligní neoplazií, který poukazuje na nižší výskyt rakoviny mezi pacienty s tímto neurodegenerativní onemocněním oproti běžné populaci. Za ochranný účinek proti vývoji rakoviny u těchto osob je pravděpodobně zodpovědná expandovaná sekvence CAG úseku. Pro kvalitní studium této choroby bylo velmi důležité vytvoření vhodného experimentálního modelu, který bude svými vlastnostmi nejvíce podobný člověku. Tímto modelem by mohlo být transgenní miniprase nesoucí lidský mutovaný protein huntingtin – tgHD prase. Pro studium rakoviny byl také vytvořen model miniprasete vykazující dědičný výskyt maligních kožních lézí – MeLiM prase. Tyto dvě specifické linie miniprasat byly zkříženy a narodila se selata jak s melanomem, tak i transgenní s mutovaným huntingtinem, ale také selata, která byla současně transgenní a měla melanom. Navíc ve stejném vrhu byla i zvířata netransgenní a bez melanomů, která mohou sloužit jako kontroly k experimentálním zvířatům. Je možné, že studium kříženců tgHD a MeLiM podhalí zjevný vztah mutovaného huntingtinu a rakoviny.

Klíčová slova

Huntingtin, rakovina, Huntingtonova choroba

Abstract

Huntington's disease is a serious hereditary disorder that causes mortification of neurons. The disease affects individuals around the age of 40. Its characteristics are involuntary movement of the limbs and a progressive dementia. This disorder is currently without any treatment and always ends with patient dying within a period of 15 years after the first symptoms are discovered. Special relation between Huntington's disease and malign neoplasia was observed at the end of the 20th century. This relation shows lower degree of cancer among the patients with this neurodegenerative disorder compared to the general population. An expanded sequence of a CAG section probably protects these persons against advancement of cancer. Creation of an applicable experimental model with characteristic highly resembling human body was necessary for superior research of this disease. This model can be represented by a transgene mini pig carrying a mutated protein huntingtin - tgHD pig. Another model of a mini-pig showing hereditary occurrence of malign lesions - MeLiM pig was created to research cancer. These two specific lines of mini-pigs were crossbred resulting in not only piglets with melanoma and transgene piglets with mtHTT but also transgene piglets having melanoma at the same time. Furthermore the same farrow had also no-transgene animals and animals without melanoma. These can be used as a cross-check regarding experimental animals. It is possible that a research of the tgHD and MeLiM cross-breeds would reveal obvious relation between mtHTT and cancer.

Key words

Huntingtin, cancer, Huntington's disease

Seznam zkratek

BDNF	brain-derived neurotrophic factor; neurotrofin
CAA	cytosin - adenosin - adenosin
CAG	cytosin - adenosin - guanin
DDR	DNA damage response pathway; odpověď na poškození DNA
HA	dědičná ataxie
HD	Huntingtonova choroba
HIP-1	huntingtin interacting protein; protein interagující s huntingtinem
HTT	huntingtin
MB	melanoblastom
MeLiM	Melanoblastoma-bearing Libechov Minipig; prasečí model s kožním melanomem
mtHTT	mutovaný huntingtin
NH ₂ konec	aminoskupinový konec
p53	protein p53
PCD	programovaná buněčná smrt
polyQ	polyglutaminový úsek
Q	glutamin
SBMA	spinobulbární muskulární atrofie

tgHD	transgenní s mutovaným huntingtinem
wt	wild-type; zdravý
wtHTT	wild-type huntingtin

Obsah

Úvod	9
1. Huntingtonova choroba	11
1.1 Historie Huntingtonovy choroby	11
1.2 Charakteristika Huntingtonovy choroby.....	12
2. Rakovina	14
2.1 Buněčná smrt	15
2.1.1 Apoptóza.....	16
2.1.2 Nekróza.....	16
3. Vztah mutovaného huntingtinu a pre-rakovinových savčích buněk	17
3.1 Spojitost mezi Huntingtonovou chorobou a rakovinou (?)	17
4. Prasečí modely Huntingtonovy choroby a rakoviny	22
4.1 Transgenní model miniprasete	22
4.2 Melanomový model miniprasete	25
5. Možné studium vzájemného vztahu mutovaného huntingtinu a rakoviny	28
Závěr.....	29
Reference	30

Úvod

Huntingtonova choroba (HD) je velmi vážné autozomálně dominantně dědičné onemocnění způsobené mutací genu, který se nachází na čtvrtém lidském chromosomu (Gusella a kol., 1983). Tato mutace představuje zmnožení CAG repetice nad určitý počet. Nemoc postihuje osoby bez rozdílu pohlaví, projevuje se nedobrovolnými pohyby a progresivními poruchami kognice a psychiky. V České republice trpí Huntingtonovou chorobou přibližně 1000 osob (z výroční zprávy 2011 - Společnost pro pomoc při Huntingtonově chorobě, www.huntington.cz/o-nas/vyrocnizpravy/vyrocnizprava-sphch-2011.html). Je nutné si uvědomit, že díky 50% šanci zdědit mutovaný gen je mnohem více lidí v riziku a Huntingtonova choroba může být u těchto osob ještě diagnostikována.

Rakovina zahrnuje širokou skupinu chorob, jejichž charakteristickým společným znakem je nekontrolovatelný růst a dělení buněk. Příčiny vzniku rakoviny jsou různé. Toto onemocnění postihuje různé orgány či tkáně a jeho prevalence je rok od roku vyšší. V současné době jsou léčitelné jen některé typy tohoto onemocnění, přičemž léčba je spojená s velkým psychickým i fyzickým vypětím pacientů.

Před více než 20 lety bylo poprvé poukázáno na nižší výskyt rakoviny mezi pacienty s HD oproti běžné populaci (Sørensen a Fenger, 1992). Touto teorií se začali zabývat zvláště dánští a švédští vědci, kteří vytvořili dvě stěžejní populační studie zabývající se danou problematikou (Sørensen a kol., 1999; Ji a kol., 2012).

Důležitým krokem při vývoji terapií je vytvoření adekvátního zvířecího modelu, na němž by bylo možné studovat příčiny a průběh onemocnění a následně samozřejmě testovat léky, léčebné postupy a sledovat jejich účinek. Na Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR v Liběchově byl vytvořen model transgenního miniprasete s inzertovaným lidským mutovaným huntingtinem (Baxa a kol., 2013) a také model miniprasat projevující dědičný výskyt maligního melanomu (Horák a kol., 1999). Tyto dva modely byly zkříženy za účelem získání experimentální linie transgenních HD miniprasat vykazujících dědičný výskyt melanomu.

Cílem této bakalářské práce je přehledně a stručně zformulovat doposud známé poznatky týkající se vzájemného vztahu mezi Huntingtonovou chorobou a rakovinou. V první části této práce je stručně vysvětlena problematika HD a rakoviny, druhá část je věnována populačním studiím, které poukazují na souvislost mezi HD a rakovinou. V poslední části jsou popsány experimentální modely miniprasat a stručně naznačena hypotéza o vztahu těchto dvou onemocnění a jejím možném prověření na křížencích prasečích modelů HD a kožního melanomu.

1. Huntingtonova choroba

1.1 Historie Huntingtonovy choroby

Huntingtonova choroba, také známá jako Huntingtonova chorea, byla poprvé popsána jako „taneční mánie“ v roce 1374. Termín chorea použil poprvé Paracelsus (1493-1541), jímž definoval pohybovou poruchu, která vzniká v centrálním nervovém systému. Následující roky nebyla podstata nemoci pochopena a lidé s Huntingtonovou chorobou (HD) byli kvůli svalovým křečím a trhavým pohybům považováni za posedlé ďáblem (Zuccato a kol., 2010).

První přesný popis choroby pojmenovaný *On Chorea* byl sepsán v roce 1872 americkým lékařem Georgem Huntingtonem. Tato krátká a neoficiální zpráva byla publikována ten samý rok v časopise *The Medical and Surgical Reporter* ve Filadelfii (Zuccato a kol., 2010). Ve své práci Huntington uvádí detailní popis pohybů, které jsou pro nemoc typické. Dále zmiňuje, že nemocí trpí převážně lidé tmavé pleti a přiklání se k teorii, která tvrdí, že choroba je způsobena funkční poruchou mozečku (Huntington, 2003).

Alice Wexler napsala v roce 2008 knihu *The Woman who walked into the sea*, ve které přiblížila život s HD v 19. století (Wexler, 2008). Charles B. Davenport vytvořil ve 20. letech 19. století doposud největší studii rodin s HD (Zuccato a kol., 2010). V následujících letech vědci zjistili, že část mozku, ve které buňky odumírají jako první a v největším počtu je nukleus caudatus (ocasaté jádro). V 50. letech 20. století diagnostikoval HD doktor Amerigo Negrette u velké skupiny lidí, kteří žili kolem jezera Maracaibo ve Venezuele. Díky této komunitě byl v roce 1983 objeven gen zodpovědný za Huntingtonovu chorobu (The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993).

1.2 Charakteristika Huntingtonovy choroby

Huntingtonova choroba je dědičné autozomálně dominantně přenosné neurodegenerativní onemocnění, s typickými příznaky jako je porucha pohybu, chování, emocionální poruchy a následná demence. Toto onemocnění je v současné době neléčitelné. HD se obvykle projevuje ve 4. až 5. dekádě života, po dobu následujících 10 až 20 let se nemoc radikálně zhoršuje a končí smrtí (The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993).

V počátečních stádiích je HD spojována s progresivními emocionálními, duševními a poznávacími poruchami. V pozdějších stádiích je nemoc charakterizována motorickými poruchami, progresivní demencí a postupným zhoršováním mentálních procesů v oblasti porozumění, uvažování, úsudku a paměti (Bates a kol., 2002).

HD je způsobena mutací v genu nazývaném huntingtin (HTT), nacházejícím se na krátkém raménku chromozomu 4 (Gusella a kol., 1983). Tato mutace představuje zmnožení trinukleotidu CAG (cytosin - adenosin - guanin), který je kodonem pro aminokyselinu glutamin (Q). Proto se taky setkáváme s pojmenováním polyQ sekvence. Polyglutaminový řetězec vzniká poblíž NH₂ konce HTT (The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993). „Zdravý“, čili „wt“ huntingtin má počet CAG repetice v rozmezí 6-26. Jestliže se CAG v repetici opakuje 36 a více krát, způsobuje onemocnění. Prevalence HD je 4 - 10 případů na 100 000 v populacích Západoevropského původu (Zuccato a kol., 2010).

wtHTT je důležitou molekulou pro přežití. Na mnohobuněčné úrovni je wtHTT nutný pro kompletní vývoj embrya, zvláště před vytvořením neurální trubice (Duyano a kol., 1995). wtHTT také řídí produkci neurotrofinu BDNF, což je malý dimerní protein široce exprimovaný v mozku savců, který je důležitý pro funkci striatálních neuronů a činnost kortiko-striatálních synapsí (Zuccato a Cattaneo, 2007). Další funkcí wtHTT je účast na regulaci synaptické aktivity neuronů, kde interaguje s cytoskeletem a se synaptickými váčky proteinů, které jsou nepostradatelné pro exo- a endocytózu (Smith a kol., 2005). wtHTT se zúčastňuje vezikulárního transportu (Landles a Bates, 2004). Nemutovaný huntingtin působí také jako anti-apoptický protein. Blokuje tvorbu apoptického komplexu, zamezuje aktivitě kaspázy-3

(Rigamonti a kol., 2000) a také inhibuje aktivitu kaspázy-9 (Rigamonti a kol., 2001). Za protektivní efekt, který zabraňuje apoptóze, je zodpovědný úsek proteinu mezi 63 a 548 aminokyselinou (Rigamonti a kol., 2000). wtHTT interaguje s pro-apoptickým proteinem HIP-1, tato interakce redukuje buněčnou smrt. HIP-1 protein se patrně podílí na patogenezi HD (Hackam a kol., 2000). Tvorba agregátů, které se dlouho považovaly za příčinu odumírání neuronů je připisována mutovanému huntingtinu (Zuccato a kol., 2010). Mutovaný huntingtin, váží se na mitochondrie, ovlivňuje jejich pohyb v buňkách a také jejich metabolickou aktivitu (Orr a kol., 2008). Patogeneze HD pravděpodobně souvisí jak se ztrátou funkce wtHTT, tak se získáním „nové“ funkce mutovaného HTT (Landles a Bates, 2004).

Věk nástupu onemocnění obecně souvisí s délkou polyQ sekvence - čím více CAG repetit, tím dříve se HD projeví (Langbehn a kol., 2010). Dle Djoussé (Djoussé a kol., 2003) věk nástupu onemocnění závisí také na vzájemné interakci expandovaných a neexpandovaných CAG repetit na zdravé a mutované alele. Zvýšení počtu normálních opakování CAG na zdravé alele pravděpodobně zmírňuje projevy choroby u osob s vysokým počtem repetit (Djoussé a kol., 2003). O pár let později bylo zjištěno, že počet opakování CAG repetit na normální alele, interakce mezi expandovanou a normální alelou nebo přítomnost druhé mutované alely neovlivňuje věk nástupu motorických projevů (Lee a kol., 2012).

2. Rakovina

Rakovina neboli maligní neoplazie je široká skupina chorob, jejichž charakteristickou vlastností je nekontrolovatelný růst a dělení buněk. Tímto procesem vznikne nádor, který je buď benigní, nebo maligní. Benigní, neboli nezhoubné nádory, nezakládají další ložiska a vyznačují se omezeným růstem. Maligní nádory jsou zhoubné, vykazují se tvorbou metastáz, což jsou vzdálená ložiska nádorových buněk, která se vytváří v okolních tkáních. Do vzdálenějších tkání se rakovinné buňky šíří lymfatickým systémem nebo krevním řečištěm.

Příčin vzniku rakoviny existuje nespočetně. Mezi nejčastější faktory ovlivňující rozvoj tohoto onemocnění se řadí tabák, nedostatečná výživa, alkohol, obezita, infekční agens, znečištění životního prostředí a sluneční záření (Anand a kol., 2008). Naopak protektivní účinky poskytuje konzumace dostatečného množství ovoce a zeleniny, dále vitamínů, koření a čajů - zvláště katechinů obsažených v zeleném a černém čaji, celozrnných potravin a neméně důležitou složkou zdravého životního stylu je pravidelný pohyb (Anand a kol., 2008).

Mezi obecné znaky představující složitost vzniku nádoru patří následujících 6 základních změn v buněčné fyziologii (Hanahan a Weinberg, 2011):

- udržování proliferačních signálů
- obejití faktorů tlumících růst
- vzdorování vůči indukci buněčné smrti
- nekontrolovatelná schopnost dělení
- indukce angiogeneze
- aktivace invaze a metastáze

Onkogeneze je geneticky podmíněný proces vzniku nádorové tkáně. Rovnováha buněčných populací je udržována pomocí procesů proliferace, diferenciace a apoptózy.

To, zda nádor vznikne nebo ne, závisí na schopnosti organismu usmrtit buňky, které způsobí svůj nekontrolovatelný růst a dělení.

2.1 Buněčná smrt

Jednou z nejdůležitějších vlastností mnohobuněčného organismu je schopnost regulovat buněčný růst, diferenciaci a neméně významnou buněčnou smrt. Každá buňka má ve své genetické informaci naprogramováno, kdy má zemřít. Pokud je tato informace nějakým způsobem narušena, může docházet k mnohým defektům a nemocem, mezi které patří i rakovina (Martin a Green, 1995).

Geny regulující buněčnou smrt se dělí na represory a induktory. Represory jsou geny, jejichž exprese zabraňuje buněčné smrti. Opačným způsobem fungují induktory, které buněčnou smrt navozují (Martin a Green, 1995). Induktorem apoptózy je například nadměrná exprese proteinu HIP-1 v buňkách (Hackman a kol., 2000). Mezi induktory patří také protein p53 (Hackman a kol., 2000). Exprese proteinu p53, podobně jako exprese proteinu HIP-1 souvisí s Huntingtonovou chorobou (Steffan a kol., 2000).

Zda bude buňka žít nebo zemře, nezáleží pouze na buňce samotné, ale také na signálech, které přicházejí od okolních buněk (Raff, 1992). Existuje mnoho důvodů, kvůli kterým buňky obdrží signál, aby zemřely. Častou příčinou je situace, kdy funkce buňky již není zapotřebí nebo naopak, když buňka svou funkci ztratí. Dále stav, kdy je buňka napadena, například virem, a je pro organismus nebezpečná (Martin a Green, 1995) a nespočet jiných důvodů.

Buněčná smrt je v podstatě souhrn procesů, které se v buňce odehrávají na konci jejího života. Smrt buněk lze kategorizovat na programovanou buněčnou smrt, pod kterou spadá i apoptóza (Martin a Green, 1995), a nekrózu. Termín apoptóza není synonymem pro programovanou buněčnou smrt (Alles a kol., 1991), ačkoli někteří autoři uvádí, že význam těchto dvou termínů je totožný. Programovaná buněčná smrt (PCD) je nejednoznačný termín označující smrt buněk zprostředkovanou intracelulárním programem (Engelberg-Kulka a kol., 2006). Během vývoje spáchá spousta buněk PCD, při vývoji nervového systému umírá tímto typem smrti až 50 % buněk (Dekkers a kol., 2013). U mnohobuněčných organismů se lze setkat s tím, že je apoptóza považována za programovou buněčnou smrt (<http://www.apoptosisinfo.com/>).

2.1.1 Apoptóza

Apoptóza je vysoce regulovaný proces, který hraje velmi důležitou roli v udržování homeostázy organismu. Může být vyvolána vnitřními i vnějšími signály. Mnoho lidských chorob můžeme přičíst právě poruchám apoptózy. Pokud apoptóza probíhá nadměrně, má významnou souvislost s Huntingtonovou chorobou, Parkinsonovou chorobou, vývojovými vadami a mnoha dalšími onemocněními. V opačné situaci, při níž apoptóza neprobíhá dostatečně, může dojít k rozvoji nádorového bujení a spoustě dalších poruch, včetně již zmíněných vývojových vad.

2.1.2 Nekróza

Nekróza je termín označující neprogramovanou smrt buněk a živých tkání. Pokud buňky zemřou touto cestou, je pro imunitní systém velmi obtížné takovéto buňky fagocytovat, protože buňky podstupující nekrózu nevysílají dostatek buněčných signálů, které nabádají okolní fagocyty k pohlcení buněk. Příčin, které vyvolávají nekrózu, existuje mnoho. Může být způsobena infekcí, toxiny, zářením a spoustou dalších faktorů. Nekróza má na organismus téměř vždy negativní dopad.

Následkem nekrózy jsou aktivovány různé receptory, které negativně ovlivňují integritu buněčné membrány a vedou k vylití obsahu buňky do mezibuněčného prostoru (Proskuryakov a kol., 2003). Nekrotické buňky tímto způsobem vyvolávají zánět.

3. Vztah mutovaného huntingtinu a pre-rakovinových savčích buněk

Za neregulovaný buněčný růst je zodpovědná mutace v genech, které kontrolují buněčnou diferenciaci a proliferaci. Důležitým faktorem je také rychlost buněčné smrti podílející se rovněž na kontrole růstu buněk (Martin a Green, 1995). Pokud buňka získá mutaci genu, který ovlivňuje PCD nebo nabude schopnosti tvořit vlastní faktory umožňující její přežití, uniká vlivu okolních buněk a začíná nekontrolovatelně růst bez omezení (Martin a Green, 1995), což vede ke vzniku rakovinného bujení.

3.1 Spojitost mezi Huntingtonovou chorobou a rakovinou (?)

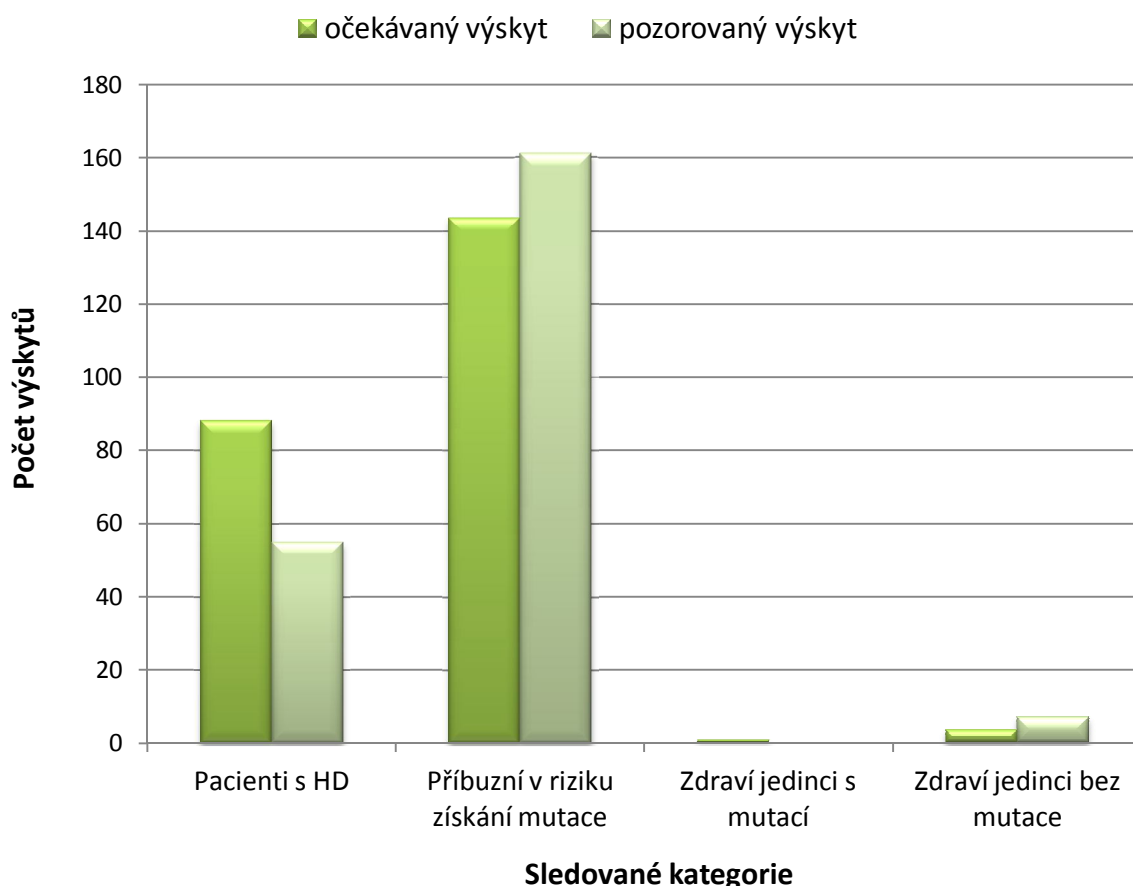
Nižšího výskytu rakoviny u osob trpících HD si jako první všimli vědci Sven Asger Sørensen a Kristen Fenger z Kodaňské univerzity. V roce 1992 sepsali publikaci *Causes of death in patients with Huntington's disease and in unaffected first degree relatives*, ve které zkoumali příčiny úmrtí dánských pacientů s HD a jejich zdravých příbuzných prvního stupně v porovnání s obecnou dánskou populací (Sørensen a Fenger, 1992). Sledované osoby byly vybrány z celostátního rejstříku pro Huntingtonovu chorobu na Ústavu lékařské genetiky v Kodani. Skupina 677 osob nebyla rozdělena na muže a ženy, neboť by výsledná čísla ukazující příčinu smrti byla příliš malá, aby mohl být pozorován rozdíl mezi pohlavími.

Ukázalo se, že nejčastější primární příčinou smrti u osob postižených HD je pneumonie, neboli zápal plic. Příbuzní prvního stupně umírali nejčastěji na kardiovaskulární onemocnění a také na již zmíněnou pneumonii. Základní příčinou úmrtí osob s HD byla dle očekávání právě Huntingtonova choroba. Z výzkumu také vyplynulo, že podíl sebevražd u osob s touto chorobou byl vyšší než u sledované dánské populace ve stejném roce. Dalším důležitým výstupem této studie byl fakt, že v porovnání se skupinou dánské populace stejného věku jen velmi malé procento pacientů s HD zemřelo na rakovinu (Sørensen a Fenger, 1992).

Hypotéza, že u dánské populace poukazuje na nižší výskyt rakoviny mezi osobami postiženými HD byla potvrzena o několik let později (Sørensen a kol., 1999). Sledována byla skupina 694 pacientů s HD, o kterých byla dostupná data získána z dánského registru pro Huntingtonovu chorobu na Kodaňské univerzitě za období let 1943-1993. Jako kontrolní skupina bylo vybráno 695 zdravých příbuzných s 50% pravěpodobností mutace v HTT. Informace o výskytu rakoviny mezi pacienty byly získány prostřednictvím dánského onkologického registru (Sørensen a kol., 1999).

Studované osoby byly rozděleny do čtyř skupin. Byl vypočten očekávaný výskyt nádorů u jednotlivých skupin a porovnán se skutečností (viz Graf 1).

Porovnání výskytu rakoviny u osob s HD a "zdravých" jedinců



Graf 1. Porovnání výskytu rakoviny u osob s HD a „zdravých“ jedinců. Ze získaných výsledků vyplynulo, že pozorovaný výskyt rakoviny u pacientů s HD a nositelů mutovaného genu pro HD je nižší, než by se dle výpočtů očekávalo. „Zdravými“ jedinci se rozumí jedinci bez mutace v huntingtin genu. *Zpracováno dle Sørensen a kol., 1999.*

Ve skupině pacientů s HD byla rakovina pozorována u 55 jedinců, přičemž očekávaný počet osob, u kterých se předpokládal výskyt rakoviny, byl 88. Nebyly pozorovány žádné nádory nervového systému, mozku, štítné žlázy, kostí či pojivové tkáně. Ve skupině příbuzných v riziku získání mutace v genu kódující HTT, kde se předpokládalo, že jenom 7 % sledovaných osob jsou nosiči HD genu, byl výskyt rakoviny očekáván v 143,7 případech, ale rakovina byla zjištěna u 161 osob. Třetí skupinu tvořili zdraví jedinci, u kterých byla nalezena mutace v genu pro huntingtin. Mezi těmito jedinci nebyl zjištěn žádný výskyt rakoviny, ačkoliv očekáván byl v 0,6 případu. Do poslední skupiny spadalo 118 jedinců, u kterých nebyla nalezena mutace. V této skupině byl očekávaný výskyt rakoviny 3,5 případu, avšak pozorováno jich bylo 7.

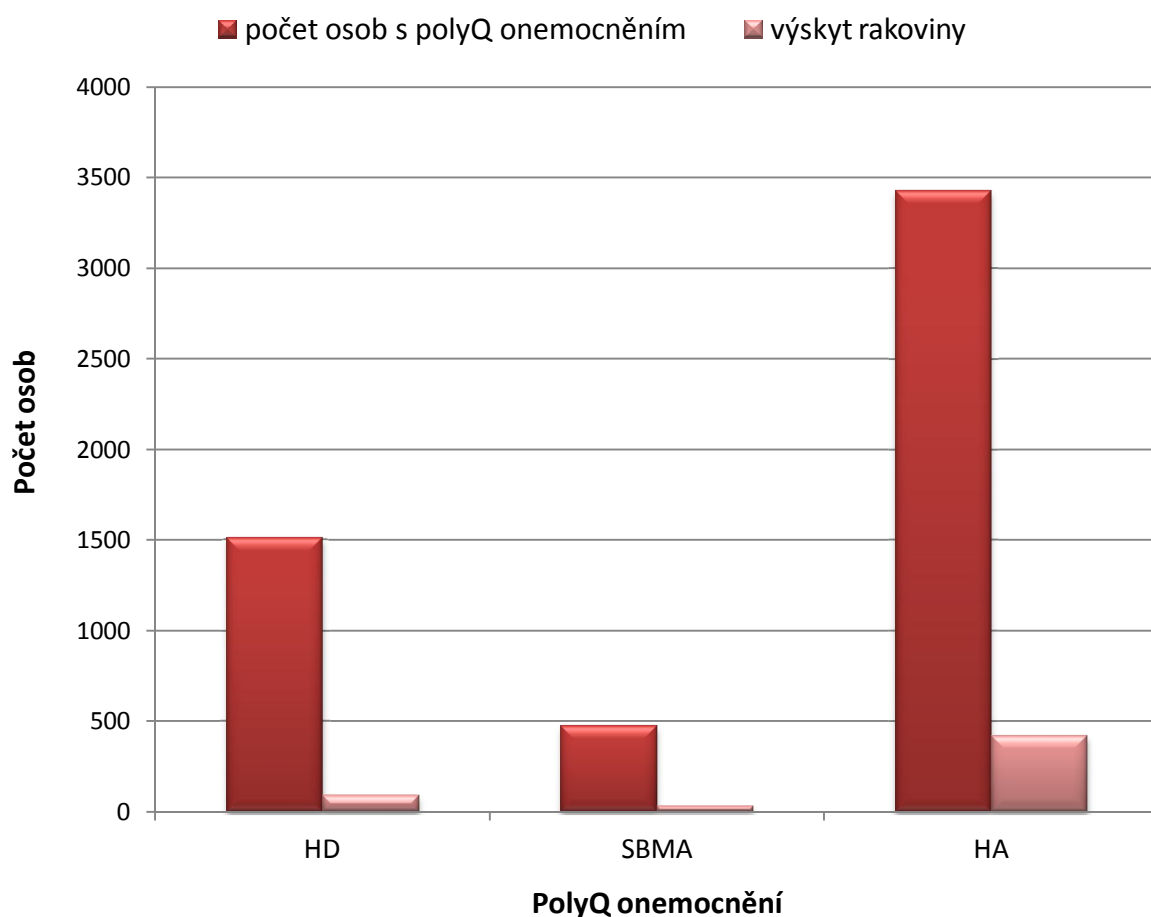
Jelikož je HD způsobena polyQ sekvencí a nemocí způsobených expanzí glutaminové repetice je více, zaměřili se švédští vědci na studium spojitosti expanze polyQ sekvence a vzniku rakoviny (Ji a kol., 2012). Mezi zkoumanými onemocněními byla Huntingtonova choroba (HD), spinobulbární muskulární atrofie (SBMA) a dědičná ataxie (HA).

Data o pacientech byla získána z propouštěcích a ambulantních registrů Švédské nemocnice. Údaje o pacientech byly spojeny s daty ve Švédském onkologickém registru, aby byly pokryty všechny dostupné informace. Výskyt rakoviny byl zkoumán dříve, než byla diagnostikována polyQ choroba. Tento postup byl použit kvůli eliminaci vedlejších negativních vlivů, jakou jsou například léky, které by mohly být podávány pacientů s polyQ chorobami, či změna stravy. Riziko nádorového výskytu bylo zjišťováno také v závislosti na věku u pacientů s HD a SBMA. Pacienti s HA nebyli diagnostikováni touto věkovou analýzou, protože vykazovali velmi odlišný věk nástupu symptomů, jenž byl způsoben různou délkou CAG repetice mezi jednotlivci. Přítomnost nádorů byla zkoumána také mezi „zdravými“ rodiči pacientů, kvůli zjištění, zda je výskyt rakoviny ovlivněn samotným polyQ úsekem, či zde hrají roli další faktory, jako například životní prostředí. Termínem „zdraví rodiče“ rozumíme rodiče pacientů s polyQ onemocněním, u nichž nebylo toto onemocnění zjištěno.

Během sledovaného období bylo nalezeno 1510 pacientů s HD, 471 s SBMA a 3425 jedinců s HA. V průběhu sledovaného období se rakovina vyvinula u 91 osob s HD, u 34 pacientů s SBMA a u 421 pacientů s HA. Celková očekávaná míra výskytu rakoviny byla značně nižší u osob s polyQ chorobami (viz Graf 2). Celkový výskyt rakoviny byl nižší před

diagnostikování polyQ onemocnění a také byl nižší téměř ve všech zkoumaných částech těla. Riziko vzniku benigních nádorů u pacientů s polyQ chorobami bylo také nižší než u obecné populace, avšak u osob s HD bylo toto snížení značnější. Pacienti s HD a SBMA mladší než 60 let vykazovali nižší výskyt rakoviny než osoby nad 60 let. U čtyř pacientů, kterým bylo méně než 40, byla zjištěna rakovina (u dvou byl diagnostikován nádor mozku, další pacient měl melanom a poslední trpěl nádorem štítné žlázy). Celkový výskyt rakoviny u „zdravých“ rodičů byl srovnatelný s obecnou populací.

Porovnání výskytu rakoviny u osob s polyQ onemocněními a "zdravých" jedinců



Graf 2. Porovnání výskytu rakoviny u osob s polyQ onemocněními a „zdravých“ jedinců. Ze získaných dat je zřejmé, že pozorovaný výskyt rakoviny u osob s polyQ onemocněními je nižší, než by se dle výpočtů očekávalo. „Zdravými“ jedinci se rozumí jedinci bez mutace v huntingtinu genu. *Zpracováno dle Ji a kol., 2012.*

Tato studie tedy také potvrzuje myšlenku nižšího výskytu rakoviny u pacientů s chorobami způsobenými expanzí polyQ úseku. Ochranu pacientů s těmito chorobami zřejmě navozuje právě sama rozšířená polyQ sekvence. Jelikož je mezi pacienty sníženo také riziko vzniku benigních nádorů, lze předpokládat, že expandovaná polyQ sekvence má protektivní účinek i proti nezhoubným nádorům. Vysvětlením může být skutečnost, že maligní a benigní nádory mají mnoho společného (Lazebnik, 2010).

4. Prasečí modely Huntingtonovy choroby a rakoviny

Prase se jako laboratorní zvíře využívá již několik desítek let. Dožívá se 12 - 15 let, snadno se rozmnožuje, doba březosti trvá 113 - 115 dní a rodí vysoké počty selat. V porovnání s mláďaty hlodavců, masožravců a jiných kopytníků je vývoj novorozeného selate, včetně mozku, nejvíce podobný vývoji lidského novorozence (Lind a kol., 2007). Selata dosahují puberty v 5. - 6. měsíci, selata miniprasat v 3. - 4. měsíci (Lind a kol., 2007). Hmotnost prasete, velikost orgánů, fyziologie a imunologie jsou velice podobné těm lidským. Díky těmto vlastnostem je prase vhodným pokusným zvířetem.

4.1 Transgenní model miniprasete

Kvůli možnosti testovat potenciální možnosti terapie HD se vědci snaží vytvořit zvířecí model, který by simuloval průběh toho onemocnění, a zároveň by léčbu bylo možné aplikovat v humánní medicíně. *Drosophila*, *C. elegans* nebo *Xenopus* jsou sice vhodné organismy pro studium nejzákladnějších otázek, avšak člověku jsou hodně vzdálené. U myší a potkanů dosud nebyl vytvořen model, u kterého by průběh HD odpovídal průběhu onemocnění u lidí. Naděje se proto vkládají do velkých zvířecích modelů. S experimentováním s primáty jsou však spojeny etické problémy a mozek ovce se v porovnání s prasečím mozkem značně liší od mozku lidského.

Prasečí, stejně jako lidský mozek, má zvrásnělou mozkovou kůru do závitů, tento jev se nazývá gyrifikace. Hlodavci mají lisencephalon, tzn. hladkou mozkovou kůru (Hofman, 1985). Prasečí a lidský gen pro huntingtin vykazují 96% podobnost. Prasečí homolog pro HTT má otevřený čtecí rámeček s 9417 nukleotidy, které kódují 3139 aminokyselin o velikosti cca 345 kDa (Matsuyama a kol., 2000).

K vytvoření transgenního HD (tgHD) miniprasete (viz Obr. 1 a Obr. 2) byla využita strategie založená na transdukcii prasečích embryí lentivirovými vektory kódujícími prvních 548 aminokyselin HTT se 145 glutaminy pod kontrolou lidského HTT promotoru.



Obr. 1 Transgenní HD miniprase - dospělý jedinec (Zdroj: *Laboratoř buněčné regenerace a plasticity, Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i.*)

Fragmentační analýza úseků DNA obsahujících CAG/CAA sekvence ukázala, že integrovaný transgen obsahoval 124 glutaminů místo původních 145 (Baxa a kol., 2013).

Mutantní HTT gen byl detekován na chromozomu 1 a sekvencí bylo zjištěno, že lidský mutovaný huntingtin byl insertován do části DNA, která nekóduje žádný gen (Baxa, osobní komunikace). U všech 4 generací transgenních HD miniprasat byl jejich vývoj a chování srovnatelné s „wild-type“ miniprasaty. TgHD selata nejevila po narození žádnou odlišnost a během jejich vývoje zaznamenána nebyla žádná porucha typická pro HD. Všechna zvířata pohlavně dospěla v 5 měsících a byla schopna reprodukce. Byla zaznamenána snížená plodnost transgenních kanců, která začala kolem 1 roku života. V současné době se pracuje na charakterizaci fenotypu tohoto onemocnění. Doposud byla potvrzena patologie u kančích spermií a nepatrné změny v mozku 24 měsíců starých prasat (Baxa a kol., 2013).



Obr. 2 Transgenní HD selata (*Zdroj: Laboratoř buněčné regenerace a plasticity, Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i.*)

4.2 Melanomový model miniprasete

Melanom způsobuje přibližně 75 % úmrtí spojených s rakovinou kůže (Jerant a kol., 2000), ale patří mezi méně časté typy onemocnění. Avšak výskyt kožního maligního melanomu neboli CMM během posledních pár desetiletí rapidně vzrostl, stejně tak jako se zvýšila úmrtnost na tento typ nádoru v „bílé“ populaci (Måsbäck a kol., 2001). Kožní melanom je velmi zákeřný právě díky své schopnosti tvořit metastázy. Je nutné vytvořit vhodný zvířecí model, jenž pomůže objasnit základní mechanismy týkající se tohoto onemocnění.

Několik zvířecích modelů pro studium melanomu již bylo vyšetřeno. Kříženec sladkovodní ryby rodu *Xiphophorus*, myši, morčata, vačice, dokonce i několik druhů domácích zvířat bylo použito jako modelový organismus, ale žádný z těchto modelů nevykazoval dostatek optimálních vlastností, které by se shodovaly s lidským melanomem (Kusewitt a Ley, 1996).

Úspěšně byl vytvořen i prasečí model, se zkratkou MeLiM, což je zkratka pro Melanoblastoma-bearing Libechov Minipig (Horák a kol., 1999).

Melanoblastomy se vyskytují na různých částech těla tmavě pigmentovaných miniprasat (viz Obr. 3). Mají obvykle modulární (uzlovitý) tvar a jsou vícenásobné. MB jsou viditelné již při narození nebo se objevují do dvou měsíců (u 57 % selat). U miniprasat s kožním MB jsou opakovaně nalézány metastázy v plicích, slezině a lymfatických uzlinách. U miniprasat, která vizuálně nevykazovala známky kožního MB (27 % ze všech jedinců), byly nalezeny nádorové buňky ve vnitřních orgánech. Během prvních 2 měsíců života zemřelo asi 34 % všech postižených selat (Horák a kol., 1999).

Prasata linie MeLiM (viz Obr. 3), která vykazovala přítomnost melanomu, byla zkřížena se zdravými kanci a potomstvo bylo brzy po porodu zkoumáno na přítomnost pigmentových lézí v pravidelných intervalech (Vincent-Naulleau a kol., 2004). Biopsie rostoucích a regresních nádorů a útrobních metastáz byla provedena u 243 selat.

Nalezené kožní léze byly klasifikovány do 3 morfologických typů (viz Tabulka 1).

Tabulka 1. Obecné znaky a klinické příznaky lézí pozorovaných na miniprasatech. 3 typy kožních lézí pozorované u melanomových prasat a jejich klinické příznaky. (Zdroj: Vincent-Naulleau a kol., 2004)

Typ	Obecné makroskopické znaky	Klinické příznaky
1	ploché léze	různá velikost; hnědé až černé barvy
2	malé vyvýšené léze, silně pigmentované, kopulovitého nebo plochého tvaru	hladká papula; malý černý nodul; hyperkeratonická papula; makula s papulární oblastí
3	velké vyvýšené léze, silně pigmentované, nodulární nebo exofytické (zevně rostoucí)	velké léze, často vředovité, s rychlým či pomalým růstem

Léze typu 1 se vyskytovaly u všech třech sledovaných skupin prasat, ale byly ze všech typů nejméně časté. Během klinického sledování některé léze zmizely. Nejčastější pozorovanou lézí typu 2 byla silně pigmentovaná papula s hladkým povrchem, pravidelného či neregulárního tvaru. Léze typu 3 byly častěji pozorovány u selat s černou srstí než s červenou. Kožní léze se nikdy nevyvinuly u barevných selat s černými nebo bílými skvrnami, či u selat bílých. Vývoj vyvýšených lézí byl nejčastější v prvních třech měsících života všech sledovaných selat, čím byla selata starší, tím se poté výskyt lézí snižoval. Téměř u všech selat byla pozorována kompletní regrese nádorů. Po ulceraci se zevně rostoucí tumory začínají vysušovat, objevuje se keratóza a velikost tumoru se zmenšuje (Vincent-Naulleau a kol., 2004).

Maligní melanom na MeLiM prasatech byl sledován také metodou FDG PET neboli 2-deoxy-2-[¹⁸F]fluoro-D-glukosová pozitronová emisní tomografie. Výsledky tohoto výzkumu potvrzují podobnost melanomu mezi člověkem a prasetem (Boisgard a kol., 2003).

Prasata MeLiM vykazují dědičný výskyt melanomu, který se objevuje velmi brzy. Rozšíření melanomových metastáz do orgánů je velmi podobné rozšíření těch lidských. Prasečí kůže vykazuje podobné morfologické a funkční znaky jako kůže lidská (Wagner a kol., 2001). Struktura dermálních a epidermálních spojení, vlastnosti enzymů v epidermis, obnova epidermální tkáně, proteiny keratinu a tloušťka epidermis jsou shodné v prasečí i lidské kůži (Boisgard et al., 2003). Právě díky těmto vlastnostem je MeLiM nenahraditelným zvířecím modelem.



Obr. 3 Model MeLiM. U prasete lze pozorovat kožní modulární melanomy. (Zdroj: Laboratoř biologie nádorů, Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i.)

5. Možné studium vzájemného vztahu mutovaného huntingtinu a rakoviny

Bylo prokázáno, že u lidí, kteří trpí polyQ onemocněním, se rakovina vyskytuje v menším měřítku než u běžné populace (Sørensen a kol., 1999; Ji a kol., 2012).

Jaká může být spojitost mezi rakovinou a polyQ sekvencí?

Protein p53 patří mezi tumor supresorové geny, čili svou činností brání vzniku nádorového onemocnění. Tento protein hraje klíčovou roli ve spuštění apoptózy, pokud došlo k poškození DNA. Nejškodlivějšími DNA postiženími jsou zlomy dvouvláknové DNA. Mohou vznikat produkcí volných radikálů (Lukas a kol., 2011) nebo při transkripci (Ju a kol., 2006). Akumulaci DNA zlomů způsobuje i mtHTT (Illuzzi a kol., 2009).

Pokud dojde k poškození DNA je aktivována DDR neboli damage response pathway. DDR je jakási „cesta“, která buňkám umožňuje se s tímto poškozením vypořádat. Tedy jako odpověď na poškození DNA je aktivována odpověď na poškození DNA (DNA Damage response pathway, neboli DDR). Klíčovým komponentem DDR je protein p53 (Reinhardt a Schumacher, 2012). p53 je v buňkách, které exprimují mtHTT, aktivován jako důsledek DDR. To znamená, že u osob s HD je exprese proteinu p53 zvýšená, což potvrzuje i Steffan a kol., (Steffan a kol., 2000).

p53 má pro-apoptický charakter - patrně je schopen zastavit buněčný cyklus v G1 fázi, aby mohly být provedeny nezbytné opravy poškozené DNA. Pokud poškození nelze opravit, je spuštěna apoptóza (Martin a Green, 1995). Tímto způsobem by p53 mohl odpovídat za nižší výskyt rakoviny mezi HD pacienty (Bae a kol., 2005).

Pro zkoumání teorií o možném ovlivňování se mtHTT a p53 proteinů je možné využít tgHD model miniprasete a model MeLiM. Po křížení jedinců z těchto linií se narodila tgHD selata s melanomem, ale ve stejném vrhu byla i zdravá selata bez melanomů a selata, která nebyla transgenní (bez exprese mtHTT). Tím vznikla experimentální skupina zvířat, u které by se dal sledovat vzájemný vztah mutovaného huntingtinu a rakoviny (Baxa, osobní komunikace).

Závěr

Ačkoli je vztah exprese mutovaného huntingtinu a vzniku rakoviny zřejmý, není stále zcela objasněn. Za nižší výskyt rakoviny mezi pacienty s Huntingtonovou chorobou je patně zodpovědný rozšířený úsek CAG opakování, jež dává mutovanému huntingtinu rozdílné vlastnosti od jeho přirozeně se vyskytující wild-type formy. Jedním z následků těchto odlišných vlastností je pravděpodobně potlačení vzniku nádorů, ať benigních či maligních. Výsledky různých studií naznačují možnou spojitost exprese mutovaného huntingtinu a aktivace proteinu p53.

Pro studium Huntingtonovy choroby a rakoviny - kožních melanomů - byly vytvořeny dva různé modely miniprasat. První model - tgHD - vykazuje přítomnost mutovaného proteinu huntingtinu, který je děděn z generace na generaci. Pro druhý model miniprasat - MeLiM - je charakteristický dědičný výskyt maligních kožních lézí. Tato experimentální zvířata jsou fyziologicky, imunologicky, velikostí a strukturou mozku jako i charakterem epidermis velmi podobná člověku, tudíž jsou vhodnými objekty pro výzkum vzájemného vztahu rakoviny a Huntingtonovy choroby. Potomci, kteří vznikli zkřížením těchto dvou prasečích modelů, poskytují možnost věnovat se problematice spojitosti HD a rakoviny v diplomové práci.

Reference

Alles, A., Alley, K., Barrett, J.C., Buttyan, R., Columbano, A., Cope, F.O., Copelan, E.A., Duke, R.C., Farel, P.B., Gershenson, L.E., et al. (1991). Apoptosis: a general comment. *The FASEB Journal* 5, 2127–2128.

Anand, P., Kunnumakara, A.B., Sundaram, C., Harikumar, K.B., Tharakan, S.T., Lai, O.S., Sung, B., and Aggarwal, B.B. (2008). Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharmaceutical Research* 25, 2097–2116.

Bae, B., Xu, H., Igarashi, S., Fujimuro, M., Agrawal, N., Taya, Y., Hayward, S.D., Moran, T.H., Montell, C., Ross, C.A., et al. (2005). p53 mediates cellular dysfunction and behavioral abnormalities in Huntington's disease. *Neuron* 47, 29–41.

Bates, G., Harper, P., and Jones, L. (2002). *Huntington's Disease*. Oxford Monographs on Medical Genetics 45, 547pp.

Baxa, M., Hruska-Plochan, M., Juhas, S., Vodicka, P., Pavlok, A., Juhasova, J., Miyanochara, A., Nejime, T., Klima, J., Macakova, M., et al. (2013). A Transgenic Minipig Model of Huntington's Disease Monika Baxa. *Journal of Huntington's Disease* 2, 47–68.

Boisgard, R., Vincent-Naulleau, S., Leplat, J.-J., Bouet, S., Le Chalony, C., Tricaud, Y., Horak, V., Geffrotin, C., Frelat, G., and Tavitian, B. (2003). A new animal model for the imaging of melanoma: correlation of FDG PET with clinical outcome, macroscopic aspect and histological classification in Melanoblastoma-bearing Libechov Minipigs. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 30, 826–834.

Dekkers, M.P.J., Nikolettou, V., and Barde, Y.-A. (2013). Cell biology in neuroscience: Death of developing neurons: new insights and implications for connectivity. *The Journal of Cell Biology* 203, 385–393.

Djousse, L., Knowlton, B., Hayden, M., Almqvist, E.W., Brinkman, R., Ross, C., Margolis, R., Rosenblatt, a, Durr, a, Dode, C., et al. (2003). Interaction of normal and expanded CAG repeat sizes influences age at onset of Huntington disease. *American Journal of Medical Genetics. Part A* 119A, 279–282.

Duyano, M.P., Auerbach, A.B., Ryan, A., Persichetti, F., Barnes, G.T., McNeil, S.M., Ge, P., Vonsattel, J.-P., Gusella, J.F., Joyner, A.L., et al. (1995). Inactivation of the mouse Huntington 's disease gene homolog Hdh. *Science* 269, 407–410.

Engelberg-Kulka, H., Amitai, S., Kolodkin-Gal, I., and Hazan, R. (2006). Bacterial programmed cell death and multicellular behavior in bacteria. *PLoS Genetics* 2, 1518–1526.

Gusella, J.F., Wexler, N.S., Conneally, P.M., Naylor, S.L., Anderson, M.A., Tanzi, R.E., Watkins, P.C., Ottina, K., Wallace, M.R., Sakaguchi, A.Y., et al. (1983). A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature* 306, 234–238.

- Hackam, A.S., Yassa, A.S., Singaraja, R., Metzler, M., Gutekunst, C. a, Gan, L., Warby, S., Wellington, C.L., Vaillancourt, J., Chen, N., et al. (2000). Huntingtin interacting protein 1 induces apoptosis via a novel caspase-dependent death effector domain. *The Journal of Biological Chemistry* 275, 41299–41308.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674.
- Hofman, M.A. (1985). Size and shape of the cerebral cortex in mammals. I. The cortical surface. *Brain, Behavior and Evolution* 27, 28–40.
- Horák, V., Fortýn, K., Hruban, V., and Klauďy, J. (1999). Hereditary melanoblastoma in miniature pigs and its successful therapy by devitalization technique. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-Le-Grand, France)* 45, 1119–1129.
- Huntington, G. (2003). On Chorea. *The Journal of Neuropsychiatry & Clinical Neurosciences* 26, 109–112.
- Illuzzi, J., Yerkes, S., Parekh-Olmedo, H., and Kmiec, E.B. (2009). DNA breakage and induction of DNA damage response proteins precede the appearance of visible mutant huntingtin aggregates. *Journal of Neuroscience Research* 87, 733–747.
- Jerant, A.F., Johnson, J.T., Sheridan, C.D., and Caffrey, T.J. (2000). Early Detection and Treatment of Skin Cancer. *American Family Physician* 62, 357–368.
- Ji, J., Sundquist, J., and Sundquist, K. (2012). Cancer incidence in patients with polyglutamine diseases: a population-based study in Sweden. *The Lancet Oncology* 13, 642–648.
- Ju, B.-G., Lunnyak, V.V., Perissi, V., Garcia-Bassets, I., Rose, D.W., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. (2006). A topoisomerase IIbeta-mediated dsDNA break required for regulated transcription. *Science* 312, 1798–1802.
- Kusewitt, D.F., and Ley, R.D. (1996). Animal models of melanoma. *Cancer Surveys* 26, 35–70.
- Landles, C., and Bates, G.P. (2004). Huntingtin and the molecular pathogenesis of Huntington’s disease. Fourth in molecular medicine review series. *EMBO Reports* 5, 958–963.
- Langbehn, D.R., Hayden, M., Paulsen, J.S., and the PREDICT-HD Investigators of the Huntington Study Group (2010). CAG-Repeat Length and the Age of Onset in Huntington Disease (HD): A Review and Validation Study of Statistical Approaches. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* 153B, 397–408.
- Lazebnik, Y. (2010). What are the hallmarks of cancer ? *Nature Reviews Cancer* 10, 232–233.
- Lee, J., Ramos, E., Lee, J., and Gillis, T. (2012). CAG repeat expansion in Huntington disease determines age at onset in a fully dominant fashion. *Neurology* 78, 690–695.

Lind, N.M., Moustgaard, A., Jelsing, J., Vajta, G., Cumming, P., and Hansen, A.K. (2007). The use of pigs in neuroscience: modeling brain disorders. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 31, 728–751.

Lukas, J., Lukas, C., and Bartek, J. (2011). More than just a focus: The chromatin response to DNA damage and its role in genome integrity maintenance. *Nature Cell Biology* 13, 1161–1169.

Martin, S.J., and Green, D.R. (1995). Apoptosis and cancer: the failure of controls on cell death and cell survival. *Critical Reviews in Oncology/hematology* 18, 137–153.

Måsbäck, A., Olsson, H., Westerdahl, J., Ingvar, C., and Jonsson, N. (2001). Prognostic factors in invasive cutaneous malignant melanoma: a population-based study and review. *Melanoma Research* 11, 435–445.

Matsuyama, N., Hadano, S., Onoe, K., Osuga, H., Showguchi-Miyata, J., Gondo, Y., and 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.

Orr, A.L., Li, S., Wang, C.-E., Li, H., Wang, J., Rong, J., Xu, X., Mastroberardino, P.G., Greenamyre, J.T., and Li, X.-J. (2008). N-terminal mutant huntingtin associates with mitochondria and impairs mitochondrial trafficking. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 28, 2783–2792.

Proskuryakov, S.Y., Konoplyannikov, A.G., and Gabai, V.L. (2003). Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Experimental Cell Research* 283, 1–16.

Raff, M.C. (1992). Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 356, 397–400.

Reinhardt, H.C., and Schumacher, B. (2012). The p53 network: cellular and systemic DNA damage responses in aging and cancer. *Trends in Genetics* 28, 128–136.

Rigamonti, D., Bauer, J.H., De-Fraja, C., Conti, L., Sipione, S., Sciorati, C., Clementi, E., Hackam, a, Hayden, M.R., Li, Y., et al. (2000). Wild-type huntingtin protects from apoptosis upstream of caspase-3. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 20, 3705–3713.

Rigamonti, D., Sipione, S., Goffredo, D., Zuccato, C., Fossale, E., and Cattaneo, E. (2001). Huntingtin's neuroprotective activity occurs via inhibition of procaspase-9 processing. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 14545–14548.

Smith, R., Brundin, P., and Li, J.-Y. (2005). Synaptic dysfunction in Huntington's disease: a new perspective. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 62, 1901–1912.

Sørensen, S.A., and Fenger, K. (1992). Causes of death in patients with Huntington's disease and in unaffected first degree relatives. *Journal of Medical Genetics* 29, 911–915.

Sørensen, S.A., Fenger, K., and Olsen, J.H. (1999). Significantly lower incidence of cancer among patients with Huntington disease: An apoptotic effect of an expanded polyglutamine tract? *Cancer* 86, 1342–1346.

Steffan, J.S., Kazantsev, A., Spasic-Boskovic, O., Greenwald, M., Zhu, Y.Z., Gohler, H., Wanker, E.E., Bates, G.P., Housman, D.E., and Thompson, L.M. (2000). The Huntington's disease protein interacts with p53 and CREB-binding protein and represses transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 6763–6768.

The Huntington's Disease Collaborative Research Group (1993). A Novel Gene Containing a Trinucleotide That Is Expanded and Unstable on Huntington's Disease Chromosomes. *Cell* 72, 971–983.

Vincent-Naulleau, S., Le Chalony, C., Leplat, J.-J., Bouet, S., Bailly, C., Spatz, A., Vielh, P., Avril, M.-F., Tricaud, Y., Gruand, J., et al. (2004). Clinical and histopathological characterization of cutaneous melanomas in the melanoblastoma-bearing Libechev minipig model. *Pigment Cell Research* 17, 24–35.

Wagner, J.D., Schauwecker, D.S., Davidson, D., Wenck, S., Jung, S.H., and Hutchins, G. (2001). FDG-PET sensitivity for melanoma lymph node metastases is dependent on tumor volume. *Journal of Surgical Oncology* 77, 237–242.

Wexler, A. (2008). *The Woman Who Walked into the Sea: Huntington's and the Making of a Genetic Disease*. Yale University Press, 253pp.

Zuccato, C., and Cattaneo, E. (2007). Role of brain-derived neurotrophic factor in Huntington's disease. *Progress in Neurobiology* 81, 294–330.

Zuccato, C., Valenza, M., and Cattaneo, E. (2010). Molecular Mechanisms and Potential Therapeutical Targets in Huntington's Disease. *Physiological Reviews* 90, 905–981.

Webové stránky:

<http://www.apoptosisinfo.com/>, 10/03/2014

<http://www.huntington.cz/o-nas/vyrocnizpravy/vyrocnizprava-sphch-2011.html>, 29/04/2014