

## **ABSTRAKT**

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Gabriela Kocurová

Školitel: Prof. MUDr. Jaroslav Dršata, CSc.

Název diplomové práce: Vyšetření exprese proteolytických enzymů v různých tkáních na transgenním zvířecím modelu Huntingtonovy nemoci pomocí biochemických a imunohistochemických metod

Úvod: Huntingtonova nemoc (HN) je neurodegenerativní onemocnění způsobené expanzí polyglutaminu (polyQ) v proteinu huntingtin (Htt). Protože je známo, že mutantní Htt a zvláště jeho malé proteolytické fragmenty jsou toxické pro neurony (hlavně ty ve striatu a mozkové kůře), proteolýza mutantního Htt (mtHtt) hraje zřejmě důležitou roli v patogenezi HN. Cílem této studie je proto vyšetření endogenního i mtHtt a možné zapojení proteolytických enzymů z rodiny kaspáz, matrix metaloproteináz (MMP), kalikreinů (KLK) a kalpainů v patogenezi HN.

Metody: V této studii jsme použili WT a TgHD miniprasata pro N-koncovou část lidského mtHtt (548aaHTT-145Q, generace F2, věk 36 měsíců; generace F3, věk 48 měsíců pro neplánovaný experiment), R6/2 myši byly použity jako pozitivní kontroly. Htt a proteázy byly zkoumány imunohistochemicky (IHC) a pomocí imunofluorescence (IF) na kryostatových řezech, nebo biochemicky Western blottingem (WB) za použití následujících primárních protilátek: anti-BML-PW0595, anti-EPR5526, anti-MAB2166, anti-1C2, anti-3B5H10, anti-MW8, anti-kaspáza-3, anti-MMP-9, MMP-anti-10, anti-KLK-10, anti-kalpain-5.

Výsledky: Endogenní a transgenní Htt byl detekován v mozkových řezech TgHD miniprasete (F2 generace, 36m), stejně jako byla potvrzena přítomnost malých proteolytických fragmentů. IHC odhalila tvorbu agregátů mtHtt. Biochemická detekce proteáz v TgHD miniprasat mozku prokázala vyšší hladiny kaspázy-3, MMP-9 a jejich mnohých produktů proteolytického štěpení (vzniklých z mtHtt). Použitím IHC a WB jsme prokázali významně zvýšenou expresi kaspázy-3 v nucleus caudatus a kortikální oblasti TgHD miniprasat ve srovnání s WT zvířaty. Imunohistochemicky stanovená hladina MMP-10 byla velmi nízká u všech studovaných zvířat (TgHD a WT) s malými rozdíly mezi nimi. Zvýšené hladiny MMP-9 byly pozorovány pomocí IF v retinálních pigmentových buňkách (RPE) TgHD miniprasete (48m). Na rozdíl od ostatních proteolytických enzymů, u kterých byly potvrzeny stejné, nebo zvýšené koncentrace, exprese KLK-10 v mozcích TgHD prasat byly sníženy oproti mozům WT jedinců.

Závěr: Vzhledem k rozdílné expresi proteolytických enzymů v TgHD mozcích, další studie budou zapotřebí pro objasnění přesné role těchto enzymů v etiologii HN.

Klíčová slova: proteolytické enzymy, transgenní zvířecí model, Huntingtonova nemoc, biochemie, imunohistochemie