

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie



Bc. Šárka Kučerová

Monitorování vývoje onemocnění Huntingtonovy choroby u transgenních miniprasat s N-terminální částí lidského mutovaného huntingtinu: biochemické a motorické změny u F0, F1 a F2 generace

Monitoring of the development of the Huntington's disease in transgenic minipigs with N-terminal part of human mutated huntingtin: biochemical and motoric changes of F0, F1 and F2 generation

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: Ing. Zdeňka Ellederová, PhD.

Praha, 2017

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, 14.08.2017

Podpis

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala své školitelce Ing. Zdeňce Ellederové, PhD. za její odborné vedení, cenné rady a trpělivost při zpracování mé diplomové práce. Rovněž bych chtěla poděkovat i ostatním spolupracovníkům z Akademie věd v Liběchově za jejich pomoc při získání potřebných dat.

Abstrakt

Huntingtonova choroba (HD) patří mezi neurodegenerativní onemocnění, od kterých se liší příčinou (expanze trinukleotidové repetice CAG v exonu 1 genu kódující protein huntingtin (Htt)) pouze v jednom genu (tzv. monogenní onemocnění). Ačkoliv je již od roku 1993 známá příčina nemoci, dosud není zcela známa patofyziologie HD a není nalezen lék. Pro lepší porozumění nemoci a pro možné preklinické testování se používají modely HD. Mezi nejčastěji používané modely patří hlodavci, hlavně myši, ale bylo důležité vytvořit i větší zvířecí modely, které by byly více podobné člověku. Proto bylo v roce 2009 vytvořeno na Akademii věd v Liběchově transgenní (TgHD) miniprase pomocí mikroinjikace lentivirového vektoru nesoucí N-terminální část lidského mutovaného HTT (mtHTT) s 124 CAG repeticemi v exonu 1. Tento model je životaschopný a v každé generaci se rodí určitá část Tg zvířat.

V této práci jsem se věnovala biochemickým i behaviorálním změnám u tohoto modelu. Srovnávala jsem kontrolní (Wt) a transgenní (Tg) sourozence. Zjistila jsem, že biochemické změny se projevují hlavně zvýšenou přítomností fragmentů Htt ve varlatech a v mozku. V behaviorální části bylo mým hlavním úkolem zavedení metodiky pro další zkoumání behaviorálních změn u tohoto modelu, které zatím nebyly popsány. Byla testována zvířata F0, F1 a F2 generace, Tg a Wt. Tyto skupiny vykazovaly určité rozdíly, ale vzhledem k velikosti skupiny, nejsou tyto výsledky prozatím signifikantní. U zavedených metodik zatím nebyly u zvířat vyzorovány průkazné změny, ale tato metodika může položit základ pro další testování a nalezení již popsaných dobře známých behaviorálních a kognitivních změn u člověka.

Klíčová slova: Huntingtonova choroba, huntingtin, zvířecí model, miniaturní prase, behaviorální studie

Abstract

Huntington's disease (HD) belongs to neurodegenerative disorders. It is a monogenic disease caused by trinucleotide CAG expansion in exon 1 of gene coding protein huntingtin. Even though the cause of HD is known since 1993, the pathophysiology and cure for HD remains to be found. The animal models are being used for better understanding of HD. The most common animal models for HD are rodents, especially mice but it was also important to create large animal models, which will be more like human. Therefore, TgHD minipig was created in Academic of Science in Liběchov in 2009. This model was created by microinjection of lentiviral vector carrying N-terminal part of human HTT with 124 repetitive CAG in exon 1. This model is viable and in every generation, is part of the offspring transgenic.

In this thesis, I specialized to biochemical and behavioral changes of this model. I compared transgenic and wild type siblings. I found that biochemical changes are manifested mostly by increased level of mtHtt fragments in testes and brain. In behavioral part of this thesis I established new methods for testing behavioral changes in this model. The introduced methods showed some changes between wild type and transgenic animals at the tested ages but these changes were not significant due to the low number of animals at the oldest age. Nevertheless, these methods will be further used in aging animals to compare the phenotype development in this model with well-known behavioral and motoric changes typical for HD patients.

Keywords: Huntington's disease, huntingtin, animal model, miniature pig, behavioral studies

Obsah

Abstrakt.....	4
Abstract.....	5
Seznam zkratek.....	8
Cíle práce.....	9
Úvod.....	10
Huntingtonova choroba.....	11
Mozek.....	12
Historie.....	13
Gen huntingtin.....	13
Protein huntingtin.....	13
Struktura huntingtinu.....	15
Úloha huntingtinu v těle.....	17
Huntingtonova choroba jako nemoc.....	20
Modely Huntingtonovy choroby.....	24
Malé zvířecí modely.....	24
Velké zvířecí modely.....	26
Miniprasečí model HD.....	27
Behaviorální testy – velké zvířecí modely.....	28
Materiál a metody.....	30
Materiály.....	30
Laboratorní metody.....	31
Western blot.....	33
Filter retardation.....	36
qPCR.....	37
Behaviorální metody.....	39
Toy 1 Cover pan.....	39

Toy 2 Skittles.....	39
Hurdle test	40
Tunnel test	40
Seesaw test.....	40
Leg test	40
Balance beam.....	40
Concentration test.....	40
Stability test	40
Výsledky	41
Genotypizace zvířat.....	41
Výskyt mutovaného Htt u transgenních miniprasat	41
Výskyt mutovaného Htt u transgenních myší	41
Invazivní výsledky	42
Sledování genové exprese hladiny mRNA mtHTT v různých tkáních a u různě starých miniprasat.....	42
Sledování exprese mtHtt a jeho forem v různých tkáních a u různě starých miniprasat	45
Sledování oligomerních forem Htt nejstarších 48 m miniprasat – filter retardation assay	61
Neinvazivní výsledky.....	62
Zavedení metod	62
Výsledky.....	63
Diskuze	68
Závěr	72
Seznam citací	73

Seznam zkratek

HD	Huntingtonova choroba
Htt	Protein huntingtin
HTT	Gen Huntingtin
mtHtt	Mutovaná forma proteinu huntingtinu
mtHTT	Mutovaná forma genu Huntingtinu
bp	Páry bází
wtHtt	wild-type forma proteinu huntingtinu (neboli přirozená)
TgHD	Transgenní zvíře nesoucí HD
CAG	Cytosin-Adenin-Guanin
polyQ	polyCAG
OCD	Obsedantně kompulsivní poruchy
MTP	Mitochondrial transition pore
cdk5	Cyklin-dependentní kináza 5
SUMO	Small Ubiquitin-related Modifier
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
mRNA	Messenger RNA
GAPDH	Glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenáza
ACTB	Aktin
NO	Neurodegenerativní onemocnění

Tabulka 1 – Seznam použitých zkratk

Cíle práce

- Sledování genové exprese mtHTT mRNA v mozku a varlatech TgHD miniprasat starých 24, 36 a 48 měsíců.
- Sledování exprese proteinu mtHtt v různých tkáních TgHD miniprasat starých 24, 36 a 48 měsíců.
- Detekce přítomnosti oligomerních forem mtHtt v kortexu TgHD miniprasat starých 48 měsíců a v mozku transgenních HD myši starých 4 a 12 týdnů.
- Zavedení metodiky pro výzkum kognitivních a motorických poruch TgHD miniprasat.
- Sledování kognitivních a motorických poruch TgHD miniprasat.

Úvod

Huntingtonova choroba (HD) je autozomálně dominantní neurodegenerativní onemocnění. Tato choroba se zařazuje mezi trinukleotidové onemocnění spolu např. se spinocerebelární ataxií (Orr 2012). Trinukleotidové onemocnění se nazývají proto, že jsou způsobena expanzí v trinukleotidu – cytosin-adenin-guanin (CAG) na N-konci 1. exonu genu IT15 kódující protein huntingtin (Htt) (Huntington et al. 1993). Příčina choroby – expanze polyCAG sekvence (polyQ) je známa již od roku 1993, ale mechanismus jejího působení zatím objasněn není. Htt je v těle nemocných nalézán jednak v solubilní formě, ale i ve formě agregátů, které mohou mít svůj podíl na rozvoji nemoci.

Pochopení funkcí proteinu Htt v těle je jeden z klíčových momentů porozumění mechanismu nemoci a tím i důležitým krokem k nalezení léčby. Jedinou jistou tezí zůstává hlavní úloha Htt v těle a to taková, že se vyskytuje v celém organismu a jeho delece v embryonálním vývoji myši je letální (Nasir et al. 1995).

Studium HD lze rozdělit na úroveň molekul a organismu. V této diplomové práci jsem se věnovala oběma těmto úrovním za účelem získání komplexního pohledu na problematiku HD. Na úrovni molekul jsem se zabývala detekováním mtHtt v tkáních prasat a myši různého stáří. Naopak na úrovni organismu jsem se snažila zavést metody pro studium behaviorálních a kognitivních funkcí TgHD miniprasat. Také jsem se snažila nalézt možné fyzikální projevy u modelu TgHD miniprasat, podobné jako jsou u člověka postiženého touto chorobou, z důvodu nalezení co nejpřesnějšího modelu HD pro rozsáhlejší pochopení této nemoci a možnosti preklinického testování.

Huntingtonova choroba

HD je jedna z pěti autozomálně dominantních chorob souvisejících s místně specifickou degenerací centrální nervové soustavy, od kterých se ale HD liší známou příčinou nemoci (již od roku 1993). Příčinou HD je expanze trinukleotidových repetitivních CAG v genu IT15 kódujících protein Htt (Huntington et al. 1993). HD se projevuje ve formě psychické i fyziologické. Mezi nejvýraznější fyziologické projevy se řadí mimovolní pohyby a mezi psychologické projevy se řadí kognitivní změny – jediným lékem v současné době jsou léky tlumící psychologické příznaky. HD se projevuje až v dospělosti (ve většině případů) a proto se mutovaný gen často přenese i na potomky.

Existují dvě formy nemoci na genetické úrovni: heterozygotní a homozygotní. Tyto formy se však od sebe neliší v projevech nemoci - to může být z části dáno dominancí HD, nebo částečnou zastupitelností funkce wtHtt (wild-type forma proteinu huntingtinu) jeho mutantní formou (Myers et al. 1989). Nejvýraznější rozdíl mezi heterozygotní a homozygotní formou je v pravděpodobnosti přenosu „nemocné“ alely z rodiče na potomka. U homozygotní formy je pravděpodobnost přenosu nemoci na potomky 100%, zatímco u heterozygotní je to „pouze“ 50% (Project and Wexler 2004). Dalo by se tedy předpokládat, že homozygotní forma nemoci bude mít v závislosti na dvojnásobném množství repetitivních dvojnásobně dřívější nástup nemoci, ale opak je pravdou. Homozygotní forma nemoci nepředstavuje dřívější nástup choroby. HD se odvíjí hlavně od jedné alely bez závislosti na alele druhé, ať je mutantní či přirozeně se vyskytující (Lee et al. 2012).

Dědičnost HD spolu s projevem až po reprodukčním věku (při adultní – nejčastější formě nemoci) je jedním z největších úskalí této nemoci. Nemocný může přenést na dítě svou chorobu, aniž by vůbec věděl, že je nemocný. Tímto způsobem přerůstá počet „osob v riziku“ (osoby, které mají nemocného minimálně jednoho rodiče a nemají diagnostikovanou nemoc) mnohonásobně počet diagnostikovaných pacientů. Dědičnost HD závisí mimo jiné na mnoha faktorech, jako je: pacient sám o sobě, rodinná historie nemoci, prostředí a dokonce i pohlaví rodiče, od kterého je nemoc zděděna - pravděpodobnost přenosu HD či dřívějšího projevu se zvyšuje při přenosu mutované alely od otce, více než od matky (Krawczak et al. 1991).

Patologie HD souvisí s buněčnými změnami ve striatu. Tyto změny se pojí se ztrátou neuronů a postupnou atrofií v dalších oblastech mozku – podle rychlosti postupu choroby. K mutacím této choroby se zdají být citlivější neurony v oblasti kortexu a striata. Na buněčné smrti charakteristické pro HD se pravděpodobně podílí i citlivost k oxidačnímu stresu a k excitotoxickým účinkům glutamátu (Vonsattel and DiFiglia 1998). První změnou spinálních striatálních neuronů, která by mohla být předzvěstí choroby, je kupodivu spíše neurální růst než degenerace (Ferrante et al. 1991).

Degenerace striatálních neuronů u HD je podobná dalším neurologickým chorobám, jako je Parkinsonova, Alzheimerova choroba či další sklerotická onemocnění. Ke ztrátě striatálních neuronů dochází od počátku choroby a s vývojem nemoci se zvyšuje počet degenerovaných neuronů. Degenerace neuronů se projevuje jako první znak patogeneze HD, nebo jako důsledek transsynaptické degenerace (Reiner et al. 1988). U pacientů se symptomy HD bylo zjištěno, že po snížení počtu postsynaptických receptorů vázajících dopamin, dojde ke zvýšení počtu aktivovaných mikroglíí (Politis et al. 2008).

Mozek

Mozek patří spolu s míchou do CNS. Skládá se z několika částí, které vznikly neurulací v embryogenezi:

Mozkový kmen – skládá se z prodloužené míchy, Varolova mostu a středního mozku.

Prodloužená mícha – funkční propojení mozku a míchy, kterým prochází mnoho drah, včetně hlavových nervů.

Varolův most – napojuje se na prodlouženou míchu a pokračuje ve středním mozku, prochází zde také řada hlavových nervů.

Střední mozek – zrakové a sluchové centrum a odsud vedou důležité motorické dráhy do CNS.

Mozeček – významné centrum rovnováhy.

Mezimozek – se skládá ze dvou částí: thalamus (centrum pro senzitivní vzruchy) a hypothalamus (řízení endokrinních žláz).

Koncový mozek – je největší oddíl mozku. Nachází se zde čichové centrum a corpus striatum. Na povrchu koncového mozku je kůra, která se podílí na vědomí, paměti, vnímání a při zahájení volných pohybů.

Historie

Huntingtonova choroba je známa již od roku 1374. Nejprve byla popisována jako „tančící mánie“ (z důvodu svalových záškubů nemocných), poté bývala spojována s kletbou sv. Víta, či s čarodějnictvím. V 15. století Paracelsus označil charakteristické pohyby nemocných jako choreu. V 17. století anglický lékař Thomas Sydenham přinesl první klinický popis pohybů spojovaných s touto choreou. Až v roce 1872 přišel americký lékař George Huntington s úplným popisem této choroby (Huntington 1872).

V roce 1985 rozdělil Jean-Paul Vonsattel HD do 5 stupňů podle neurologických, anatomických a klinických změn. Tento popis je založen na striatálních změnách pozorovaných v mozku po smrti člověka (Vonsattel et al. 1985).

Roku 1991 bylo zjištěno, že zvýšení počtu repetice CAG v genu kódujícím huntingtin souvisí s manifestací choroby (Aronin et al. 1995). Již v roce 1993 byl popsán gen zodpovědný za tuto chorobu a jeho změny (Huntington et al. 1993).

Gen huntingtin

Jako gen zodpovědný za HD byl označen gen IT15, který se nachází na 4. chromozomu v oblasti 16.3. V tomto genu je oblast, ve které se objevují trinukleotidové repetice CAG = úsek nestabilní DNA, ve kterém může docházet k zmnožení těchto repetice a tím k manifestaci HD. Projev HD souvisí s vyšším počtem repetice CAG v genu pro HD (Aronin et al. 1995). Tato oblast DNA nestability se projevuje dominantně a je přítomna i v řadě dalších chorob jako je syndrom fragilního X chromozomu a mnohé jiné (Huntington et al. 1993).

Protein huntingtin

Protein huntingtin je translatován z genu pro huntingtin, normální forma i s prodlouženými CAG repeticemi – mutovaná forma (Huntington et al. 1993). Důležité je, že mutovaný protein huntingtin nepotlačuje expresi HTT genu, ale vyvolává produkci velmi podobného proteinu s množenými CAG repeticemi u N-konce proteinu, který způsobuje patogenezi charakteristickou pro HD (Persichetti et al. 1995). Mutovaný protein huntingtin, produkt genu huntingtin, je rozšířen po celém těle včetně mozku (Vonsattel and DiFiglia 1998).

Fragmenty mtHtt jsou pro tělo velmi toxické. Fragmenty zmnožených repetitivních CAG na N-konci mtHtt jsou nalézány hlavně v oblastech mozku, které jsou nejvíce poškozené u HD, tj. v kortexu a striatu. Tyto fragmenty s glutaminovými repetitivními částmi často způsobují akumulaci mtHtt v těchto oblastech a tím pravděpodobně i jejich následné poškození. Kromě jiného se ve výše zmíněných oblastech nalézá ubiquitin, který udává označení proteinů pro proteolýzu, ale mtHtt je pravděpodobně odolný vůči následnému odstranění (DiFiglia et al. 1997).

Htt a agregáty – mtHtt má tendenci tvořit agregáty. Tyto agregáty byly nalezeny uvnitř jader některých kortikálních neuronů u pacientů s juvenilní formou nemoci a v mnohem menším množství u neuronů pacientů s adultní formou nemoci (DiFiglia et al. 1997), ale také v cytoplazmě neuronů (Gutekunst et al. 1999). Cytoplazmatické agregáty mohou způsobovat apoptózu abnormální aktivací buněčného cyklu (K. Liu et al. 2015). Nedávno však bylo zjištěno, že ač v myším mozku se procento agregátů pohybuje okolo 40-50%, v mozku lidských pacientů je to jen kolem 0,3% (Jansen et al. 2016). U Liběchovských miniprasat jsou nalézány fragmenty Htt v některých tkání častěji a v jiných méně, tyto fragmenty se pravděpodobně podílí na vývoji nemoci z důvodu jejich toxicity (Mende-mueller et al. 2001).

Toxicita těchto agregátů může pramenit ze schopnosti Htt vázat proteiny a tak bránit jejich přirozené fyziologické funkci (Zuccato, Valenza, and Cattaneo 2010). HD agregáty mohou obsahovat mnoho rozličných proteinů. Hlavní částí zůstává mtHtt s polyglutaminovou částí a je doplněn mnoha proteiny – ubiquitinem, chaperony a částmi transkripčních faktorů (Becher et al. 1998; DiFiglia et al. 1997; Steffan et al. 2000). V některých případech je v agregátech obsažen i normální Htt (Busch et al. 2003; Kazantsev et al. 1999). Polyglutaminový konec mtHtt je toxickou částí fragmentů, které vedou k patogenezi spjatým s HD (Hackam et al. 1998). Htt umístěný v jádře pravděpodobně není tím hlavním problémem, tím zůstává Htt v cytoplazmě ve stavu agregátů. Htt v solubilní formě neovlivňuje buněčnou smrt (Arrasate et al. 2004). Molekulární chaperony pomáhají předcházet tvorbě agregátů tím, že iniciují skládání proteinů (Hartl, Bracher, and Hayer-Hartl 2014). V poslední době bylo nalezeno možné řešení pro boj s agregáty - inhibice specifické cyklázy zvyšující počet molekulárních chaperonů, aby došlo ke snížení množství agregátů v buňce (Jimenez-sanchez et al. 2015).

Htt a štepení na fragmenty – Jedním z charakteristických znaků HD jsou fragmenty Htt odštěpujících se z jeho N-konce proteolýzou (Davies et al. 1997; El-Daher et al. 2015; Ochaba et al. 2014; Wellington et al. 1998). Funkce těchto fragmentů zatím není zcela objasněna, ale jednou z možností je ochrana proti nežádoucím účinkům mtHtt (Arrasate et al. 2004). Zdá se, že oligomery a kratší rozpustné formy Htt mají svou funkci v poškození buněk spjaté s patogenezí charakteristickou pro HD (Lajoie and Snapp 2010). Rozpuštění těchto fragmentů bylo stanoveno jako terapeutický cíl a jako nejlepší řešení se jeví fosforylace (Luo et al. 2005; Schilling et al. 2006).

Struktura huntingtinu

Huntingtin je protein o molekulové hmotnosti 348 kDa – tato velikost je ovšem velmi problematická při zkoumání přesné struktury proteinu. Zatím je známo několik hlavních částí proteinu, mezi které patří: polyQ na N-konci proteinu, elongační faktor 3, protein fosfatáza 2 A a TOR1 (HEAT doména). HEAT domény jsou ve formě superhelikálního hydrofobního jádra, které odolává proteolytickému štěpení (Li et al. 2006). Tyto části slouží k organizaci proteinu do domén a tím i k interakci protein-protein. Tento protein také podléhá post-translačním modifikacím (Zuccato et al. 2010).

PolyQ – PolyQ označuje úsek CAG repetice, které začínají na 17. aminokyselině (hned za N-koncem proteinu), u zdravého jedince nepřesahují číslo 35 (Huntington et al. 1993). Hned za polyQ úsekem se nachází polyP úsek (úsek s prolíny), který hraje významnou roli v stabilizaci polyQ a udržování polyQ v solubilní formě – to je důležité hlavně proto, že polyQ může nabývat mnoho struktur, ať už strukturu α -helixu či struktury náhodné (Kim et al. 2009; Steffan 2004).

HEAT repetice – HEAT repetice se skládají ze 40 aminokyselin, jejichž sekvence se v rámci proteinu opakuje (proto repetice) a účastní se mnoha protein-proteinových interakcí (Neuwald and Hirano 2000). V Htt bylo nalezeno 36 HEAT repetice (Takano and Gusella 2002). V novějších studiích bylo prokázáno 16 HEAT repetice, které se dělí do čtyř skupin (Tartari et al. 2008). V lidském huntingtinu se opakují 3 domény α -rod repetice – α -rod je doména, která se skládá z navrstvených α -helixů a vyskytuje se na povrchu proteinů, kde pomáhá tvořit protein-proteinové interakce. Mezi těmito doménami se nachází místa sestřihu a dochází mezi nimi k intramolekulárnímu párování, které může vést k homodimerizaci (Palidwor et al. 2009).

NH₂ konec – obsahuje sekvenci, která směřuje Htt do jádra – tzv. NLS sekvenci. Tato sekvence určuje Htt jako cytoplazmatický protein, který se ale může účastnit i procesu lokalizace proteinu do jádra. Úsek na N-konci proteinu interaguje s karyopherinem β , který dokáže zapříčinit umístění proteinu do jádra (Desmond et al. 2012). N-konec taktéž reaguje s tryptofanem (protein nukleárního póru), který se účastní jaderného exportu.

Mutace Htt – polyglutaminová expanze snižuje jaderný export Htt a proto dochází k jeho hromadění v jádře (Wang et al. 2005). Prvních 17 AMK huntingtinu hraje velmi důležitou roli v regulaci jeho agregace a toxicity. Mezi těmito AMK je obsažen NES signál – při mutaci Htt dochází k odštěpení NES sekvence a to způsobuje hromadění proteinu v jádře (Zheng et al. 2013). Zabránění hromadění proteinů v jádře je proto dalším možným terapeutickým cílem pro boj s HD (Chen et al. 2017).

COOH konec – obsahuje sekvenci pro targetování proteinu ven z jádra – tzv. NES sekvence. Tato sekvence zastává důležitou roli při HD (Xia et al. 2003).

Další místa a kritické sekvence v Htt – Existuje hypotéza, že štěpení Htt kaspázami či kalpainy může tvořit toxické fragmenty. Kalpainy štěpí Htt za pomoci polyQ Htt za podmínek, které mění homeostázu Ca^{2+} a to vede k indukci apoptózy. V některých studiích se uvádí, že potlačení štěpení Htt za účasti kaspáz vede k menší toxicitě Htt (Gafni and Ellerby 2002; Hermel et al. 2004; Wellington et al. 2000). Dalším kritickým místem Htt je jeho N-konec. Sekvence prvních 18 AMK je zakonzervována během evoluce. Tato sekvence má tendence tvořit α -helix s hydrofobním povrchem, který interaguje s membránami struktur – účastní se i vezikulárního transportu, a který je může zacílit do ER (kde se váží v závislosti na stresu) či do endosomu. Mutace v této sekvenci způsobuje zvýšený přenos Htt do jádra a to může být pro buňku toxické (Atwal et al. 2007).

Posttranslační modifikace Htt – Ubiquitinace – Je úprava vedoucí ve většině případů k degradaci proteinu. Htt je ubiquitinován na N-konci (konkrétně na lysinech K6, K9 a K15) a tím je směřován do proteazomu. U Htt má ubiquitinace mnoho funkcí, jako jsou: stabilizace, nebo intracelulární lokalizace a další funkce. U mtHtt je tento proces narušen a dochází k hromadění Htt, které je pro buňku toxické (DiFiglia et al. 1997; Kalchman et al. 1996).

Fosforylace – úprava proteinu zahrnující „navěšení“ fosfátové skupiny, kterou zprostředkovávají kinázy. Konkrétně Htt interaguje s cdk5 (cyklin-dependentní kináza 5, jejíž funkce závisí na přítomnosti cyklinů) v částech membrány a Htt je fosforylován na serinu 434. U mtHtt dochází touto fosforylací k redukci jeho toxicity a štěpení za účasti kaspáz. Ale u myšího modelu bylo zjištěno, že funkce cdk5 je u mtHtt v mozku potlačena (Luo et al. 2005). Sumoylace – je modifikace proteinu za účasti SUMO (small-ubiquitin like modifier), kdy dochází k připojení lysinového postranního řetězce k proteinu. Byla zkoumána možnost, že SUMO modifikace mohou mít vliv na patologii HD a to ve 3 oblastech: proteinové agregáty, regulace transkripce a translokace do jádra. Výsledky byly zřejmé: byl potvrzen vliv sumoylace na proteinové agregáty – zvyšuje výskyt solubilní formy Htt. Dále snižuje výskyt inklusí, tudíž je snížena translokace Htt do jádra a snižuje se vliv Htt na transkripci, také se snižuje regulace transkripce. Sumoylace by proto mohla být dalším možným nástrojem v boji proti patogenezi HD (Steffan 2004).

Úloha huntingtinu v těle

Protein mtHtt i wtHtt je přítomen skoro ve všech buňkách těla, kde má svou nezastupitelnou funkci, která je mimo jiné ukázána na knock-outu HTT v embryonálním stádiu myši, který vede k letalitě (Nasir et al. 1995). Přesto hlavním objektem zájmu zůstává mozek kvůli pozdějším neurologickým příznakům (jako je degenerace neuronů). Htt v obou formách se nachází v různých oblastech lidského mozku, jako je nukleus caudatus, putamen, temporalní a frontální kortex. Zde jsou obě formy proteinu, jak Htt tak i mtHtt (Persichetti et al. 1995). Protein Htt se přirozeně nalézá v cytosolu. mtHtt migruje daleko hůře než Htt, pravděpodobně kvůli velikosti proteinu. Ale nebyly zjištěny žádné rozdíly v umístění v buňkách mezi proteiny Htt a mtHtt, navzdory rozdílným schopnostem migrace (Persichetti et al. 1995).

Huntingtin je esenciální pro normální funkci organel jaderné membrány (jadérko, transkripce různých faktorů) a perinukleární membrány (endoplazmatické retikulum, mitochondrie, endosom, Golgiho aparát). Htt také podporuje dráhy jako je udržení homeostázy železa, dráha tvorby RNA nebo vezikulární transport (DiFiglia et al. 1995; Hilditch-Maguire et al. 2000).

Htt má roli v mnoha buněčných procesech:

Htt v embryonálním vývoji – knock-out HTT je pro embrya myši letální (Nasir et al. 1995). Ukázalo se, že Htt je velmi důležitý pro správnou neurální indukci a tím i pro neurogenezi (Nguyen et al. 2013).

Htt jako antiapoptotický protein – wtHtt funguje jako ochrana buněk CNS před apoptotickými proteiny a receptory smrti (Rigamonti et al. 2000).

Htt a neurony - Htt se nachází v neuronech striata a kortiko-striata (Fusco et al. 1999).

Htt je důležitý pro ustanovení kortikální a striatální excitatorní aktivity, při jeho ztrátě = při přítomnosti mtHtt dochází k vymizení této funkce (Mckinstry et al. 2014).

wtHtt jako kontrola produkce BDNF (brain-derived neurotrophic factor) – BDNF je faktor důležitý pro striatální neurony kortiko-spinální synapse (Zuccato and Cattaneo 2007). Htt zvyšuje intracelulární transport vesikul obsahujících BDNF – ale to neplatí pro mtHtt (Gauthier et al. 2004).

RE1/NRSE jako cíl wtHtt – RE1/NRSE jsou transkripční faktory, které mají i umlčovací funkci, která je inhibována přítomností wtHtt (Shimojo 2008; Zuccato et al. 2010).

Role Htt ve vezikulárním a axonálním transportu - Htt interaguje s β – tubulinem, kvůli tomu je schopen se navázat na mikrotubuly (většina Htt v cytoplazmě je navázána na mikrotubuly), a v oblasti centrozomů spolupracuje s tubulinem γ (Hoffner, Kahlem, and Djian 2002). Dále Htt interaguje se strukturami, jako jsou klatrinové a kalveolární vesikly, či endosomy (Velier et al. 1998), ale také s molekulárním motorem dyneinem (Caviston et al. 2007).

Htt a synaptická aktivita – wtHtt je důležitý protein participující na komunikaci mezi synapsami. Když dojde k prodloužení glutaminových repetit a tím vzniku mtHtt, dochází ke snížení přirozené schopnosti wtHtt snižovat glutamát zprostředkovanou excitotoxicitu (Sun et al. 2001).

Htt a autofágie – Autofágie je jedním z procesů buněčné degradace, při které dochází k uzavření organel/proteinu určeného k degradaci do proteasomu a pomocí lysozomu je tento obsah rozložen. Zatím nebylo zjištěno, zda jsou agregáty Htt toxické či protektivní, protože agregáty Htt rozhodně pozitivně ovlivňují autofáгии, proces odbourání Htt (Ravikumar et al. 2004).

Později bylo prokázáno, že funkce apoptosomu není ovlivněna mtHtt (Zheng et al. 2010). Následně se ukázalo, že autofagosomy při přítomnosti mtHtt ovlivňují buněčný transport (Wong and Holzbaur 2014) a tím dochází ke snížení funkce autofagosomů (Jahreiss, Menzies, and Rubinsztein 2008; Ravikumar et al. 2005).

Role Htt v mitochondriálním metabolismu – Htt se váže na mitochondrie – konkrétně na jejich vnější membránu z cytosolické strany. mtHtt negativně ovlivňuje MTB (mitochondrial transition pore) a to je pro buňku toxické (Choo et al. 2004). U premanifestace HD zatím nebyly prokázány mitochondriální změny u svalů skeletu člověka, ale to neznamená, že nemohou být již přítomny v mozku (Buck et al. 2017).

Htt a jeho funkce v regulaci transkripce – Umístění Htt v jádře vede k předurčení jeho funkce jako transkripčního regulátoru (Kegel et al. 2002). Množství hlavních mRNA (messenger RNA) v mozku HD pacientů kódující receptory pro signální neuropeptidy a neurotransmitery je velmi sníženo (Arzberger et al. 1997).

Zajímavé ale je, že regulaci transkripce lze objevit v mozku pacientů s HD ještě před projevem prvních symptomů (Cha 2007). Htt interaguje i s proteiny CpG ostrůvků – tyto proteiny poté mohou ovlivňovat Htt-zprostředkovanou expresi BDNF (Mcfarland et al. 2014). U mtHtt dochází ke snížení hladiny BDNF a tím pádem ke snížení neuroprotektivity buněk, tomu by mohlo být zabráněno užitím kombinačních terapií (Brito et al. 2013).

Htt a mitóza – Htt ovlivňuje přirozenou interferenci. Htt se vyskytuje na pólech mitotického vřeténka a při RNAi (RNA interference) umlčování Htt dochází k dezorientaci vřeténka a tím k poruchám mitózy a to vede k apoptóze buněk (Godin et al. 2005). HTT mění modulaci mitotického vřeténka a osud buněk u myších kortikálních progenitorů (Lopes et al. 2016). Při hledání dalších terapeutických cílů bylo uměle vytvořeno RNAi pro HTT, aby došlo ke snížení množství Htt a tím k oddálení nemoci (Cambon et al. 2017).

Huntingtonova choroba jako nemoc

Stádia nemoci

Existují tři formy nemoci, které se rozlišují podle věku, kdy nemoc propuká. Tyto stádia se odlišují i geneticky, podle zvyšujícího se počtu CAG repetice.

Počet CAG repetice	Projev nemoci
10–26	Zdravý jedinec
27–35	Relativně zdravý jedinec (pokud dojde k dalším mutacím, dojde k projevu nemoci)
36–39	Přechodný stav, kdy se nemoc může a nemusí projevit
> 40	Nemoc se projeví – pravděpodobně kolem 40. roku
> 60	Nemoc se projeví – již v dětství

Tabulka 2 – Formy nemoci v závislosti na počtu repetice CAG

Juvenilní forma

Dřívější projev choroby často znamená vážnější a rychlejší průběh na rozdíl od pozdější formy (Conneally 1984).

Juvenilní forma se vyznačuje projevem nemoci většinou do 20. roku života – existují ale i vzácné případy, kdy se nemoc projeví již před 10. rokem. Tato forma postihuje jen asi 5 % nemocných (při projevu do 10 let méně než 1 % nemocných).

Tato forma se dědí častěji od otce než od matky, protože u muže může dojít ke zmnožení repetice při přenosu nemoci na potomka. U této formy nemoci se počet CAG repetice pohybuje přes číslo větší než 60.

Příznaky se manifestují spíše psychické než fyziologické. Mezi první projevy patří změny osobnosti a demence, které jsou následovány až později poruchami fyziologickými.

Mezi fyziologické poruchy patří hlavně svalová ztuhlost. Typické mimovolní pohyby se nemusí vůbec projevit. Častým problémem pacientů s touto formou nemoci bývají i epileptické záchvaty. Tyto projevy jsou následovány těžšími, jako jsou poruchy výslovnosti a polykání. Tato forma má velmi rychlý progres a nemocný je velmi brzy zcela odkázán na pomoc okolí.

Adultní forma – klasická

Tradičně se nemoc projevuje mezi 35–50. rokem života. Hranice repetice pro projev nemoci v této formě je stanovena na více než 40 repetice. Tato forma je nejčastější u pacientů s HD.

Mezi první příznaky opět patří poruchy osobnosti, změny nálad a deprese. Fyziologické poruchy, jako jsou mimovolní pohyby a poruchy cílených pohybů se u této formy nemoci projevují již od počátku progresu. Až s postupem nemoci dochází k rozvoji demence a k vývoji fyziologických poruch, jako jsou nejistota při chůzi, porucha řeči, či problémy s polykáním.

V těžších stádiích nemoci dochází poté také k inkontinenci a kachektizaci, ale mimovolní pohyby naopak ubývají. Prognóza nemoci bývá průměrně kolem 15 let. Nemocní umírají většinou na infekci, či jiné problémy, primárně nesouvisející s chorobou.

Stařecká forma – s pozdním nástupem

Tato forma se projevuje až po 60. roce života, výjimečně až po 70., ale to spíše bývá připisováno nepovšimnutí si předchozích příznaků. Pacientu s touto formou nemoci mívají počet repetit na hranici mezi zdravým a nemocným jedincem, která je stanovena na 36–39 CAG repetit.

Tato forma mívá pomalý nástup a prvotní příznaky mohou být připisovány pokročilému věku pacienta. Hlavním příznakem jsou zde mimovolní pohyby. Většinou bývají nemocní soběstační a motoricky schopní. Demence se často vůbec neprojevuje. Smrt pacienta přichází až v průměrném věku smrti populace.

Projevy nemoci

Psychiatrické projevy

Nejčastější psychické poruchy pacientů s HD jsou dysforie, agitace, podrážděnost, apatie a úzkost. Tyto dysfunkce se vyskytují téměř u všech pacientů (Paulsen et al. 2001).

Deprese – poměrně častá u pacientů, v některých případech vede až k šílenství a sebevraždě (Huntington 1872).

Mánie – výskyt u 5-10% pacientů s HD (velmi těžké k diagnóze) (Folstein et al. 1987). Pacienti se vyznačují nestálostí nálady, impulzivností, zvýšenou aktivitou, hypersexualitou, sníženou potřebou spánku a někdy halucinacemi či depresí (Rosenblatt 2007).

Primární psychotické poruchy – bludy se vyskytují u 11 % pacientů s HD a halucinacemi trpí 2 % pacientů (Paulsen et al. 2001).

Obsedantně kompulzivní poruchy (OCD) – se vyznačují repetitivním chováním a myšlenkami (=obsese). Symptomy OCD mohou předcházet nebo se náhodně spojovat se symptomy HD, jako jsou motorické a behaviorální (Molano-Eslava et al. 2008).

Exekutivní dysfunkce – u pacientů s HD jedna z nejčastějších poruch, ale zároveň velmi těžko diagnostikovatelná. Vyznačuje se apatií, podrážděností, impulsivností a obsesí. Také se zjistilo, že apatie koreluje s motorickými a kognitivními poruchami u pacientů s HD (Thompson et al. 2002).

Další psychiatrické onemocnění u pacientů s HD – delirium, demoralizace, sexuální problémy a problémy se spánkem (Rosenblatt 2007).

Fyziologické projevy

Nemoc obvykle začíná záškuby svalů v obličeji – nekontrolovatelné mrkání, sraštění obočí, grimasy ústy. Na rozdíl od epilepsie, pacienti HD jsou při těchto záškubech normálně při vědomí, ale nedokáží je kontrolovat. Celkově nemocní s HD mají často postižené kosterní svaly tzv. mimovolními pohyby. Pokud začíná nemocný vystrkovat jazyk a kroutit s ním, bývá to znak pokročilejší fáze nemoci. Také nemocní často kroutí rukama, krčí rameny a nohy a chodidla musí mít neustále v pohybu – kroutí prsty na nohou. V některých případech nebývají svaly dolních končetin postiženy – nebo nebývají postiženy jako samotný příznak choroby (Huntington 1872).

Statistika – výskyt

Prevalence HD se udává 5-7 nemocných HD na 100 000 lidí v západních zemích. Ale lidí „v riziku“ je několikanásobně více. Největší koncentrace lidí s HD se nachází u jezera Maracaibo ve Venezuele v Jižní Americe, kde je cca 700 nemocných na 100 000 lidí.

V roce 2003 byla vyhodnocena několikaletá studie populace lidí kolem jezera Maracaibo, kde se nachází 83 pokolení s HD. Kde bylo zjištěno, že v této konkrétní lokalitě: lidé s 34 CAG repeticemi, nebo méně jsou bez projevu nemoci, s 35–39 repeticemi prokazují neúplnou penetraci a lidé s více než 40 repeticemi vykazují plnou penetraci nemoci. Také zde bylo zjištěno, kromě jiného i to, že se z 38 % dědí i věk, kdy se nemoc projeví (Project and Wexler 2004).

Testování nemoci

Testování nemoci lze rozdělit do tří skupin: presymptomatické, symptomatické a prenatální testování.

Presymptomatické testování – Testování lidí před 18. rokem života se neprovádí, každý se musí rozhodnout sám po dosažení plnoletosti a po projití série psychologických testů (Binedell et al. 1996). Testování se provádí pomocí série psychotestů a série sezení s různými odborníky. Obvykle testování zabere kolem půl roku a jeho cílem je zjistit, zda „osoba v riziku“ (jak se odborně nazývají lidé s nemocným v rodině a s šancí na zdědění této choroby) přesvědčila všechny lékařské odborníky, se kterými má sezení, že výsledek svého testování chce vědět a případně, že je schopna žít s pozitivním testem nemoci. Toto testování má lidem pomoci tu zprávu unést a žít s ní. Existují totiž případy, kdy po potvrzení nemoci se pacient rapidně zhoršil, či spáchal sebevraždu. V posledních letech se pracuje na presymptomatickém testování, které by předpovědělo nemoc 7-12 let před prvními příznaky (Paulsen et al. 2014).

Symptomatické testování – Toto testování se děje bez návštěvy odborníka a dochází k němu po diagnóze lékaře, který má podezření na tuto chorobu

Prenatální testování – Prenatální diagnostika probíhá formou odebrání plodové vody matce a testování na HD. Existují, již možnosti umělého oplodnění, kdy jsou otestována vzniklá embrya a vybráno to zdravé. Dokonce je již možnost mít zdravé dítě, i když je matka zatím osobou v riziku.

Modely Huntingtonovy choroby

Je vytvořeno mnoho modelů HD pro lepší porozumění mechanismům této nemoci a pro testování nových terapeutických přístupů.

Tyto modely se dají dělit na několik skupin:

Buněčné linie – se využívají pro pochopení mechanismů HD a pro vývoj nových možných léků (Sipione and Cattaneo 2001). Problémem tohoto modelu je ale velmi malá aplikovatelnost na člověka.

Modely bezobratlých živočichů a obratlovců kromě savců – jsou velmi výhodné z hlediska rychlosti množení, nákladů na chov, potřebou místa a mnoha dalších aspektů. Patří sem hlavně *Drosophila melanogaster*, hlísti z kmene Nematoda či ryba *Danio rerio* (Sipione and Cattaneo 2001).

Modely savců – jsou popsány níže.

Malé zvířecí modely

Transgenní myši: Klasické modely transgenních myší jsou připravovány různými metodami. Mezi hlavní patří vnesení exogenního genu pro huntingtin náhodně do myšího genomu, kdy dochází ke vnesení části nebo celého genu a dále knock-in modely, pomocí např. CRISPR/Cas technologií (Kolli et al. 2017). U metody vložení exogenního genu je problém s náhodným vnesením, protože tím vzniká riziko vlivu jiných genů nesouvisejících s HD. U některých experimentů se přesto povedlo vnesení na správné místo a tyto myši přesně kopírují symptomy HD a stávají se velmi dobrým genetickým modelem HD. Existuje mnoho modelů s různým počtem repeticí a různou délkou vneseného genu. U knock-in modelů se obecně dá říci, že průběh choroby je mírnější.

Transgenní linie myši R6/2 (Mangiarini et al. 1996)– Tato linie byla vytvořena pomocí trojitě integrace, ale ve výsledku se linie chová jako myš s jedním vloženým fragmentem. Tyto myši nesou fragment se 144 CAG repeticemi. První projevy nemoci nastávají mezi 9–11 týdny života a smrt nastává mezi 10–13. týdnem života. Tato linie se vyznačuje značnou neurologickou progresí nemoci. Jedním z prvních příznaků je dyskineze končetin při čištění ocasu. Nejvýznamnější znak této linie je tzv. pozice feet-clapsing (Obr. 1), kdy je myš držena za ocas vzhůru nohama a R6/2 myši se schoulí a drží zkroucené packy, na rozdíl od zdravých myší, které normálně natažené visí.

Tento znak je výborným rozpoznávacím nástrojem u mladých myší nové linie, zda jsou transgenní či ne. Samice této linie jsou sterilní, na rozdíl od samců. (Mangiarini et al. 1996)



Obrázek 1: Clapsing u TgHD myši (napravo) ve srovnání s Wt myši (nalevo) (foto Šárka Kučerová)

Transgenní linie myši použité v biochemickém testování – R6/2 myši mají problém s fertilitou, proto byly použity samičky s transplantovanými vaječníky, které byly připouštěny k B6/2 wild-type samcům. Mláďata z tohoto spojení vznikala buď heterozygotní nebo wild-type.

Krysí modely: Krysy jsou lepšími modelovými zvířaty než myši z mnoha důvodů, jako jsou: větší možnosti behaviorálních a zobrazovacích studií, které mohou lépe zmapovat výsledky neurodegenerativních chorob a také jsou lepším modelem pro dlouhodobější studie, z důvodu jejich delšího věku přežívání.

První krysí model HD byl vytvořen roku 2003, bylo vneseno mikroinjikací 51 CAG repetice pod kontrolou krysího endogenního Htt promotoru. Tato nová linie byla fertilní u obou pohlaví a prokazovala symptomy podobné lidské formě HD s pozdním nástupem (von Horsten et al. 2003).

Velké zvířecí modely

Velké zvířecí modely začaly vznikat až po malých modelech. Jedním z důvodů byl nedostatek zkušeností s přípravou velkých transgenních živočichů, protože malá modelová zvířata jsou snáze produkována díky větší homologní rekombinaci. Ale malé modely jsou velmi odlišné od člověka, a proto také některé potencionální léky funkční u malých modelů nefungují u lidských pacientů. Malé zvířecí modely jsou velmi snadné pro manipulaci a chov a splňují daná kritéria pro možnosti modelů, ale jsou velmi fyziologicky odlišné od člověka. Proto bylo nutné začít tvořit modely velkých zvířat. Velká zvířata jako jsou ovce, prasata jsou váhově a stavbou těla velmi podobní člověku, mnohem příbuznější než např. myši. Proto by mohla být vhodnějšími modely pro možné preklinické testování.

Jako nejlepší příbuzný zvířecí model člověku se jeví primáti, ale zde vyvstávají velké etické problémy, proto jsou primáti vybíráni spíše pro behaviorální a kognitivní testování, ale ve velmi malém množství. Proto přicházejí na řadu další zvířata, jako jsou ovce a prasata. Oba modely byly zkoušeny, ale k nejvýznamnějším pokrokům zatím došlo u modelu prasete.

Nehumánní primáti – V roce 2008 byl vytvořen transgenní model HD – makak rhesus. Model byl vytvořen mikroinjikací lentiviru exprimující exon 1 lidského Htt s 84 CAG repeticemi pod kontrolou lidského promotoru do maturovaných oocytů a druhého lentiviru exprimující fluorescenční GFP protein. Tyto oocyty byly následně oplodněny a vloženy do samiček. U takto vytvořeného modelu byly pozorovány motorické změny. Tento model nabízí velké možnosti pro popis HD nemoci a pro případné léky (Yang et al. 2008). Ale u primátů je problém s etikou a financováním.

Miniprasata a ovce – Tyto modely jsou velkou nadějí v možné léčbě HD. Ovce a prasata mají podobnou velikost jako lidé a velmi podobnou fyziologii, proto se zdají být velmi vhodným kandidátem na transgenní model HD.

Ovce – První model byl vytvořen roku 2010 pomocí vložení celého genu pro Htt s 73 CAG repeticemi do prvojádra zygoty. Celý gen pro Htt byl exprimován v tkáních CNS i tkáních nespjatých s nervovou soustavou. Narozená transgenní zvířata nevykazovala přímé fyziologické poruchy spjaté s HD, ale je zde možný projev až ve vyšším věku (Jacobsen et al. 2010).

Miniprasečí model HD

První transgenní miniprase bylo vytvořeno klonováním – konkrétně přenosem jader. Tento model ovšem trpěl velmi vysokou embryonální letalitou (Yang et al. 2010).

Proto bylo vytvořeno nové transgenní miniprase na Akademii věd v Liběchově. Původ miniprasat pochází z křížení miniprasat z Univerzity v Minesotě a z Univerzity v Göttingenu v Německu (Vodička et al. 2005).

Tento model vznikl mikroinjkcí lentivirového vektoru do miniprasečích embryí (ve stádiu zygoty), který kóduje N-terminální část lidského huntingtinu kódujícího 548 aminokyselin, 124 CAG repetit pod kontrolou promotoru lidského Htt. Transgen byl vymezen na první chromosom a genomová analýza potvrdila, že nebyla přerušena žádná kódující sekvence. Takto vznikla transgenní linie, která je stabilní již několik generací. Tento model je schopen reprodukce a část potomků z každého vrhu je transgenní (Baxa et al. 2013).

Popis modelu

Behaviorální změny – U tohoto modelu zatím nedošlo k projevu žádných behaviorálních či motorických změn charakteristických pro pacienty s HD. Může to být dáno kvadruplegií, která způsobuje vyšší stabilitu, či zatím nízkým věkem miniprasat. Zatím byla testována pouze F3 generace TgHD miniprasat z Liběchova, která byla propůjčena na Institut Georga Huntingtonga do Münsteru. Tyto prasata byla testována několika testy, jako je např. GAITrite, Hurdle test, Tongue test a další. Je totiž známo, že většina pacientů má problémy s řečí, artikulací a ovládním jazyka (Tykalova et al. 2014). Zatím toto testování na miniprasatech nepřineslo žádné výsledky, ale to může být dáno hlavně nízkým věkem těchto zvířat (Schramke et al. 2015, 2017).

Vokalizační změny – Vokalizace byla již studována na zpěvných ptácích, kteří měli vnesený mtHtt. Tyto ptáci vykazovali změny ve vokalizaci v závislosti na HD (W. Liu et al. 2015). Na miniprasatech byla studie vokálních změn také provedena (Tykalova et al. 2017).

Telemetrie – Pacienti s HD trpí spánkovou deprivací a poruchami cirkadiálních rytmů, často již před projevem klasických symptomů spojených s HD. Na miniprasatech byla studována jejich denní a noční aktivita, byly srovnávány skupiny Tg a Wt prasat. Byl zjištěn signifikantní pokles aktivity Tg miniprasat v ranní době mezi probuzením a ranním krmením ve srovnání s Wt skupinou. Tento pokles může být způsoben poruchou v energetickém metabolismu spjatou s HD (Pokorný et al. 2017).

Schopnost reprodukce samců – Samci tohoto miniprasečího modelu ztrácí s věkem fertilitu. Množství spermií v ejakulátu a jejich hybnost klesá kolem 13 měsíce života Tg samců (v porovnání v Wt sourozenci) a se zvyšujícím věkem zůstávají hodnoty stejné. Navíc klesá i schopnost oplození oocyty u Tg samců miniprasat a narůstá počet strukturálních abnormalit spermií – jako jsou deformace v oblasti bičíku, poruchy odvržení cytoplazmy, nestabilita akrozomu a další. Kromě poruch spermií, dochází kolem 24. měsíce věku k degeneracím na varlatech – zvýšená apoptóza Sertoliho buněk i spermatocytů. Tyto poruchy jsou pravděpodobně způsobeny přítomností mtHtt v bičíku spermií (Macakova et al. 2016).

Neurodegenerace miniprasat – MRI testování prokázalo souvislost mezi atrofií mozku a postupem HD u lidských pacientů (Scahill et al. 2013). Proto bylo u F3 generace v Münsteru zahájeno MRI skenování mozku TgHD miniprasat (Hözlner et al. 2012). Na tomto modelu byly testovány i markery předcházejících neurodegenerací, jako např.: medium-size spiny neuron marker (DARP32), který se u TgHD miniprasat snižuje ve striatu ve věku 16 měsíců (Baxa et al. 2013). Byl studován i imunitní systém a jeho reakce a bylo nalezeno několik markerů (např. INF α), které ukazují imunopatologické dopady HD na organismus TgHD miniprasat. Tyto markery tak mohou být využity jednak jako ukazatele postupu choroby, ale také jako další terapeutický cíl (Valekova et al. 2016).

Behaviorální testy – velké zvířecí modely

Velké zvířecí modely

Posouzení bolesti u zvířecích modelů osteoartritidy – konkrétně u psů, ovcí, koz a koní. U těchto zvířat byly používány tyto metody: přímé pozorování, přístrojová analýza chůze a subjektivní hodnocení. Výsledky naznačují, že zatím žádný model nemimikuje přesně vývoj nemoci u člověka. (Piel et al. 2014)

Prasečí model – netransgenní modely

Efekt účinnosti krmení na nové stimuly – Byla zkoumána prasata, vyšlechtěna za tímto účelem a jejich reakce na stimuly v závislosti na účinku krmení. Prasata postupovala dva testy v ohrazené části místnosti – první test (HAT) vypadal tak, že na druhé straně ohrady stál člověk v oranžové kombinéze a druhý test (NOV) byl rozdílný v tom, že tam nebyl člověk ale oranžový dopravní kužel. Výsledky tohoto testu naznačují, že jsou jen malé rozdíly v přijímání potravy prasete při různých stimulech podporujících strach. Větší rozdíly nastávaly spíše v závislosti na pohlaví zvířete než na stimulech (Colpoys, Abell, and Gabler 2015).

Miniprasečí model – model Huntingtonovy choroby

Behaviorální fenotypizace transgenních HD miniprasat – V této studii byla použita miniprasata stará průměrně 3,5 let, konkrétně F3 generace HD miniprasat vytvořených v Liběchově. Miniprasata byla nejprve navyknuta na lidi a poté na prostředí, kde byla testována a také na testovací metody. Bylo zde použito 6 různých metod:

GAIT Rite – Je pás na monitorování chůze, po kterém miniprasata musí rovnoměrně přejít a tato data jsou vyhodnocena pomocí Gait Rite softwaru.

Hurdle test – je test, kdy miniprase musí v boxu počkat 30 s a poté přejít na druhou stranu boxu a v cestě má dvě překážky.

Tongue coordination test – je založen na prokázaných problémech pacientů s ovládním jazyka. V tomto testu musí miniprase vyndat pamlssek z různě hlubokých žlábků.

Discrimination test – je test, který je založen na vybrání správného boxu ze tří boxů.

Startbox back and forth test – zde musí miniprase vyhledat správný box – jeden ze tří, který je otevřen pro východ.

Dominance test – V tomto testu byla miniprasata donucena čelit druhému minipraseti a bylo hodnoceno, jak dominantně se miniprase zachová. Výsledkem tohoto testování byly neprokazatelné rozdíly mezi Tg a Wt miniprasaty. (Schramke et al. 2015)

Materiál a metody

Materiály

	Chemikálie	Koncentrace	Množství
RIPA pufr - 30 ml	NaCl	150 mM	263 mg
	EDTA (pH = 8)	5 mM	300 µl
	Tris HCl (pH = 7,4)	50 mM	750 µl
	NP-40	0,05%	150 µl
	deoxycholát sodný	1%	300 mg
	Triton X - 100	1%	300 µl
	SDS	0,10%	300 µl
TTBS - 1 l	NaCl		8 g
	Tween		0,5 ml
	Tris (pH = 7,6)	2 M	10 ml
	Destilovaná voda		do 1 l
5 % mléko - 50 ml	sušené mléko Laktino		2,5 g
	TTBS		50 ml
Vzorkový pufr - 30 ml	SDS	10%	6 ml
	Millipore voda		24 ml
Promývací pufr - 20 ml	SDS	2%	1 ml
	Millipore voda		19 ml
Running pufr - 800 ml	Tris-acetate SDS Running buffer	20 x	40 ml
	Vychlazená destilovaná voda		do 800 ml

Tabulka 3: Seznam použitých materiálů

Laboratorní metody

Genotypizace transgenních prasat a myši

Postup:

Byla používána TgHD miniprasata z Liběchova.

Při pokusech se také používaly R6/2 myši jako kontroly průběhu fenotypu u miniprasat. R6/2 myši mají problém s fertilitou. Proto byly koupeny samičky s transplantovanými vaječníky a připouštěly se k B6/2 wild type samcům. To znamená, že narozená mláďata byla buď wild type nebo heterozygoti. Primery byly koupeny podle doporučení Jacksons lab protokolu pro tyto myši.

oIMR1594TgFw CCGCTCAGGTTCTGCTTTTA

oIMR1596TgRv1 TGGAAGGACTTGAGGGACTC

Odebrání vzorků

Myším byly označeny uši a useknuty konce ocásků, z kterých byla provedena genotypizace. Vše bylo pečlivě popsáno. U miniprasat byly odebrány kousky kůže pro genotypizace z oblasti za ušima hned po jejich odstavení od matky (Baxa et al. 2013).

Izolace DNA

Kousky ocásků (kůže z uší) byly nakrájeny na cca 3 mm části a byly dány do mikroskopických zkumavek. Ke každému vzorku bylo přidáno 600 μ l vychlazeného NaOH. Takto připravené vzorky byly vařeny v termobločku (Thermomixer comfort, Eppendorf) po dobu 1,5hod. Po uplynutí doby byly vzorky dány do vortexu (MPW-50, Mechanika Precyzyjna), dokud se tkáň nerozpadla. Byl přidán Tris a vzorky byly stočeny (M-24 A, Boeco). Supernatant byl odpipetován do nových mikroskopických zkumavek a tímto postupem byly získány vzorky DNA.

PCR reakce

Na PCR reakci byla použita Taq polymeráza (Master mix, Biotech).

Výpočet reakce:

Počet vzorků + 3 kontroly = zaokrouhlení nahoru pro větší jistotu.

počet vzorků a kontrol (x) * 10 = μ l Mastermix (TAQpolymeráza s pufrem, Biotech)

x * 5 = μ l RNA-free voda

x * 1 = μ l forward primer (10uM)

x * 1 = μ l reverse primer (10uM)

Během celého ředění bylo uchovááno vše neustále na ledu.

Všechny vzorky byly zpracovávány v duplikátech.

Byly připraveny stripy (EU Semi-domed-8-cap strip, Bioplastics) – popsány a nasazena víčka.

Do stripů bylo napipetováno 18 μ l mixu s Taq polymerázou a primery a 2 μ l DNA (z každého vzorku). Jako kontroly byly použity Tg a Wt vzorky z minulého genotypizování a jako negativní kontrola byla použita voda. Stripy byly zavřeny víčky a byly dány do centrifugy (2100M, Hermle) na 1 min.

Vzorky byly dány do cykleru (Thermocycler, Biometra) a spuštěn program.

Příprava agarózového gelu

Byl připraven 1,5 % roztok agarózy v TBE pufru: 6 g technické agarózy (Fisher, Bioreagents) + 400 ml pufru (Tris). Roztok byl dán do mikrovlnky zhruba na 3 min (dokud roztok nezačne vařit, musí se pravidelně míchat kvůli utajenému varu). Roztok byl nechán vychladnout. 400 ml TBE pufru vychází na dva gely: + 16 μ l červeného barviva (4 μ l na 100 ml pufru) (Gel Red Nukleotid Acid, Biotinium). Vaničky na gel (Consult EV231, Elektrophoresis Porere supply) byly oblepeny izolepou – pro lepší těsnění. Roztok byl rozdělen do vaniček, byly rozehnány bubliny, vloženy hřebeny a gely byly nechány ztuhnout – cca 15 min.

Elektroforéza

Vzorky byly vyndány z cykleru a stočeny. Z gelů byly vyndány hřebeny a odlepeny izolepy a gely byly přendány do van pro elektroforézu (Consult EV231, Elektrophoresis Porere supply). Marker byl napipetován na první místo a pak postupně byly nanášeny všechny vzorky. Vany byly zavřeny a byla spuštěna elektroforéza – na 90 V na cca 1,5hod.

Vyhodnocení

Gely byly vyfoceny (Multimage Light Cabinet, Alpha Imotec Corporation) a výsledky vyhodnoceny.

Western blot

Postup:

Příprava tkáně

Tkáň, uchovávaná v mrazáku o -80°C , byla uříznuta skalpelem a v hmoždíři byla rozdrcena v tekutém dusíku na prášek.

Lýza vzorku

Ke každému připravenému vzorku tkáně bylo přidáno odpovídající množství lyzačního pufru (RIPA) s inhibitory fosfatáz (10 $\mu\text{l/ml}$, Calbiotech) a s inhibitory proteáz (20 $\mu\text{l/ml}$, Calbiotech). Poté byly vzorky uloženy na led a v průběhu 30 minut byly každých 10 min zvortexované (MS2 Minishaker, IKA). Potom byly vzorky umístěny do sonikátoru (D-78224 Singen/HTW, ELMA) při 0°C na 15 minut a následně 15 minut centrifugovány (Allegra X-22R Centrifuge, Beckman Coulter) při 4°C a 10 000g. Ze vzorků byl odsán supernatant, který byl dále zpracováván.

Měření koncentrace proteinů

Po každé lýze byla měřená koncentrace proteinů pomocí kitu (Pierce BCA Protein Assay Kit 660 nM, ThermoFisher). Měření probíhalo v 96 jamkové destičce, kde byly napipetovány vzorky v duplikátech s fyziologickým roztokem a ředící řada s lyzačním pufrem. A to tak, že do 1. jamky byl napipetován Blank (3 μl fyziologického roztoku + 3 μl lyzačního pufru), dále byla napipetována ředící řada (3 μl vzorku z ředící řady + 3 μl lyzačního pufru). Do ostatních popsaných jamek byl napipetován fyziologický vzorek a jednotlivé vzorky tkání (3 μl vzorku + 3 μl fyziologického roztoku).

Koncentrace proteinů v jednotlivých vzorcích byla změřena pomocí spektrofotometru při vlnové délce 660 nm (program: Gen5 2.09, Synergy/HTX, BioTek). Pokud koncentrace proteinů ve vzorcích byla příliš vysoká, byl vzorek naředěn. Následně byla změřena koncentrace proteinů stejným způsobem jako u neředěných vzorků. Výsledky měření byly zpracovány v programu Excel. Zde byl vytvořen graf pro ředící řadu a získána rovnice pro výpočet koncentrace jednotlivých vzorků.

Každý vzorek byl přepočítán na koncentraci proteinu 20 µg a podle toho bylo dopočítáno množství RIPA pufru s inhibitory na stejný objem ve všech mikrozkuvkách.

Dále bylo přidáno odpovídající množství 4*koncentrovaného loading pufru (4* koncentrovaný LDL Sample Buffer, ThermoFisher) a redukce (10*koncentrovaný NuPAGE Sample Reducing Agent, ThermoFisher). Vzorky byly krátce stočené na stolní centrifuze (Centrifuge 5415 D, Eppendorf) a následně povařené v termobločku (CH 100 Cooling Heating Thermostat, Biosan) při 95 °C po dobu 5 min.

Elektroforéza/SDS-PAGE

Byla sestavena aparatura pro elektroforézu (xCell Surelock, Invitrogen). Do aparatury byl vložen gel (NuPAGE 3-8 % Tris-Acetate Gel, 1.00 X 10 well/ 1.00 x 15 well, Life technologies) a do prostoru mezi gely byl nalit running pufr, do kterého byl přidán antioxidant (500 µl, NuPAGE Antioxidant, Invitrogen). Poté byly na gel nanášeny vzorky spolu s markerem (HiMark, BioRad) a do aparatury byl nalit zbytek pufru. Elektroforéza běžela při 150 V po dobu cca 1,5 hod.

Western blotting/Přenos

Po doběhnutí elektroforézy byl gel vyjmut, označen v levém dolním rohu a promyt 15 minut v Huntingtin pufru. Následně byl sestaven blotovací sendvič (iBlot Gel Transfer Stacks Nitrocellulose, Mini, Life Technologies), tlustý filtrační papír, membrána, na kterou byl opatrně v rukavicích vložen gel – orientován pomocí označeného levého dolního rohu a překryt dalším filtračním papírem. Malým válečkem byly vytlačeny bubliny a sendvič byl vložen do blotovacího zařízení (iBlot, Invitrogen). Přenos trval 7 minut při 20 V. Následně byl blotovací sendvič rozebrán a membrána s přenesenými proteiny byla ostříhnutá a označena také vlevo dole.

Blokování

Po blottingu byla membrána blokována v 5 % mléce v TTBS (Tris-Tween Buffered Saline) minimálně 1 hodinu.

Imunoznačení

Následně byla membrána vložena do falkony s primární protilátkou naředěnou v blokovacím pufru (*Mouse-derived anti-3B5H10, ředění 1:3000, Sigma Aldrich; Rabbit-derived anti-EPR5526, ředění 1:10 000, Abcam, PHP protilátka dar od Ali Khoshnana, California Institute of Technology, Pasadena, USA, ředění 1:1000*).

Inkubace probíhala přes noc na rolleru v chladničce. Potom byla membrána promyta 3 x 10 min v TTBS a 1 hodinu inkubovaná v sekundární protilátce naředěné v blokovacím pufru (*anti-mouse nebo anti-rabbit podle primární protilátky, ředění 1:10000*). Po hodině byla membrána znova promyta 3 x 10 min v TTBS. Do falkony bylo poté přidáno malé množství sodium azidu pro zachování protilátky pro další použití.

Vyvolání

Na membráně byl vyznačen marker pomocí speciálního pera pro zviditelnění proteinů (Western Sure Pen, LI-COR) a následně byla membrána inkubována 5 minut v roztoku ECL – roztok byl nakapán na membránu položenou na rovné misce (0,5 ml Solution A + 0,5 ml Solution B, ECL Prime Western Blotting Detection Reagent RPN 2232, GE Healthcare).

Na vyvolání membrány byla použita chemiluminiscenční kamera (program Image Lab, ChemiDoc MP Imaging System, BIO-RAD). Po dokončení vyvolávání byla membrána opět promyta v TTBS, nechána vyschnout a uložena do mrazáku o – 20°C pro pozdější účely.

Přeznačení-deaktivace navázané protilátky peroxidázou

Membrána byla promyta třikrát 10 minut v TTBS, přendána do falkony s 2 ml 30 % peroxidu a inkubována po dobu 30 minut na rolleru (Roller mixer SRT1, STUART, P-LAB a.s.) při pokojové teplotě. Poté byla membrána promyta třikrát 5 minut v TTBS, zablokována v 5 % mléce v TTBS po dobu 30 minut a následně znova přeznačena jinou protilátkou. Membrána byla vložena do falkony s 5 % mlékem a primární protilátkou na noc. Další postup viz. bod Vyvolání.

Barvení membrány na celkový protein pomocí MemCode

Membrána byla obarvena barvou Memcode (LifeTech) pro stanovení celkového množství proteinu pro kontrolu nanášky. Po obarvení byla membrána oskenována (program Image Lab, ChemiDoc MP Imaging System, BIO-RAD). Sken byl použit pro automatickou normalizaci příslušného imunoblotu.

Filter retardation

Postup:

Příprava tkáně

Viz. Western blotting

Lýza vzorku

Viz Western blot s výjimkou: Pouze polovina vzorků byla centrifugována, aby byl vidět rozdíl mezi centrifugovanými vzorky a necentrifugovanými. U necentrifugovaných vzorků nedocházelo ke stočení vyšších struktur, a to se poté promítlo ve výsledcích.

Měření koncentrace proteinů

Viz Western blot, kromě:

Koncentrace proteinů byla stanovena na 30 μg a podle toho bylo dopočteno množství vzorků a objem vzorkového pufru do celkového objemu 200 μl . Výsledné hodnoty vzorků a vzorkového pufru byly napipetovány do nových mikrozskumavek.

Filter retardation assay

Membrány (Celulose Acetate Membrane Filters, Sterlitech) byly rozděleny tužkou na 4 části a popsány. Dále byly inkubovány po dobu 10 minut ve vzorkovém pufru. Mezitím byla sestavena skleněná aparatura pro odsávání. Membrána byla položena na fritu a bylo puštěno odsávání. Na membránu byly postupně nakapány vzorky, vždy daný vzorek do daného výseku membrány. Po nakapání všech 4 vzorků byla celá membrána promyta dvakrát 1 ml promývacím pufrem. Poté bylo odsávání vypnuto a membrána byla uložena do 5 % mléka pro zablokování.

Imunozačení a další postup viz. Western blot.

qPCR

Postup:

Homogenizace tkáně

Určená tkáň byla nakrájena a zvážena, aby měla cca 30 mg. Poté byla tkáň rozkrájena na malé kousky pomocí nůžek. K rozdrčené tkáni byl přidán 1ml TRIZolu a tkáň byla dále homogenizována jehlou 20G– protáhnout tkáň přes jehlu minimálně 5krát, aby byly kousky co nejméně viditelné. Vzorek byl ponechán po dobu 5 minut na ledu.

Izolace RNA

RNA byla izolována kitem (Quigene). Ke vzorku bylo přidáno 100 μ l gDNA eliminator solution a vzorek byl 15krát protřepán a zvortexován po dobu 5 s. Následně bylo přidáno 180 μ l chloroformu a vzorek byl 15krát protřepán. Tkáň byla inkubována 5 minut na ledu. Vzorek byl centrifugován 15 minut při 12000 g a 4°C a poté byl vrácen na led. Horní vodná fáze (cca 500 μ l) byla odebrána do nové mikrozkušavky a k ní byl přidán stejný objem 70 % EtOH. Pipetou byl vzorek přenesen na kolonku a kolonka se vzorkem byla centrifugována 20 s při 8000 g. Tekutina byla odsáta. Dále bylo přidáno 700 μ l RW1 pufru a opět byl vzorek centrifugován po dobu 20 s při 8000 g a zbylá tekutina byla odsáta. Bylo přidáno 500 μ l RPE pufru a tkáň byla centrifugována při 8000 g po dobu 20 s. Následně bylo znovu přidáno 500 μ l RPE pufru a vzorek byl centrifugován 2 min při 8000 g. Přebytečná tekutina byla odsáta a byla provedena centrifugace nasucho 1 min při 8000 g a poté byla kolonka se vzorkem přenesen do nové Eppendorfovy zkumavky a byla sušena po dobu 5 minut. Nakonec bylo přidáno 30 μ l RNAasa-free vody, vzorek byl inkubován 1,5 min při pokojové teplotě a následně byl vzorek centrifugován 1 min při 8000 g a tento postup byl opakován znovu s 30 μ l vody. Tímto byla RNA eluována ven z kolonky a byl získán konečný vzorek RNA.

Vzorek byl umístěn na led a byla změřena koncentrace RNA na nanodropu (ND-1000, Spectrophotometer).

Vzorek byl uschován v mrazáku o – 20°C.

Příprava cDNA

Vzorky RNA byly naředěny na koncentraci 10 μ g/ μ l. Pro přípravu cDNA byl odebrán do nové zkumavky 1 μ l tj. 1 μ g RNA a zbytek byl zamražen pro další použití.

Pro přípravu cDNA byl použit kit pro RT-PCR. Do jednotlivé zkumavky se vzorkem RNA bylo přidáno 19µl supermixu obsahující reverzní transkriptázu, pufr a oligo dT. Takto připravené vzorky byly vloženy do cykléru a byl zvolen daný program (50 °C, 30 min).

Real Time PCR

Pro kvantifikaci mRNA byl použit SYBR Green kit.

Předem byly navrženy primery specifické pro lidský mutovaný N-terminální huntingtin na hranici intronů z důvodu eliminace amplifikace DNA (velikost produktu 73 bp (párů bazí)) pomocí Primer 3 programu.

HTT: F: 5' TCAGAAATGCAGGCCTTACC3' R: 5' TGATTCTTCGGGTCTCTTGC3'

Dále byly použity primery pro GAPDH (glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenáza) a ACTB (aktin), které byly aplikovány jako referenční geny.

GAPDH: F:5' CGTCAAGCTCATTTCCTGGTACG3'

R:5'GGGGTCTGGGATGGAAACTGGAAG 3'

ACTB: F: 5' GAGAAGCTCTGCTACGTC 3' R: 5' CCAGACAGCACCGTGTTGG 3'

Vzorky byly měřeny v triplikátech na 98 jamkové destičce.

10ul reakce obsahovaly:

5 µl SYBR GREEN, 0,2 µl forward primeru a 0,2 µl reverse primeru (buď pro mtHtt nebo GAPDH nebo ACTB), 3,6 µl vody a 1 µl cDNA z určitého vzorku nebo vody pro negativní kontrolu.

Destička byla zatavena fólií, dána do automatického zatavovacího systému (PCR Plate Seabr, Biorad) na 3 minuty při 100 °C, aby folie zapečetila destičku a nedocházelo ke ztrátám při vypařování. Následně byla dána do Thermocykleru (C1000 Touch Thermal Cykler) a byl spuštěn program BioRad Manager, kde byl vytvořen protokol pro měření: 98 °C po dobu 30 minut, 98 °C po dobu 10 minut a 59 °C po dobu 30 minut. Dále bylo nastaveno opakování cyklů a vložena melting curve: 65 °C → 95 °C po dobu 5 minut. Melting curve ukáže, zda se tvoří jen jeden produkt. Poté byly na destičce označeny vzorky a typ reakce a spuštěn program. Výsledky exprese mRNA mtHtt byly vztaženy na GAPDH a ACTB. Výsledky byly vyhodnoceny pomocí grafů v programu Excel.

Behaviorální metody

Tyto metody byly hodnoceny škálou 0-5 body, kdy 0 bodů je nejhorším hodnocením a 5 bodů je nejlepším hodnocením. Body byly uděleny podle dosažených předem stanovených hranic, 5 bodů bylo za plné splnění překážky.

5 bodů	100 % plnění
4 body	80 % plnění
3 body	60 % plnění
2 body	40 % plnění
1 bod	20 % plnění
0 bodů	0 % plnění

Tabulka 4: Hodnocení behaviorálních metod

Miniprasata zařazena do výzkumu:

Z F0 generace byla vzata prasata Tg F807 (Adéla, 1. narozené transgenní prase) + Wt F808.

Z F1 generace: Tg G117, Tg G118, Wt G122.

Z F2 generace: Tg K65, Wt K66, Tg K150, Wt K151, Wt K155, Tg K156, Tg K169, Wt K188, Tg K217, Wt K353.

Toy 1 Cover pan

Tato metoda je založena na zručnosti rypáku miniprasat. Zde bylo hlavní naučit miniprase otevřít dvířka v hračce pomocí rypáku a najít tam pamlsek. Bylo postupováno následovně: nejprve byl pamlsek na hračce a postupně byl dáván do děr s otevřenými, polootevřenými, a nakonec se zavřenými dvířky. Bylo zde hodnoceno, zda je jedinec schopen otevřít dvířka a najít pamlsek.

Toy 2 Skittles

U této metody se posuzuje, jak je jedinec schopen vzít do tlamy kuželku a odkrýt tak pamlsek uschovaný pod ní. Postupně byly objekty zkoumání seznámeny s hračkou a naučeny, že pod kuželkou se skrývá pamlsek. Byl zde souzen počet shozených či odstraněných kuželek, přičemž při odstranění kuželky z hračky byla objektu kuželka odebrána, protože někteří jedinci měli tendenci zaměřovat se na jednotlivé kuželky namísto hračky samotné.

Hurdle test

Byla zde posuzována schopnost překročit překážku – tyč v určité výšce. Také tu byl kladen důraz na to, jak objekt došlápne po překročení překážky – někteří jedinci měli s tímto problémem. Hodnoceno bylo celkové překročení překážky, či problémy s překážkou.

Tunnel test

Při tomto testu byl použit tunel, do kterého byly vloženy tři pamlsky v určité vzdálenosti od otvoru. Bylo hodnoceno, zda jedinec dokáže sníst všechny tři pamlsky – hrál zde roli také strach (pro poslední pamlsk muselo prase strčit hlavu dál do tunelu).

Seesaw test

Tato metoda se soustředí na strach zvířete a jeho motivaci. Přes stepper byla položena deska, na kterou bylo zvíře motivováno pomocí pamlsků vylézt. Pokud zvíře vylezlo výše než do poloviny, deska se pod jeho vahou zhoupala. Bylo hodnoceno, zda jedinec vyleze na desku, ustojí zhoupnutí a zda po zhoupnutí dokončí přechod přes překážku nebo vycouvá.

Leg test

Zvíře bylo pozorováno bez jakýchkoliv zásahů v ohraničeném prostoru, kde se pohybovalo a sbíralo pamlsky. Bylo hodnoceno, jak dává nohy před sebe, jak nohy vychyluje a jak je kříží.

Balance beam

Balance beam je ohraničená kladina a nástupní plošinou a plochou na konci pro otočení zvířete. Zde bylo hodnoceno, kam až jedinec vystoupí na nástupní plošinu, jestli projde kladinu, otočí se na plošinu a vrátí se zpět, nebo vycouvá.

Concentration test

V tomto testu bylo hodnoceno chování a reakce zvířete na pamlsky, překážky a hračky.

Stability test

Tento test byl prováděn bez jakýchkoliv pomůcek. Zvíře bylo necháno v ohraničeném prostoru procházet za pamlsky a v určitém okamžiku byl jedinec vychýlen, aby ztratil stabilitu. V tomto testu se sledovala hlavně reakce na změnu stability a schopnost ustát tuto změnu.

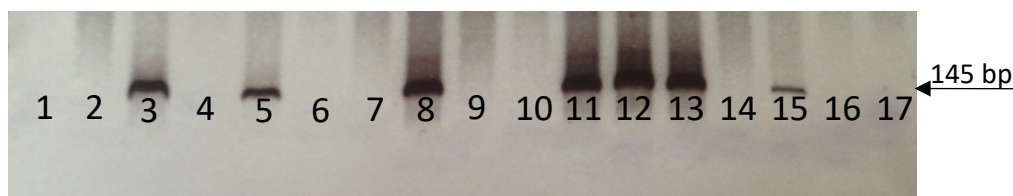
Výsledky

Genotypizace zvířat

Abychom mohli provádět srovnávání a pozorovat vývoj fenotypu u transgenních zvířat, bylo nutno po narození a odstavu zvířat určit jejich genotyp.

Výskyt mutovaného Htt u transgenních miniprasat

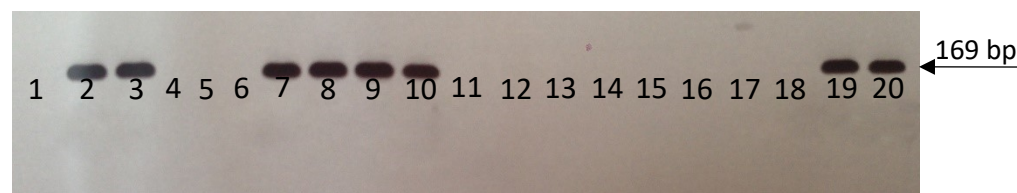
Byla zde identifikována nová generace miniprasat. Primery byly navrženy tak, že produkt se exprimoval pouze u Tg jedinců. Touto metodou se testují všechna nově narozená miniprasata na přítomnost transgenů (Obr. 2).



Obrázek 2: Určení genotypu Tg HD miniprasat, produkt – mtHtt se objevuje jen u transgenních jedinců o velikosti 145bp

Výskyt mutovaného Htt u transgenních myší

Byla zde identifikována nová generace 19 myší vzniklých spojením Tg samic s transplantovanými vaječníky R6/2 a Wt samců B6/2. Narozené myši byly buď heterozygotní pro mtHtt nebo Wt. Primery byly navrženy tak, aby tvořily produkt, jen u jedinců, kteří mají ve svém genomu lidský mutovaný Htt, tj. jsou transgenní (Obr.3). Genotypizace myší zde je ukázána jen jako srovnání k výsledku genotypizace miniprasat.



Obrázek 3: Určení genotypu transgenních myší, produkt – mtHtt se objevuje jen v u transgenních jedinců o velikosti 169 bp

Invazivní výsledky

Sledování genové exprese hladiny mRNA mtHTT v různých tkáních a u různě starých miniprasat

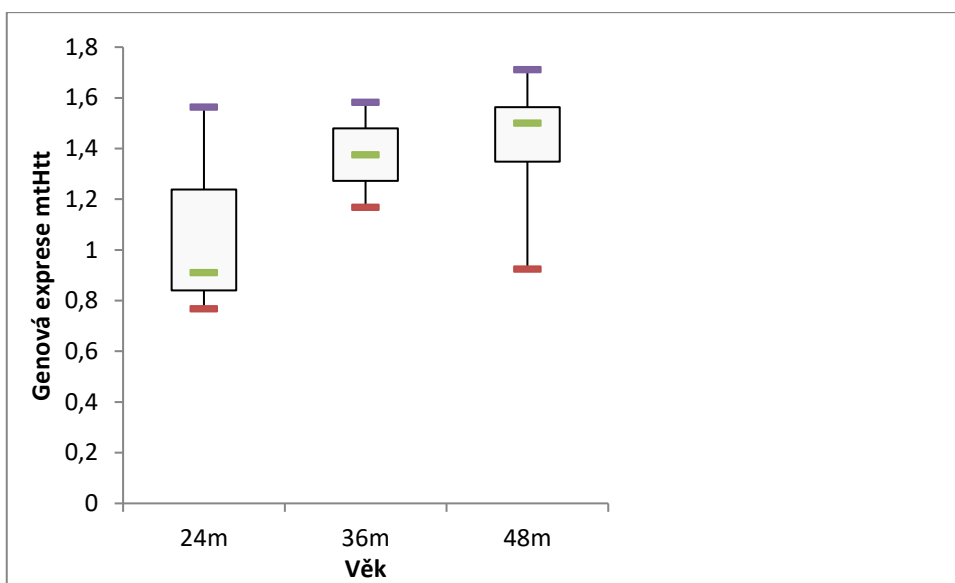
V této části diplomové práce byla sledována genová exprese hladiny mRNA mtHTT pomocí kvantitativní PCR. Kvantitativní PCR neboli real-time PCR je metoda používající se pro stanovení relativního množství mRNA v reakční směsi a je jedním ze základních nástrojů pro studium genové exprese konkrétních genů.

K této metodě byly použity vzorky tkání transgenních HD miniprasat odebrané post mortem.

Sledování genové exprese hladiny mRNA mtHTT v kortexu miniprasat starých 24, 36 a 48 měsíců

V tomto experimentu bylo zahrnuto 10 transgenních HD miniprasat: 3 ve věku 24 měsíců (K10, K55, K8), 3 ve věku 36 měsíců (K100, K104, K63) a 4 ve věku 48 měsíců (K101, K102, K162, K208).

Na Grafu 1 lze pozorovat postupné zvýšení genové exprese mtHtt v kortexu v souvislosti s věkem jednotlivých miniprasat. Kortex zde byl použit z důvodu vysokého množství HTT, které se v něm nachází. A také z důvodu velkého dopadu mtHTT na mozek a jeho degeneraci.

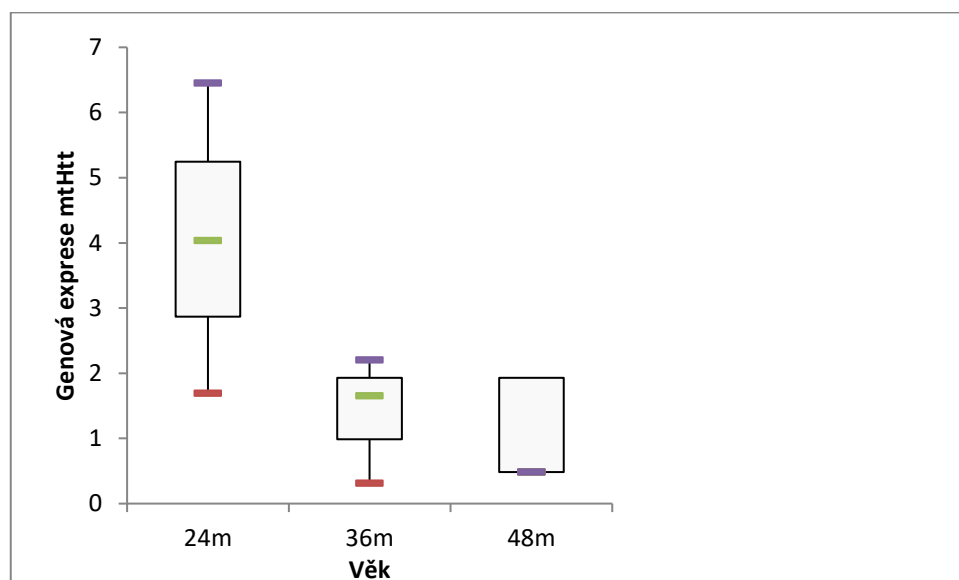


Graf 1: Genová exprese mtHTT v kortexu u 24, 36 a 48 měsíčních TgHD miniprasat normalizované na expresi housekeeping genu GAPDH a ACTB

Sledování genové exprese hladiny mRNA mtHTT ve varlatech miniprasat starých 24, 36 a 48 měsíců

Do tohoto experimentu bylo zařazeno 7 transgenních HD miniprasat ve věku 24 měsíců (K8, L557, L558), 36 měsíců (L93, K63, K104) a ve věku 48 měsíců (K162). Ve věku 48 měsíců bylo nalezeno jen jedno vhodné miniprase, tento fakt musí být zohledněn v náhledu na výsledky.

Na grafu 2 lze pozorovat snižující se tendenci množství mtHTT ve varlatech miniprasat s ohledem na věk. Z důvodu malého počtu vzorků 48 měsíčních miniprasat nejsou výsledky této skupiny signifikantní. Varlata byla použita z důvodu brzké degenerace u samců a tím pádem vysokého množství mtHTT v této tkáni (Macakova et al. 2016).



Graf 2: Genová exprese mtHTT ve varlatech 24, 36 a 48 měsíců TgHD miniprasat normalizované na expresi housekeeping genu GAPDH a ACTB

Sledování exprese mtHtt a jeho forem v různých tkáních a u různých starých miniprasat

Tato část výsledků je věnována sledování exprese proteinu mtHtt u různě starých miniprasat a u různých tkání z celého těla. mtHtt se exprimuje ve velikosti 124 CAG repetit (Baxa et al. 2013) a je vizualizován pomocí primárních protilátek 3B5H10 a EPR5526. 3B5H10 je primární protilátka proti polyQ. EPR5526 je primární protilátka proti Htt.

Ve výsledných obrázcích je vždy zobrazován v páru miniprasat první Tg a druhý Wt.

K tomu jsem sledovala i výskyt endogenního Htt (prasečího) pomocí vizualizace protilátkou EPR5526. Endogenní Htt se vyskytuje ve všech tkání bez rozdílu či je miniprase transgenní či wild type a vyskytuje se ve velikosti cca 360 kDa.

V metodách zkoumajících hladinu proteinu mtHtt a wtHtt v mozku post mortem bylo prokázáno, že hladina mtHtt a wtHtt se ve formě proteinu příliš neliší (Evers et al. 2015).

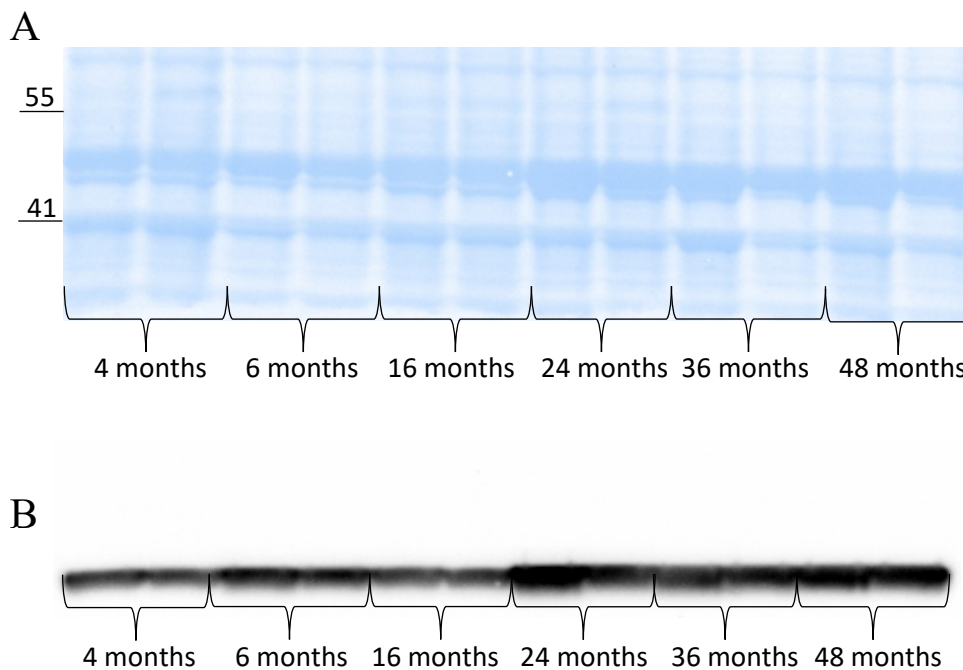
V této části výsledků je porovnáváno 9 párů miniprasat, jeden pár se vždy skládá z jednoho Tg prasete a z jeho Wt sourozence pro srovnání. Těchto 9 párů je rozděleno do 3 skupin podle věku: 24, 36 a 48 měsíců. První výsledek je shrnutí exprese mtHtt v kortexu miniprasat 6 různých věkových kategorií. Všechny výsledky byly vždy zopakovány.

Expresí mutovaného huntingtinu v kortexu u 4, 6, 16, 24, 36 a 48 měsíčních miniprasat

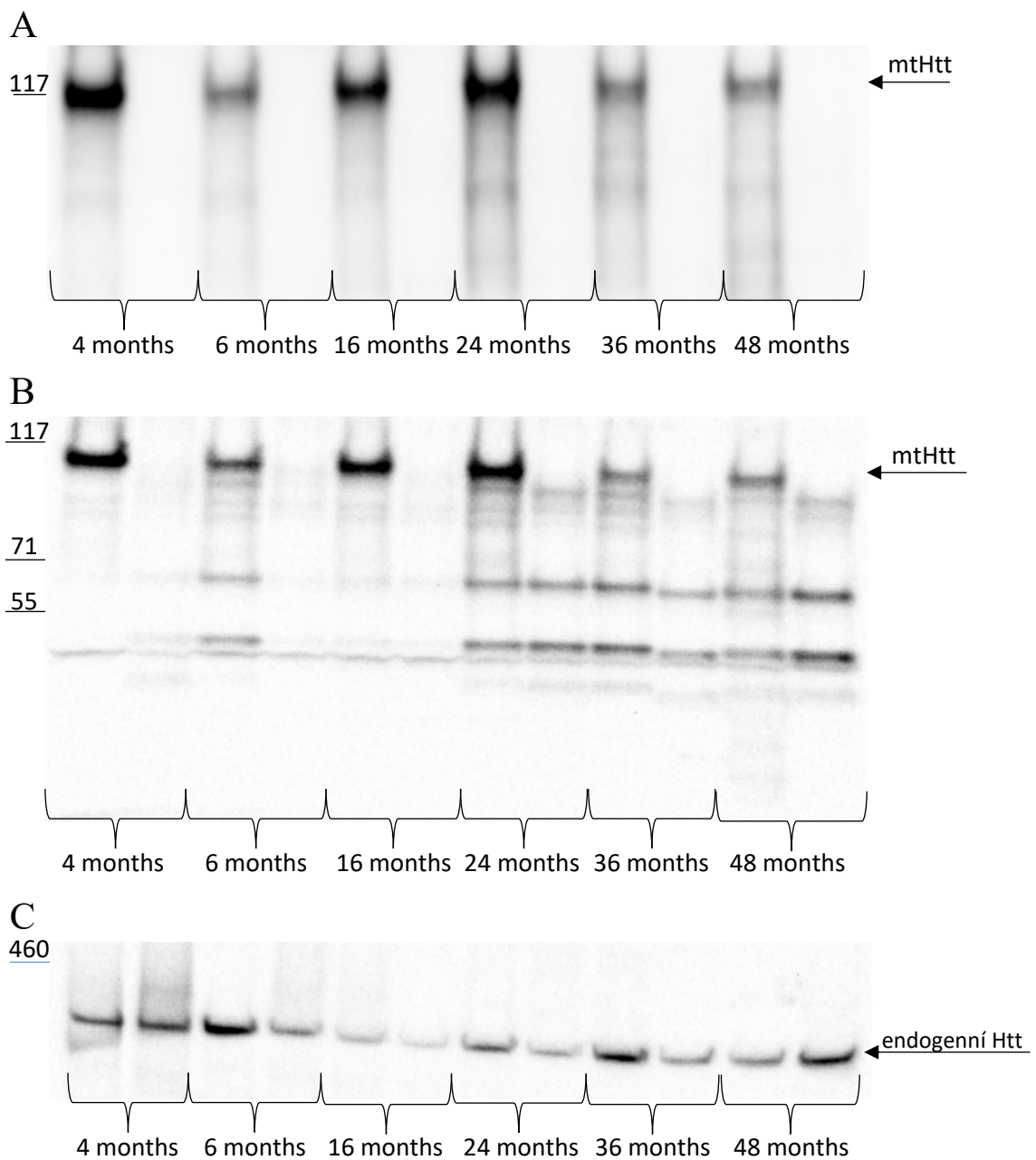
Zde byl srovnán výskyt mtHtt v kortexu miniprasat starých 4, 6, 16, 24, 36 a 48 měsíců.

U TgHD miniprasat se ukazuje stoupající množství mtHtt do věku 24 měsíců (Obr. 5a, 5b). Tento jev může být vysvětlen tak, že ve starším věku miniprasat je degenerace mozku v pokročilejším stádiu, a tudíž se již nenachází takové množství mtHtt v kortexu. Dále byla potvrzena hypotéza o přítomnosti endogenního Htt ve všech tkáních bez závislosti na přítomnosti transgenu (Obr. 5c).

Dále byla provedena kontrola množství proteinu pomocí MemCode a β -tubulinu (Obr. 4a, 4b).



Obrázek 4: Kontrola množství proteinu při testování Tg a Wt miniprasat starých 4, 6, 16, 24, 36 a 48 měsíců metodou Western Blotting, vizualizace: A – MemCode, B – β -tubulin.



Obrázek 5: Expres mtHtt a endogenního Htt v kortexu Tg a Wt párů miniprasat starých 4, 6, 16, 24, 36 a 48 měsíců vizualizována: A – primární protilátkou 3B5H10 – Pozorován vyšší výskyt mtHtt u TgHD miniprasat do věku 24 měsíců, B – primární protilátkou EPR5526 – Pozorován vyšší výskyt mtHtt u TgHD miniprasat do 24 měsíců věku, C – primární protilátkou EPR5526 – Endogenní Htt se vyskytuje u Tg i Wt miniprasat bez rozdílu věku.

Expresse mtHtt v různých tkáních miniprasat starých 24 měsíců

Do této kategorie jsou zahrnuty 3 páry miniprasat starých 24 měsíců: Tg L557 + Wt L556, Tg K8 + Wt K54, Tg K10 + Wt G363.

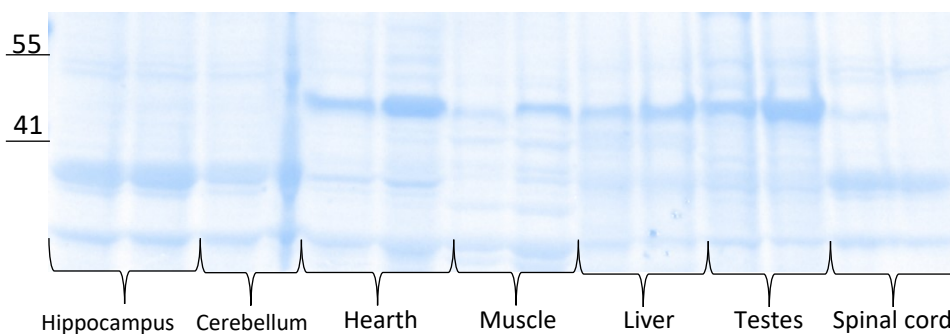
U těchto miniprasat byly zkoumány tkáně mozku (hippocampus, cerebellum), tkáně srdce (heart), svalů (muscle), jater (liver), varlat (testes) (nebo plic (lung) v případě samic) a míchy (spinal cord).

Při označení protilátkou 3B5H10 byla detekována exprese mtHtt výrazně větší v tkáních mozku (hippocampus a cerebellum), v tkáních míchy (spinal cord), varlat (testes) (eventuálně a v menším množství v tkáních plic (lung)). Také byly detekovány kratší fragmenty Htt hlavně v tkáních varlat a v menší míře v tkáních mozku (Obr. 7a, 8a, 9a).

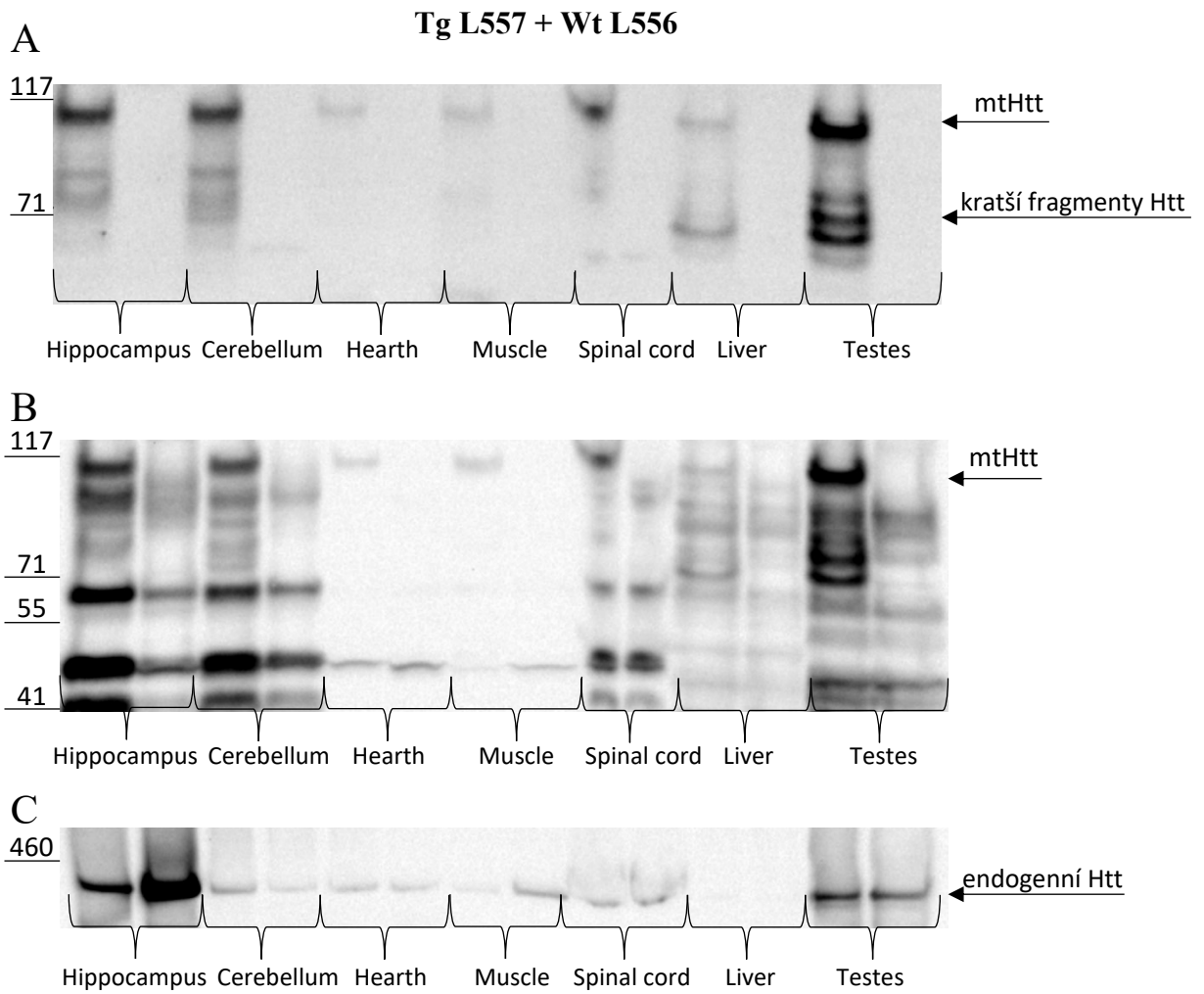
U značení protilátkou EPR5526 byly výsledky podobné jako u protilátky 3B5H10. Největší exprese transgenního mtHtt nastala v tkáních mozku (hippocampus a cerebellum), v tkáních míchy (spinal cord) a v tkáních varlat (testes) (eventuálně v menším množství v tkáních plic (lung)) (Obr. 7b, 8b, 9b). Protilátka EPR5526 navíc značí i endogenní Htt, který se exprimuje ve všech tkáních bez rozdílu (Obr. 7c, 8c, 9c).

Naopak v tkáních srdce (heart), svalů (muscle) a jater (liver) byla detekována exprese mtHtt velmi malá až zanedbatelná ve srovnání s tkáněmi mozku (Obr. 7b, 8b, 9b). Tyto výsledky odpovídají dřívějšímu popisu HD miniprasat (Baxa et al. 2013).

U všech tří párů byla provedena kontrola množství proteinu pomocí MemCode (př.: Obr.6).

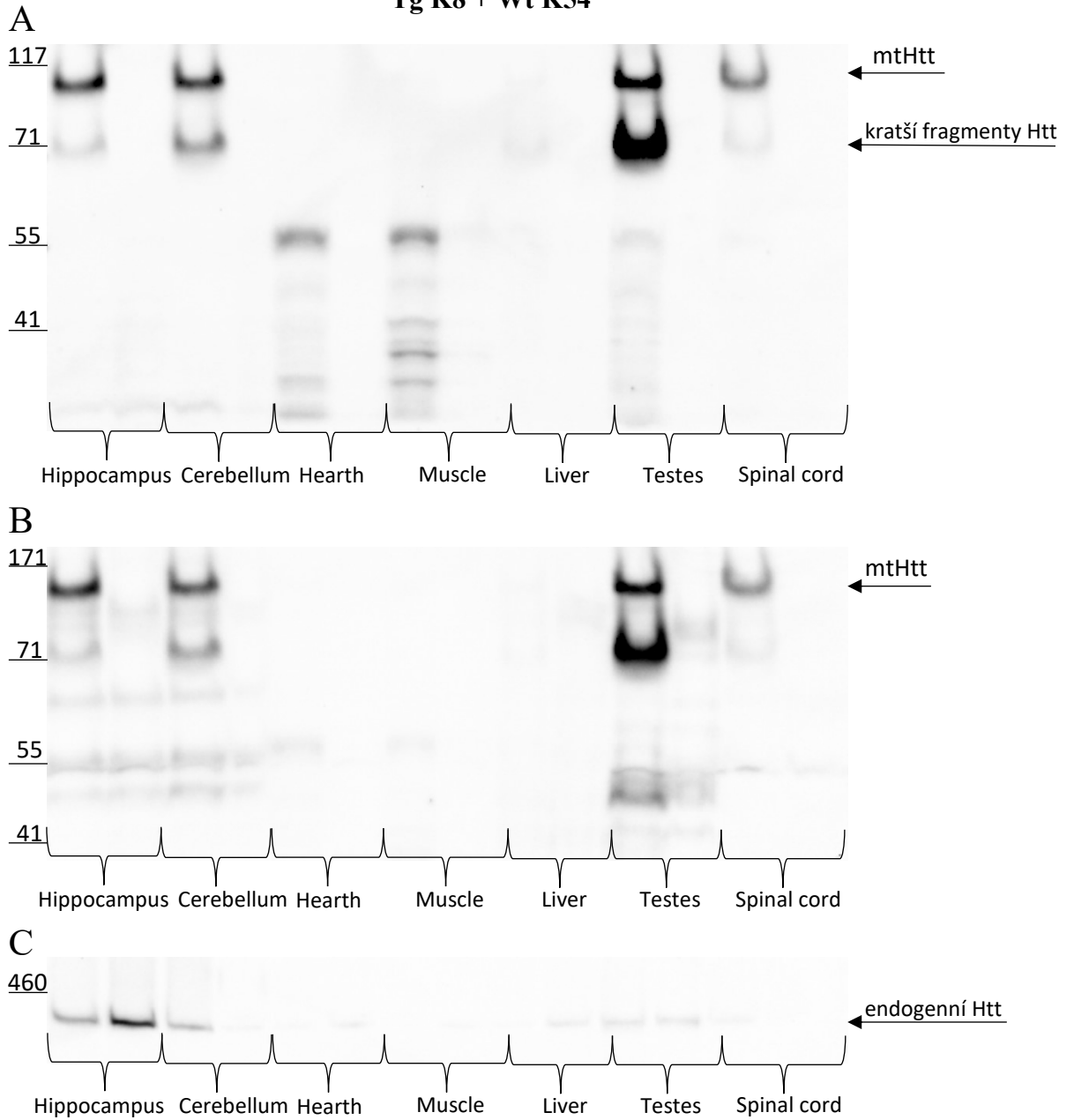


Obrázek 6: Kontrola množství proteinu při testování Tg K8 a Wt K54 miniprasat starých 24 měsíců metodou Western Blotting, vizualizace: MemCode,

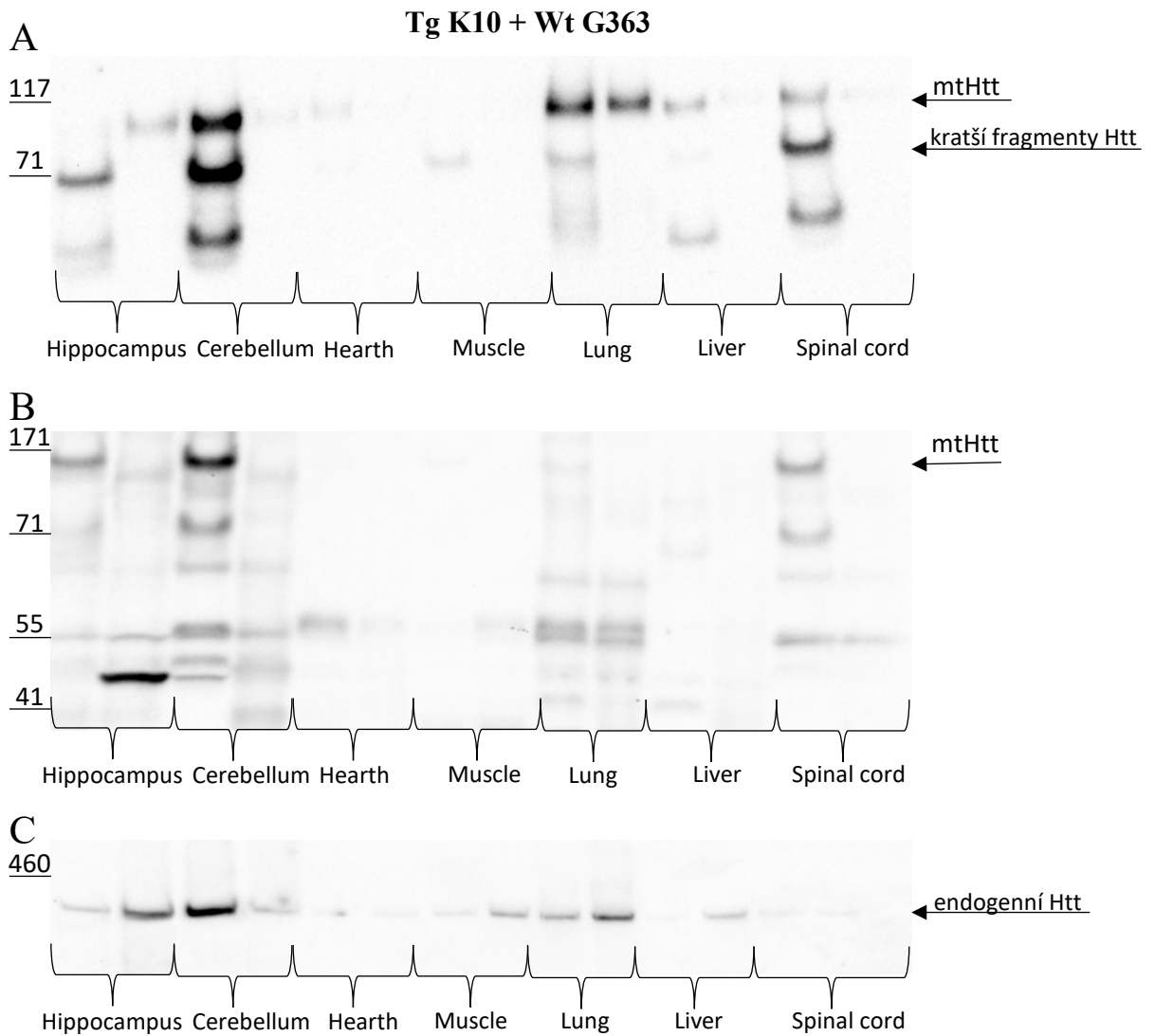


Obrázek 7: Expres mtHtt a endogenního Htt v různých tkáních Tg L557 a Wt L556 páru miniprasat starých 24 měsíců vizualizována: A - primární protilátkou 3B5H10 – Pozorován vyšší výskyt mtHtt u TgHD miniprasete v tkáních mozku (hippocampus, cerebellum), míchy (spinal cord) a varlat (testes), B – primární protilátkou EPR5526 – Pozorován vyšší výskyt mtHtt u TgHD miniprasete v tkáních mozku (hippocampus, cerebellum), míchy (spinal cord) a varlat (testes), C – primární protilátkou EPR5526 – Endogenní Htt se vyskytuje u Tg i Wt miniprasat ve všech tkáních.

Tg K8 + Wt K54



Obrázek 8: Expres mtHtt a endogenního Htt v různých tkáních Tg K8 a Wt K54 páru miniprasat starých 24 měsíců vizualizována: A - primární protilátkou 3B5H10 – Pozorován vyšší výskyt mtHtt u TgHD miniprasete v tkáních mozku (hippocampus, cerebellum), míchy (spinal cord) a varlat (testes), B – primární protilátkou EPR5526 – Pozorován vyšší výskyt mtHtt u TgHD miniprasate v tkáních mozku (hippocampus, cerebellum), míchy (spinal cord) a varlat (testes), C – primární protilátkou EPR5526 – Endogenní Htt se vyskytuje u Tg i Wt miniprasat ve všech tkáních.



Obrázek 9: Expres mtHtt a endogenního Htt v různých tkáních Tg K10 a Wt G363 páru miniprasat starých 24 měsíců vizualizována: A - primární protilátkou 3B5H10 – Pozorován vyšší výskyt mtHtt u TgHD miniprasete v tkáních mozku (hippocampus, cerebellum), míchy (spinal cord) a plic (lung), B – primární protilátkou EPR5526 – Pozorován vyšší výskyt mtHtt u TgHD miniprasate v tkáních mozku (hippocampus, cerebellum), míchy (spinal cord) a plic (lung), C – primární protilátkou EPR5526 – Endogenní Htt se vyskytuje u Tg i Wt miniprasat ve všech tkáních.

Expresse mtHtt v různých tkáních miniprasat starých 36 měsíců – srovnání Tg a Wt formy

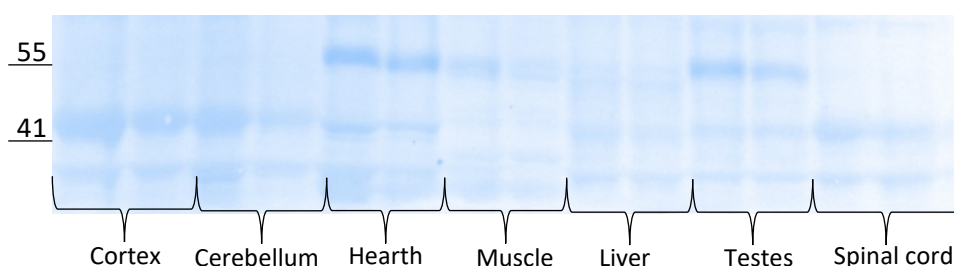
Do této kategorie patří tři páry miniprasat: Tg L93 + Wt L151, Tg K100 + Wt K48, Tg K104 + Wt K103.

U těchto miniprasat byly zkoumány tkáně mozku (cortex, putamen, cerebellum), tkáně srdce (hearth), svalů (muscle), jater (liver), varlat (testes) (nebo plic (lung) v případě samic) a míchy (spinal cord).

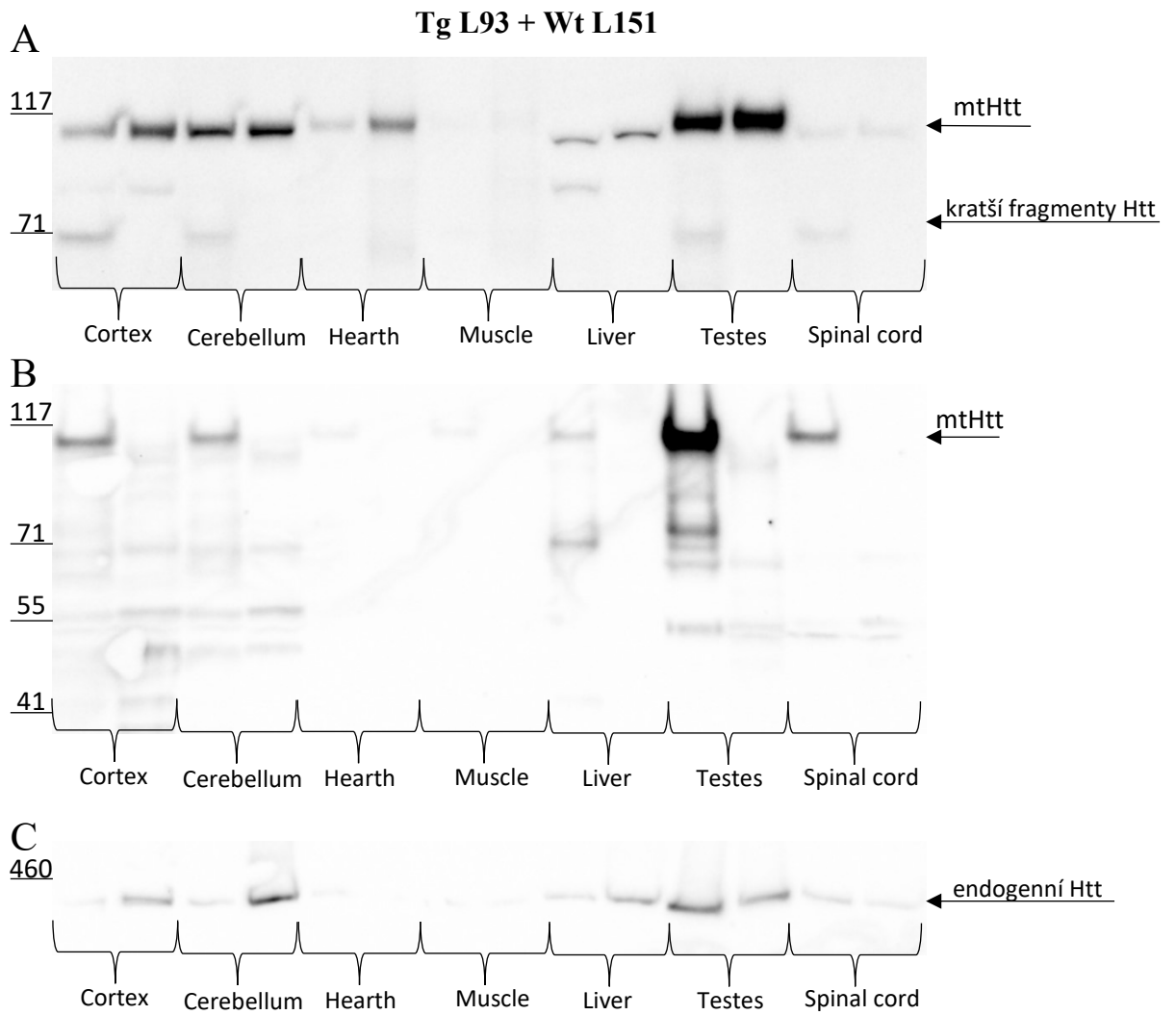
Imunoznačení protilátkou 3B5H10 ukázalo výrazně vyšší expresi transgenního mtHtt v tkáních mozku (kortex/putamen a cerebellum), v tkáních varlat (testes) (případně v menší míře v tkáních plic (lung)) a v tkáních míchy (spinal cord). Zatímco v tkáních srdce (hearth), svalů (muscle) a jater (liver) byla exprese mtHtt nižší. Mimo transgenního mtHtt značí protilátka 3B5H10 i kratší fragmenty Htt, které se opět vyskytují ve větší míře ve varlatech (testes) (Obr. 11a, 12a, 13a).

Imunoznačení protilátkou EPR5526 představilo větší množství produktu v tkáních mozku (kortex/putamen, cerebellum), varlat (testes) (případně v menším množství v plicích (lung)) a v tkáních míchy (spinal cord) (Obr. 11b, 12b, 13b). U miniprasat tohoto stáří bylo ale pozorováno i vyšší množství produktu v tkáních jater (liver) (Obr. 11b, 13b). U transgenních HD miniprasat starých 36 měsíců již bylo pozorováno menší množství transgenního mtHtt jen v tkáních srdce (hearth) a svalů (muscle) (Obr. 11b, 12b, 13b). Endogenní Htt se opět vyskytoval ve všech tkáních bez rozdílu tkáně či přítomnosti mtHtt (Obr. 11c, 12c, 13c).

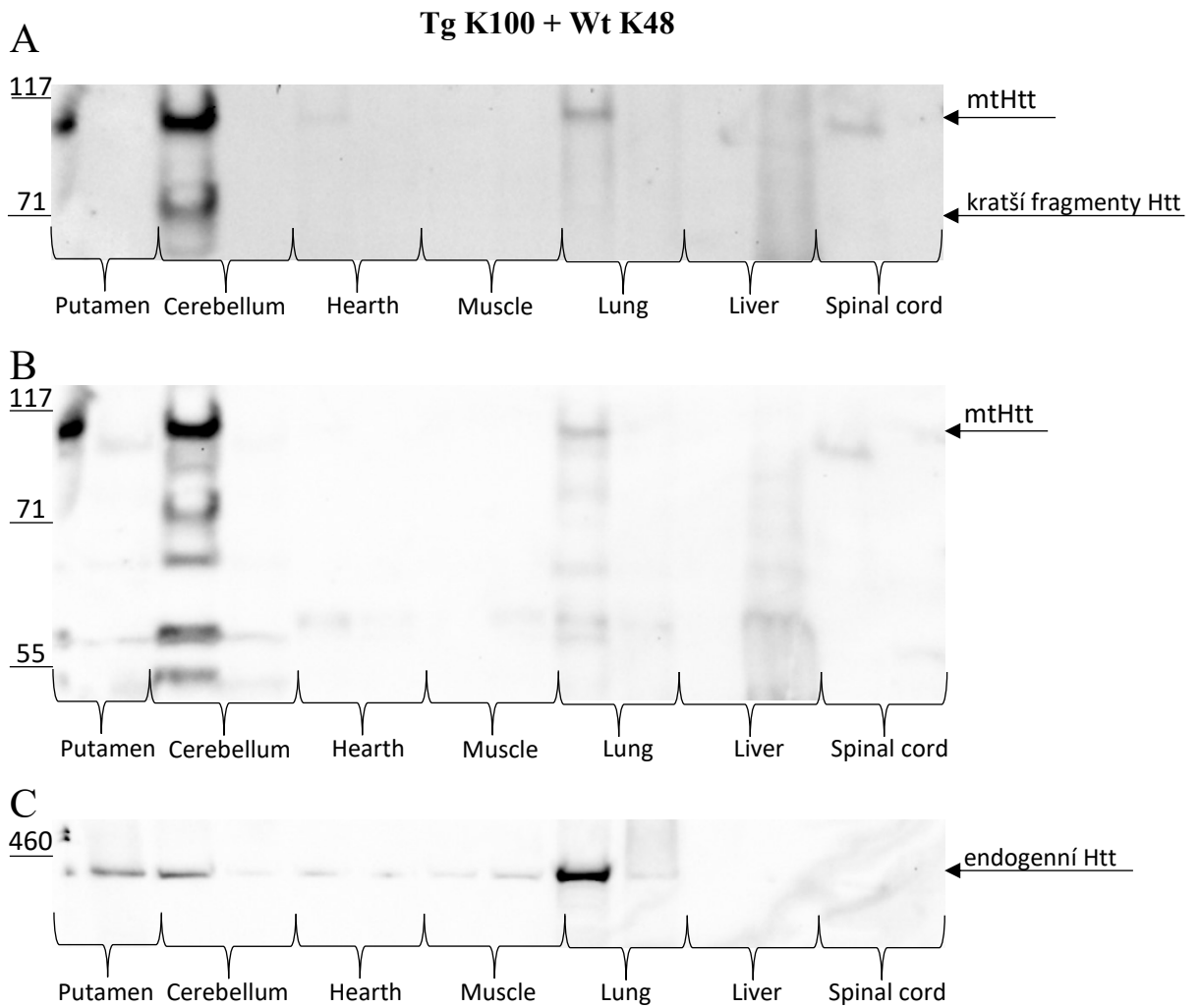
U všech tří párů byla provedena kontrola množství proteinu pomocí MemCode (př. Obr. 10).



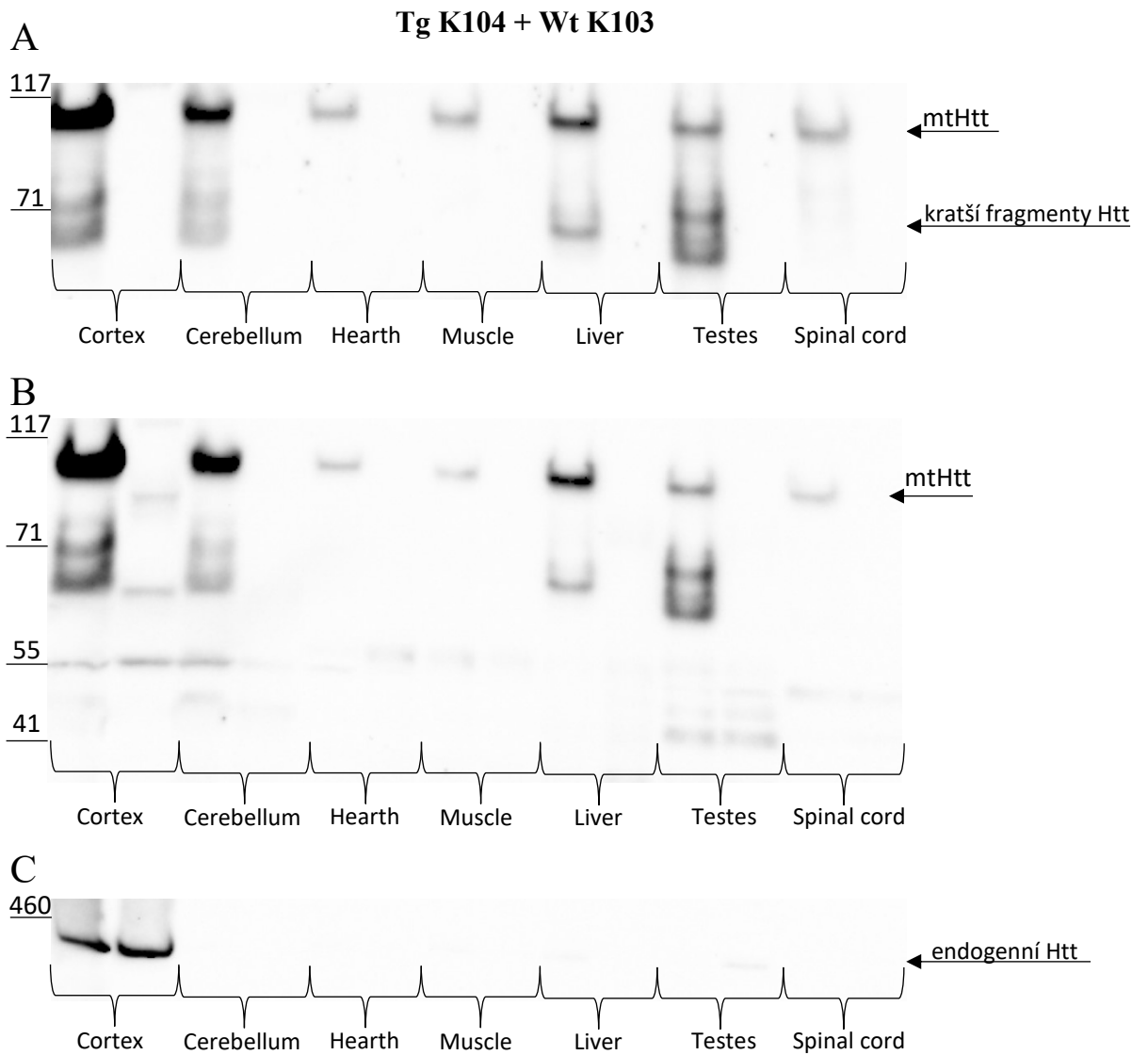
Obrázek 10: Kontrola množství proteinu při testování Tg K104 a Wt 103 miniprasat starých 36 měsíců metodou Western Blotting, vizualizace: MemCode,



Obrázek 11: Expres mtHtt a endogenního Htt v různých tkáních Tg L93 a Wt L151 páru miniprasat starých 36 měsíců vizualizována: A - primární protilátkou 3B5H10 – Pozorován vyšší výskyt mtHtt u TgHD miniprasete v tkáních mozku (cortex, cerebellum), míchy (spinal cord) a varlat (testes), B – primární protilátkou EPR5526 – Pozorován vyšší výskyt mtHtt u TgHD miniprasate v tkáních mozku (cortex, cerebellum), míchy (spinal cord) a varlat (testes), C – primární protilátkou EPR5526 – Endogenní Htt se vyskytuje u Tg i Wt miniprasat ve všech tkáních.



Obrázek 12: Expze mtHtt a endogenního Htt v různých tkáních Tg K100 a Wt K48 páru miniprasat starých 36 měsíců vizualizována: A - primární protilátkou 3B5H10 – Pozorován vyšší výskyt mtHtt u TgHD miniprasete v tkáních mozku (putamen, cerebellum) a plic (lung), B – primární protilátkou EPR5526 – Pozorován vyšší výskyt mtHtt u TgHD miniprasate v tkáních mozku (putamen, cerebellum), míchy (spinal cord) a plic (lung), C – primární protilátkou EPR5526 – Endogenní Htt se vyskytuje u Tg i Wt miniprasat ve všech tkáních.



Obrázek 13: Expres mtHtt a endogenního Htt v různých tkáních Tg K104 a Wt K103 páru miniprasat starých 36 měsíců vizualizována: A - primární protilátkou 3B5H10 – Pozorován vyšší výskyt mtHtt u TgHD miniprasete v tkáních mozku (cortex, cerebellum), jater (liver) a varlat (testes), B – primární protilátkou EPR5526 – Pozorován vyšší výskyt mtHtt u TgHD miniprasete v tkáních mozku (cortex, cerebellum), jater (liver) a varlat (testes), C – primární protilátkou EPR5526 – Endogenní Htt se vyskytuje u Tg i Wt miniprasat ve všech tkáních.

Expres mtHtt v různých tkáních miniprasat starých 48 měsíců

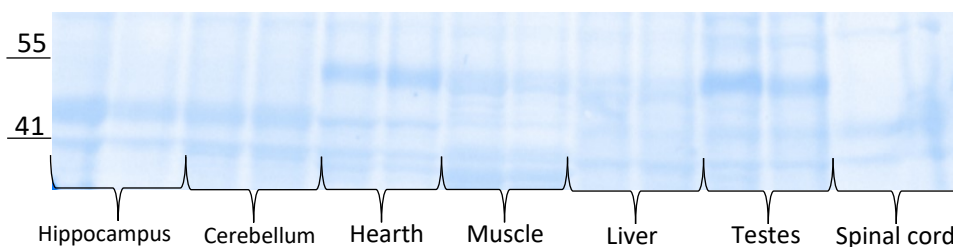
Ve věku 48 měsíců byly testovány tři páry miniprasat: Tg K209 + Wt K208, Tg K162 + Wt K207, Tg K102 + Wt K99.

U těchto miniprasat byly zkoumány tkáně mozku (cortex, hippocampus, cerebellum), tkáně srdce (heart), svalů (muscle), jater (liver), varlat (testes) (nebo plic (lung) v případě samic) a míchy (spinal cord).

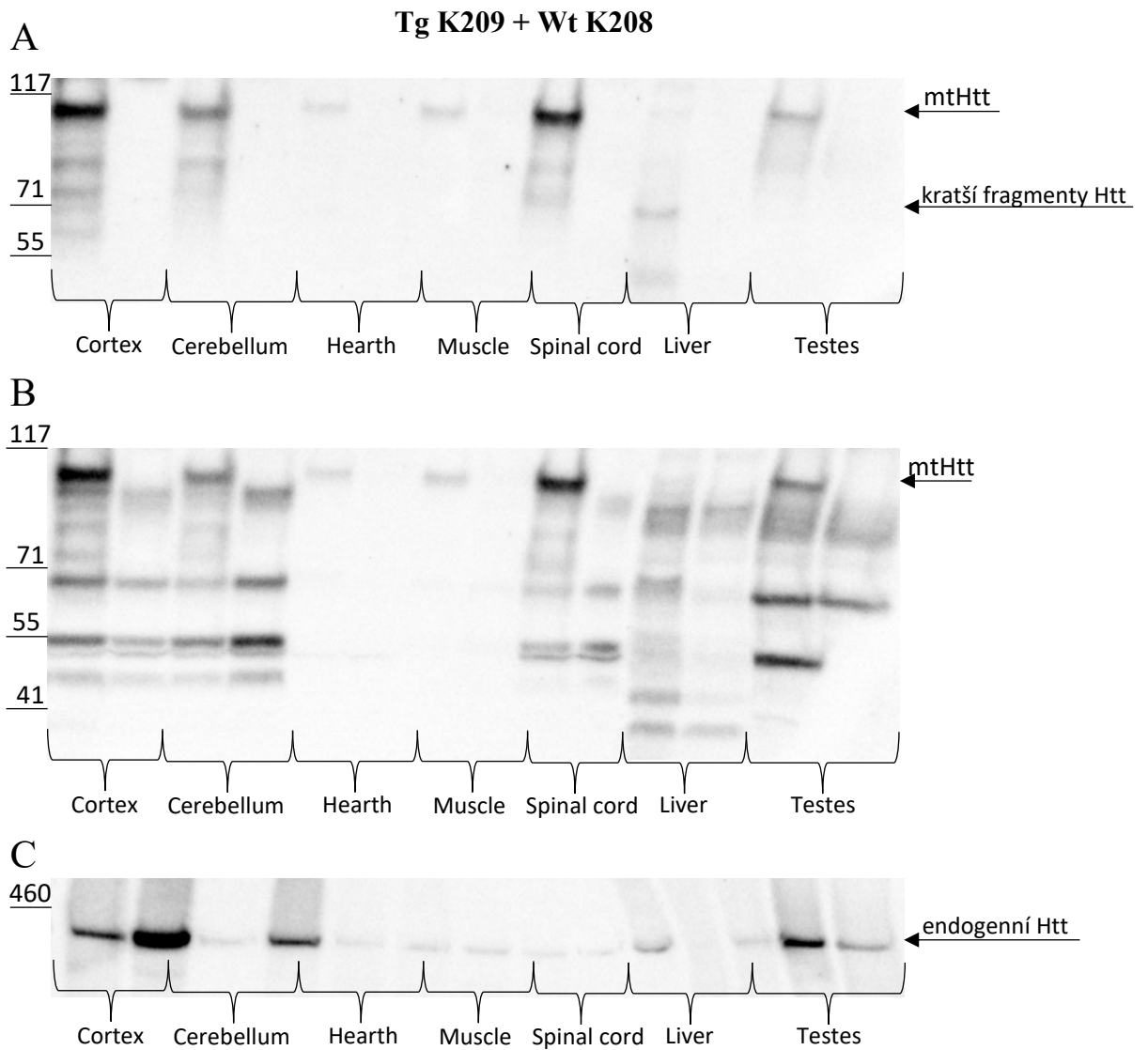
Imunoznačení transgenního mtHtt primární protilátkou 3B5H10 bylo nejvýraznější pro produkty tkání mozku (kortex/hippocampus, cerebellum) a míchy (spinal cord). Produkt byl značen i v tkáních varlat (testes) (popřípadně plic (lung)), ale v mnohem menší míře. Nejmenší exprese proteinu poté nastávala v tkáních srdce (heart) a jater (liver). V tkáních svalů (muscle), na rozdíl od jiných věkových skupin nacházíme vyšší produkci transgenního Htt. Byly zde značené i kratší fragmenty mtHtt, které byly nacházeny v různých tkáních (Obr. 15a, 16a, 17a).

Imunoznačení transgenního mtHtt primární protilátkou EPR5526 ukázalo nejvýraznější produkty v tkáních mozku (kortex/hippocampus, cerebellum), míchy (spinal cord) a varlat (testes) (popřípadně plic (lung)) (Obr. 15b, 16b, 17b). Na rozdíl od ostatních věkových skupin, u 48 měsíčních zvířat nacházíme i poměrně velkou expresi transgenního mtHtt v tkáních svalů (muscle) (nejvýznamněji Obr. 16b) ve srovnání s ostatními věkovými skupinami. Endogenní Htt je opět exprimován ve všech tkáních bez rozdílu věku či přítomnosti mutované alely (Obr. 15c, 16c, 17c).

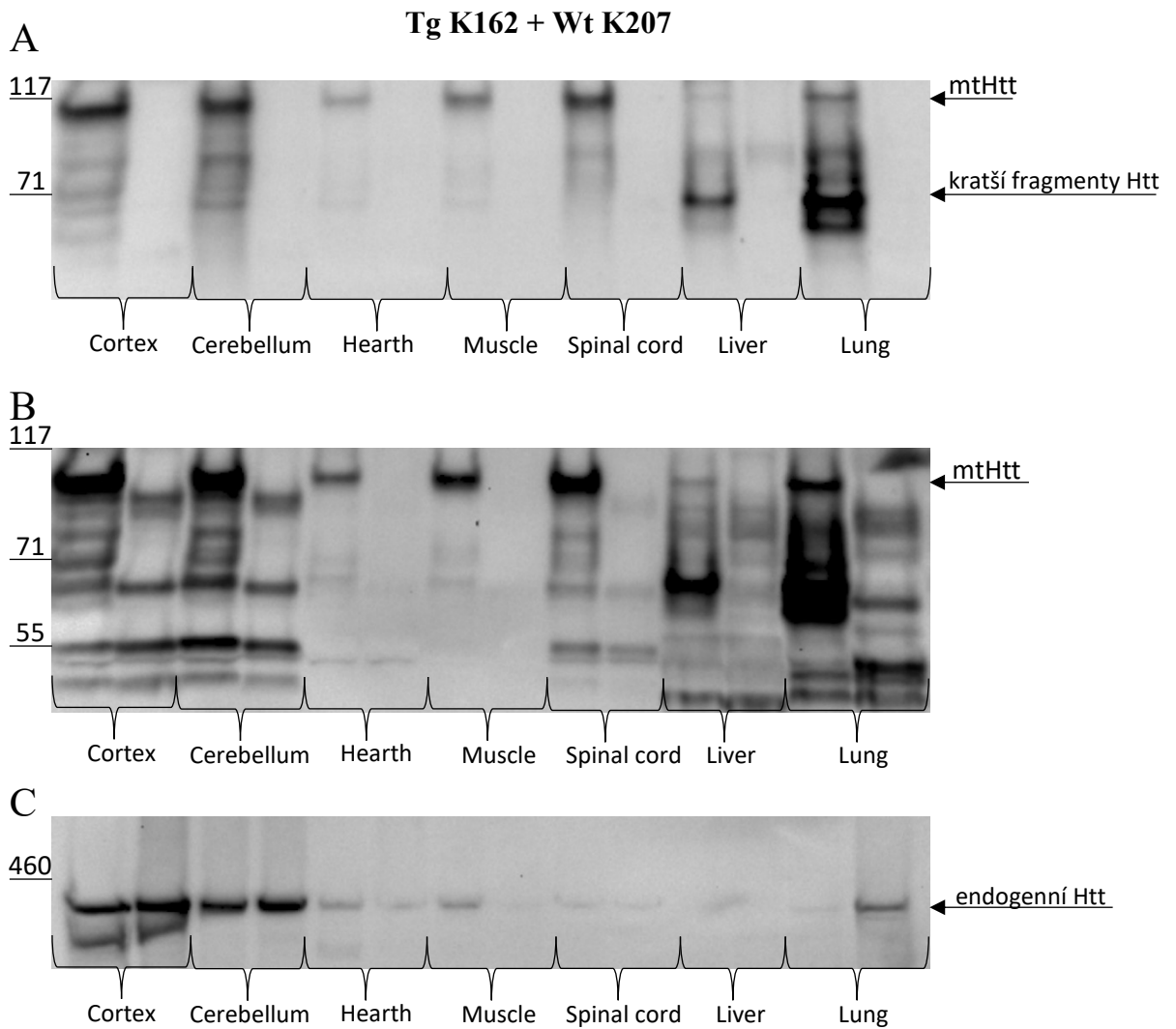
U všech tří párů byla provedena kontrola množství proteinu pomocí MemCode (př.: Obr. 14).



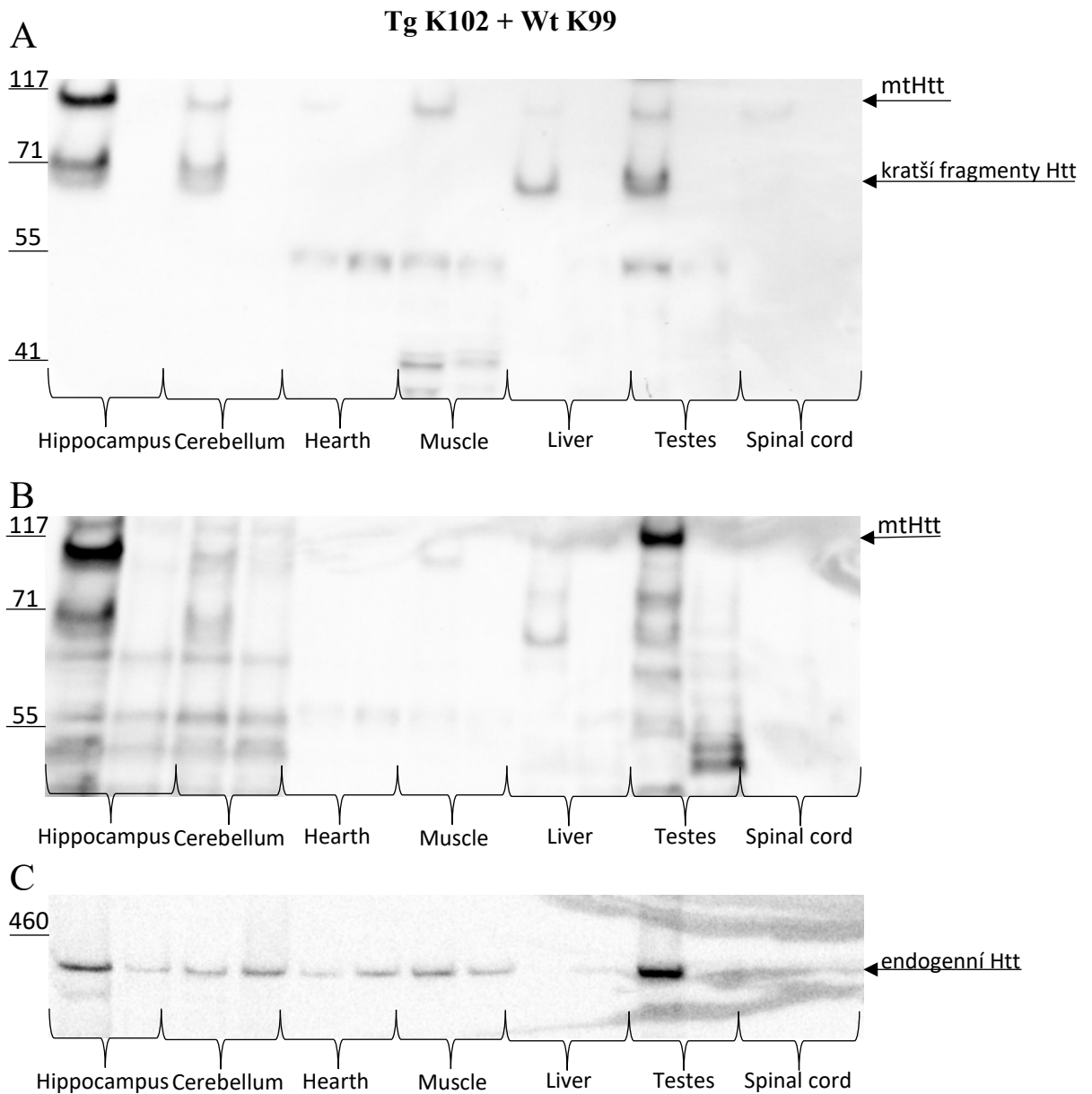
Obrázek 14: Kontrola množství proteinu při testování Tg K102 a Wt 99 miniprasat starých 48 měsíců metodou Western Blotting, vizualizace: MemCode,



Obrázek 15: Expres *mtHtt* a endogenního *Htt* v různých tkáních Tg K209 a Wt K208 páru miniprasat starých 48 měsíců vizualizována: A - primární protilátkou 3B5H10 – Pozorován vyšší výskyt *mtHtt* u TgHD miniprasete v tkáních mozku (cortex, cerebellum), míchy (spinal cord) a varlat (testes), B – primární protilátkou EPR5526 – Pozorován vyšší výskyt *mtHtt* u TgHD miniprasate v tkáních mozku (cortex, cerebellum), míchy (spinal cord) a varlat (testes), C – primární protilátkou EPR5526 – Endogenní *Htt* se vyskytuje u Tg i Wt miniprasat ve všech tkáních.



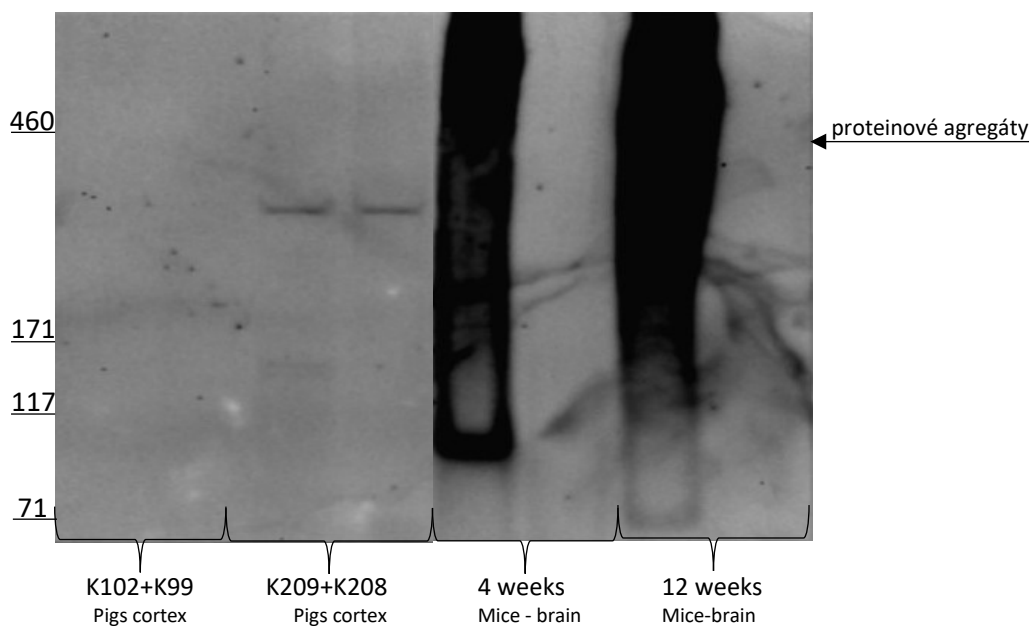
Obrázek 16: Expres mtHtt a endogenního Htt v různých tkáních Tg K162 a Wt K207 páru miniprasat starých 48 měsíců vizualizována: A - primární protilátkou 3B5H10 – Pozorován vyšší výskyt mtHtt u TgHD miniprasate v tkáních mozku (cortex, cerebellum), míchy (spinal cord) a plic (lung), B – primární protilátkou EPR5526 – Pozorován vyšší výskyt mtHtt u TgHD miniprasate v tkáních mozku (cortex, cerebellum), míchy (spinal cord) a plic (lung), C – primární protilátkou EPR5526 – Endogenní Htt se vyskytuje u Tg i Wt miniprasat ve všech tkáních.



Obrázek 17: Expres mtHtt a endogenního Htt v různých tkáních Tg K102 a Wt K99 páru miniprasat starých 48 měsíců vizualizována: A - primární protilátkou 3B5H10 – Pozorován vyšší výskyt mtHtt u TgHD miniprasete v tkáních mozku (hippocampus, cerebellum) a varlat (testes), B – primární protilátkou EPR5526 – Pozorován vyšší výskyt mtHtt u TgHD miniprasate v tkáních mozku (hippocampus, cerebellum) a varlat (testes), C – primární protilátkou EPR5526 – Endogenní Htt se vyskytuje u Tg i Wt miniprasat ve všech tkáních.

Expresa mtHtt v kortexu miniprasat starých 48 měsíců a srovnání se vzorky mozku myši starých 4 a 12 týdnů

Do tohoto experimentu byly zařazeny myši i miniprasata. Tkáně byly odebrané z mozku miniprasat (kortex) a z mozku myši, všechny odběry byly vykonány post mortem, Miniprasata byla stará 48 měsíců (patřily sem dva páry miniprasat: Tg K102 + Wt K99, Tg K209 + Wt K208) a myši byly staré 4 a 12 týdnů. Vzorky byly zpracovány metodou Western blot a výsledky byly imunoznačeny protilátkou *Ali Khoshnana*, která označuje proteinové agregáty. Výsledky prokázaly proteinové agregáty hlavně v mozku myši (Obr. 19).



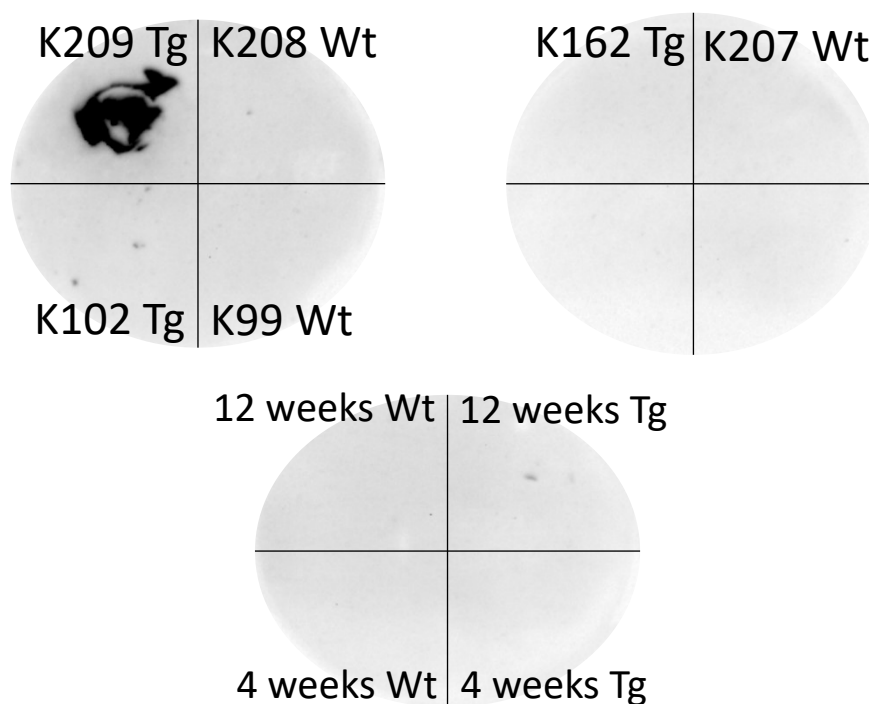
Obrázek 18: Vizualizace proteinových agregátů v mozku protilátkou *Ali Khoshnana* 48 měsíčních miniprasat (K102+K99, K209+K208) a 4 a 12 týdeních myši. Proteinové agregáty byly ukázány hlavně u vzorků myši.

Sledování oligomerních forem Htt nejstarších 48 m miniprasat – filter retardation assay

Zde byl sledován výskyt vyšších struktur mtHtt ve vzorcích tkání miniprasat a pro srovnání bylo přidáno několik vzorků myších tkání. Tato metoda byla použita již u myších tkání dříve a pomocí ní byly detekovány agregáty a oligomerní struktury (Wanker et al. 1999).

Vzorky byly odebrány z myší post mortem, konkrétně z mozku myší starých 4 a 12 týdnů. Byly zde využity dva páry myší, sourozenců, Tg + Wt. Zbylé vzorky byly odebrány z mozku miniprasat, konkrétně z kortexu, post mortem, ve věku 48 měsíců. Byly zde využity 3 páry miniprasat, sourozenců: Tg K209+Wt K208, Tg K162+ Wt K207, Tg K102+Wt K99.

Metoda Filter retardation zobrazila agregáty pouze u jednoho transgenního miniprasete (konkrétně K209), u ostatních miniprasečích vzorků se zachytit agregáty nepovedlo, taktéž u myších vzorků (Obr. 20). Možné zapříčinění je možné hledat v nulovém výskytu vyšších forem mtHtt v těchto tkáních, nebo spíše ve špatném zachycení těchto forem a neprůkaznosti této metody.



Obrázek 19: Sledování vyšších forem mtHtt v mozku myší starých 4 a 12 týdnů (2 páry) a miniprasat starých 48 měsíců (3 páry). Vizualizace protilátkou Ali Khoshnana. Proteinové agregáty byly zachyceny pouze u miniprasete Tg K209.

Neinvazivní výsledky

Tato část výsledků je zaměřena na získávání dat o chování zvířete, či o jeho pohybu a vlastnostech bez veškerých invazivních zásahů.

Zavedení metod

Zvířata byla testována v jednotlivých disciplínách, vždy několik po sobě jdoucích dní a disciplíny byly eliminovány podle výsledků zvířat. Cílem bylo nalezení metody či metod (nebo cesty k těmto metodám), která by spolehlivě prokázala některou z motorických či kognitivních poruch charakterizujících pacienty s HD na Liběchovských transgenních HD miniprasatech. Je důležité podrobně prozkoumat model Liběchovského TgHD miniprasete, aby ho bylo možné použít pro preklinické testy. Zde jsem se zabývala zjištěním věku nástupu choroby u starších prasat, kolegové v Münsteru mají mladší prasata a zatím jejich testování nepřineslo žádné signifikantní výsledky, a to může být dáno právě věkem prasat, proto bylo důležité otestovat starší jedince a zavést pro ně nové metody, jako je např. metoda Balance Beam, která je převzatá z testování prasat se spinocerebelární ataxií (Beraldi et al. 2015).

Metody byly čerpány ze zavedených metod od kolegů z Münsteru, plus byly zavedeny nové metody, jako je Balance Beam, Stability test a další. Metody byly přizpůsobeny tak, aby zvířata byla schopná cvičení provést, a zároveň aby nebylo cvičení moc dlouhá, protože prasata poměrně rychle ztrácejí soustředěnost.

Do této studie byla zahrnuta miniprasata od F0 do F2 generace. Zvířata byla vždy vybírána v párech (Tg + Wt) a ve většině případů byla miniprasata v páru i sourozenci, pokud to bylo možné. Tato zvířata byla vybrána záměrně, s ohledem na jejich věk od 6 do 8 let. Tato miniprasata jsou nejstaršími jedinci liběchovských HD miniprasat a proto je u nich největší šance na prokázání motorických či kognitivních poruch.

Zvířata byla hodnocena v jednotlivých testech škálou bodů 1–5 (výjimečně 1–3) body, podle dosaženého stupně zdolání překážky, či za překonání překážky celé to bylo 5 bodů. Byly nastaveny hranice pro bodování jednotlivých disciplín podle mezníků, která prasata zdolala, podle toho pak byly udělovány body.

Výsledky

Soubor behaviorálních testů v jednotlivých generacích

Na tomto místě jsou znázorněny výsledky měření souboru behaviorálních testů v jednotlivých generacích s rozdílem Tg a Wt jedinců.

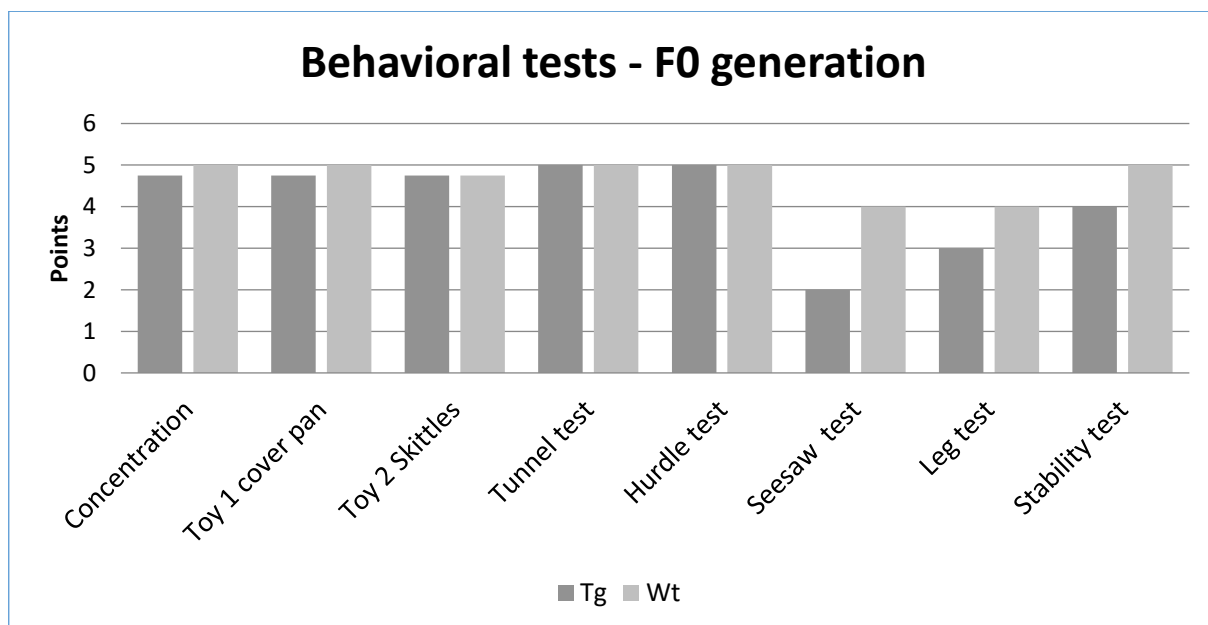
Všechny testy byly statisticky vyhodnoceny pomocí Dvouvýběrového Wilcoxonova testu pro závislé výběry. Tento test prokázal statistickou významnost u jednoho testu, Leg testu, u ostatních testů byla hypotéza zamítnuta.

Soubor behaviorálních testů F0 generace

Zde bylo testováno 8 různých metod a miniprasata byla při jejich překonávání bodována stupnicí 1–5 (v některých případech 1–3) body.

U této generace jsou jen 2 zvířata: Tg F807 (samice), Wt F808 (samec).

Výsledky jsou znázorněny v grafu č. 3: Tg jedinec zde dosáhl ve 3 disciplínách nižšího počtu bodů než Wt jedinec. Konkrétně jsou to disciplíny Seesaw test, Leg test a Stability test. Tyto disciplíny všechny souvisí se stabilitou a schopností pohybu. Výsledkem hodnocení se ukazuje Wt jedinec schopnější udržet stabilitu a překonat překážky než jedinec Tg.

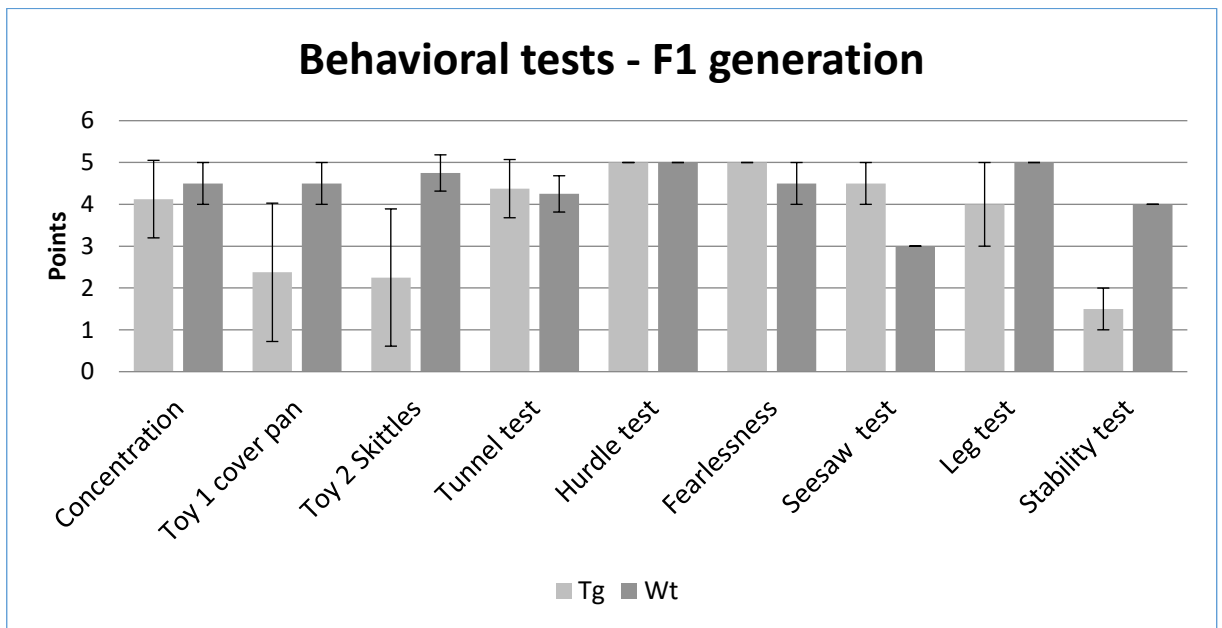


Graf 3: Výsledky behaviorálních testů F0 generace – porovnání Tg a Wt miniprasete. U třech disciplín, konkrétně Seesaw test a Stability test vznikl rozdíl mezi Tg a Wt jedincem, kdy Tg jedinec dosáhl méně bodů.

Soubor behaviorálních testů F1 generace

Osm metod shrnujících schopnost pohybu, překonávání překážek a strach bylo testováno na F1 generaci zvířat. Do F1 generace patří 3 zvířata: Tg G117 (samec), Tg G118 (samec) a Wt G122 (samice).

Výsledky znázorněny v grafu č. 4 naznačují rozdílné výsledky Tg a Wt jedinců v 5 disciplínách, konkrétně: Toy 1 cover pan, Toy 2 skittles, Seesaw, Leg a Stability test. Jen jedna z těchto disciplín ukazuje lepší výsledek Tg jedince: Seesaw test – tento výsledek může být ovlivněn pohlavím jedince a s tím spojeným strachem. Ostatní 4 disciplíny opět ukazují lepší pohybové schopnosti Wt jedinců než jedinců Tg. Do grafu byly zahrnuty chybové úsečky, které naznačují signifikantnost testování. Ale při malém počtu zvířat nejsou výsledky statisticky významné. Ale zde šlo hlavně o vyzkoušení a zavedení metod na těchto zvířatech.

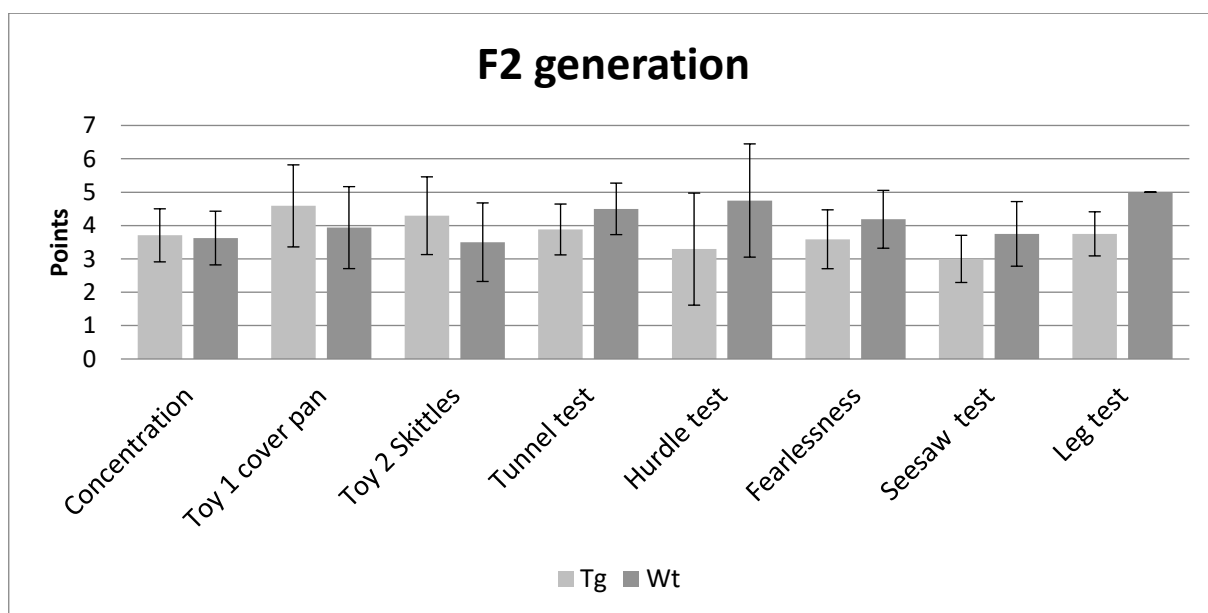


Graf 4: Výsledky behaviorálních testů F1 generace – Srovnávání Tg a Wt prasat. Rozdíly v Tg a Wt skupinách byly znázorněny u 5 disciplín.

Soubor behaviorálních testů F2 generace

F2 generace zahrnuje 10 jedinců (5 Tg + 5 Wt): Tg K65 (samice), Wt K66 (samice), Tg K150 (samec), Wt K151 (samec), Wt K155 (samice), Tg K156 (samice), Tg K169 (samice), Wt K188 (samice), Tg K217 (samice), Wt K353 (samec).

Výsledky jsou znázorněny v grafu č. 5. Je pozorován rozdíl (Tg/Wt) v 7 z 8 disciplín. Pouze ve 2 disciplínách – konkrétně Toy 1 cover pan a Toy 2 skittles byla výše hodnocena skupina Tg jedinců. U těchto dvou kategorií jde spíše o motoriku rypáku miniprasat. V 5 disciplínách získala vyšší bodové ohodnocení skupina Wt jedinců – Tunnel, Hurdle, Fearlessness, Seesaw a Leg test. Tyto disciplíny jsou zaměřeny na pohyb a bojácnost. Závěrem by mohlo být hodnocení, charakterizující Tg jedince jako jedince s horší schopností pohybu a větším strachem.



Graf 5: Výsledky behaviorálních testů F2 generace – Srovnání Tg a Wt prasat. Rozdíly v Tg a Wt skupinách byly znázorněny v 7 z 8 disciplín.

Balance beam

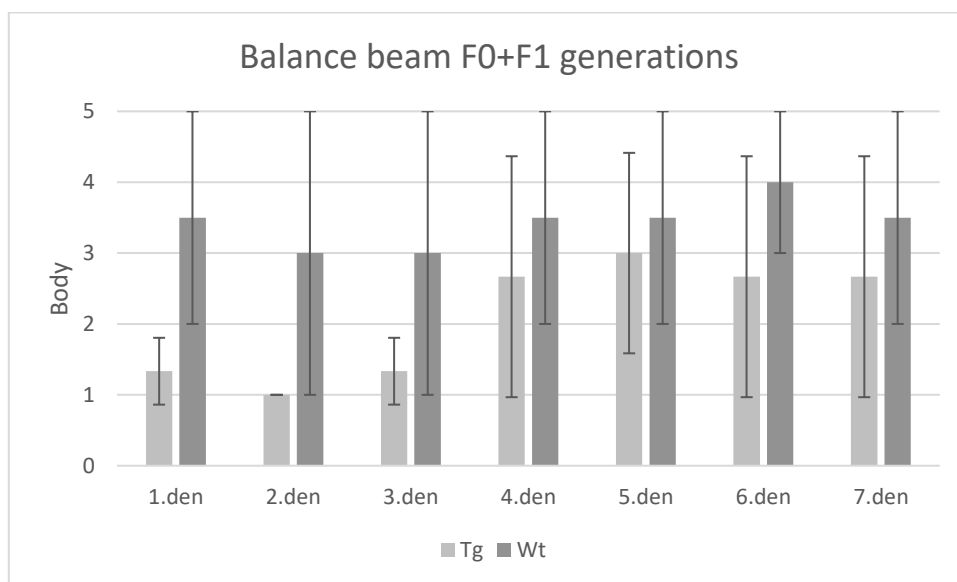
Balance beam je metoda kombinující schopnost mobility, motivace, překonání strachu. Balance beam je lávka ve výšce ohraničená zábrany, začínající zvedající se lávkou se stupínky a končící rovnou plošinou pro otočení zvířete.

Zvíře bylo bodováno škálou od 1 do 5 bodů, podle toho, kam až na plošinu vylezlo, či ji přešlo celou.

Balance beam v F0 a F1 generaci

V tomto testu bylo testováno 5 zvířat, 3 Tg (F807, G117, G118) a 2 Wt (F808, G122).

Výsledky metody Balance beam u F0 a F1 generace lze pozorovat na grafu č. 6. Výsledky ukazují velké rozdíly v Tg a Wt skupině miniprasat, které se postupně zmenšují. Pro Tg zvířata byl tento test 1. den velmi obtížný ale po 7 dnech už ho dokázali částečně zvládnout. Wt skupina se s tímto testem vyrovnala lépe a vykazovala během 7 dní víceméně stejné výsledky. U Tg skupiny zvířat je zajímavý postup učení jedinců a tím vyrovnávání se Wt skupině. Tyto výsledky naznačují horší schopnost mobility a překonání strachu u Tg zvířat ve srovnání s Wt zvířaty. Chybové úsečky ukazují signifikantnost tohoto testu, ale to může být dáno hlavně malým vzorkem populace. Nejdůležitější bylo zavedení těchto testů.

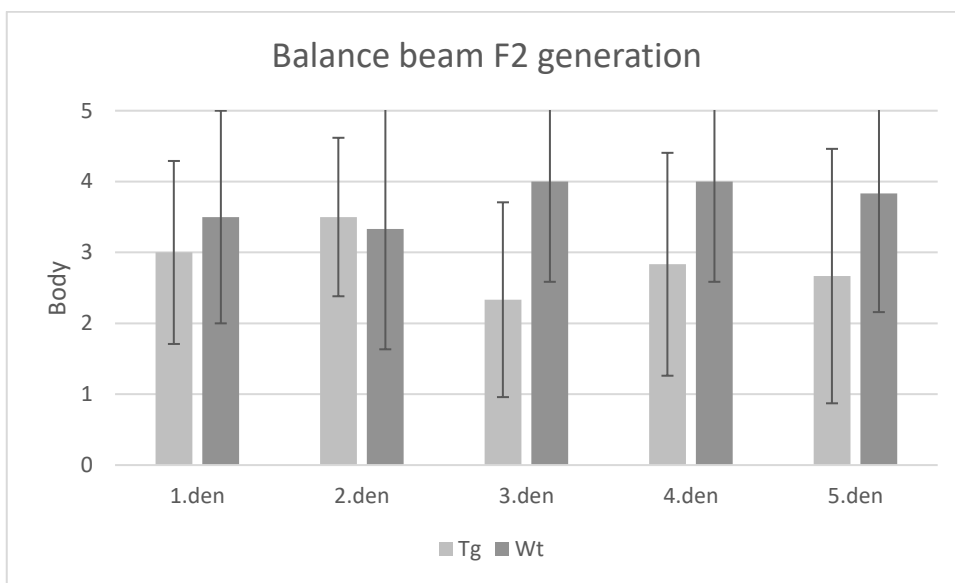


Graf 6: Výsledek testu Balance beam u F0 a F1 generace – Srovnání skupin Tg a Wt miniprasat v průběhu dní. Byly pozorovány rozdíly mezi Tg a Wt skupinou, které se v průběhu dní snižovaly.

Balance beam v F2 generaci

V tomto testu bylo použito 12 zvířat, 6 Tg (K150, K152, K156, K169, K217, K65) a 6 Wt (K151, K153, K155, K188, K353, K66).

Výsledky znázorněné v Grafu 7 ukazují menší rozdíly mezi skupinou Tg a Wt miniprasat než u F0+F1 generace, to může být dáno stářím zvířat a zároveň rozvojem HD. I přes to je ale na Grafu 7 vidět rozdíl v procesu učení této nové metody. Skupina Wt miniprasat se tento test naučila rychleji než skupina Tg, kde je na Grafu 7 vidět minimální zlepšení. Chybové úsečky ukazují signifikantnost testu, test byl opět prováděn na menším vzorku populace pro zavedení a vyzkoušení této metody.



Graf 7: Výsledek testu Balance beam v F2 generaci – Srovnání Wt a Tg skupiny zvířat. Byly ukázány rozdíly mezi Tg a Wt skupinou.

Diskuze

Neurodegenerativní onemocnění (NO) je v poslední době velmi zkoumané odvětví vědy, které se začíná dostávat i do podvědomí laické veřejnosti. HD patřící mezi neurodegenerativní onemocnění je méně známa choroba, za to ale natolik závažná jako ostatní degenerativní poruchy, jako jsou např. známější Alzheimerova choroba či Parkinsonova choroba a mnohé další. Ač se o HD zatím mnoho nemluví je v „hledáčku“ výzkumu mnoha laboratoří po celém světě. A v čem je taková odlišnost od ostatních neurodegenerativních onemocnění? Je to dané hlavně autosomálně dominantní dědičností tohoto onemocnění spolu s pozdním projevem nemoci. Projev HD ve většině případů (kromě juvenilní formy) se rozvíjí až po reprodukčním věku nemocného, to je samozřejmě podobné i u ostatních výše zmíněných NO. Ale v kombinaci pozdního projevu a dědičnosti vzniká velmi nezvyklá nemoc, kterou je HD. Na tuto nemoc zatím neexistuje lék, ač příčina je známa již několik desítek let. Tyto faktory proto vysvětlují zaměření výzkumu poslední doby na HD.

Nalezení léku je tedy zájmem vědecké komunity. Od nalezení příčiny HD (expanze polyglutaminové repetic CAG (Huntington et al. 1993)) proto začalo vznikat mnoho zvířecích modelů ve snaze nalézt ten správný pro testování léků.

Jako první modely začaly vznikat modely myši, pro jejich dostupnost, nenáročný chov i nízké náklady. Nejznámější a nejrozšířenější model je tzv. R6/2 model myši. Tato linie nese lidský mutovaný Htt na exonu 1 v oblasti 148-153 repetic. R6/2 myš vykazuje poruchy chování od věku 5 týdnů, pokročilou neurodegeneraci v oblasti striata ve věku 12 týdnů a obvykle myši této linie umírají ve věku 12-15 týdnů (Hickey et al. 2005; Mangiarini et al. 1996; Morton et al. 2005). Ale u malých modelových zvířat, jako jsou myši, je problém s mírou podobnosti s člověkem, která je velmi malá. Řada testovaných léků prokázala výborné výsledky u myších modelů, ale žádné výsledky u člověka. Proto bylo nutné vytvořit velký model HD. Je vytvořeno několik modelů velkých zvířat, jako jsou nehumánní primáti (etické problémy a finanční náročnost), ovce a další, ale velmi významným modelovým zvířetem se stalo prase. Jak již pro nenáročnost chovu, menší etické problémy, snadné množení, a i pro delší věkový standart.

Významné modely HD prasat byly prozatím vytvořeny tři. První model HD prasete byl vytvořen v roce 2001 z Göttingenského miniaturního prasete a byl vytvořen mikroinjekcí prasečí Htt cDNA do pronuclea oplozeného vajíčka. Ale tento první model neprojevil v žádném směru projevy fenotypu HD (Uchida et al. 2001). Druhý model byl vytvořen v roce 2010 z Tibetského miniaturního prasete, a to nukleárním přenosem lidského mutovaného Htt o délce 105 CAG repetit. Ale tento model se ukázal jako nestabilní, jelikož většina prasat zemřela postnatálně, to může být přičítáno toxicitě mtHtt. Ačkoliv u tohoto modelu se ukázalo několik důležitých symptomů HD – vysoká exprese transferovaného úseku, hyperkineze a další (Yang et al. 2010). Poté v roce 2013 byl představen třetí model, který vznikl na Akademii věd v Liběchově, zatím nejúspěšnější model. Tento model vznikl zkřížením Göttingenského a Minesotského prasete (Vodička et al. 2005) a byl vytvořen mikroinjekcí lentivirového vektoru do prasečího embrya – konkrétně bylo vloženo 124 CAG repetit mutantního lidského Htt. Takto vzniklý model je stabilní a část potomků je vždy transgenní (Baxa et al. 2013). Po vytvoření vhodného modelu bylo třeba začít s jeho konkrétním popisem, aby bylo možno ho použít na preklinické testování lidských léků. Prase je totiž velmi podobné člověku, i ve stavbě a velikosti mozku i celkové stavbě těla a hmotnosti (Schramke et al. 2015; Vodička et al. 2005).

V této diplomové práci jsem se zaměřila na dva úhly zkoumání modelu. Prvním směrem byla biochemická podstata modelu zkoumaná post mortem a druhým směrem bylo ustanovení fenotypu Liběchovských prasat.

Biochemické změny byly studovány metodou Western blot, Filter retardation assay, genotypizací a sledování genové exprese mtHTT. Tyto metody byly použity na post mortem vzorcích získaných z Tg a Wt zvířat ve věku 4, 6, 16, 24, 36 a 48 měsíců.

Výsledky genotypizace byly jednoznačné, jako jediná metoda se provádí u živých zvířat mladého věku pro určení Tg a Wt jedinců. Ze skupiny bylo vždy zhruba 1/3 jedinců Tg.

Metodou Western blot byla zkoumána prasata ve věku 4, 6, 16, 24, 36 a 48 měsíců. Byly zkoumány vzorky z tkání mozku – kortex, putamen, cerebellum a hippocampus, varlat – testes, jater – liver, z oblasti míchy – spinal cord, srdce – hearth, svalů – muscle a plic – lung.

Za jeden z největších ukazatelů HD byly považovány agregáty v mozku. Nedávno však bylo zjištěno, že ač v myším mozku se procento agregátů pohybuje okolo 40-50%, v mozku lidských pacientů je to jen kolem 0,3% (Jansen et al. 2016). U Liběchovských prasat jsou nalézány fragmenty Htt v některých tkáních častěji a v jiných méně, tyto fragmenty se pravděpodobně podílí na vývoji nemoci z důvodu jejich toxicity (Mendemueller et al. 2001). U 24 měsíčních zvířat je nejmarkantnější podíl fragmentů Htt ve varlatech, a to může souviset s prvním příznakem nemoci u samců prasat, který se projevuje ve 13 měsících. Tímto prvním symptomem je neplodnost a postupující degenerace varlat (Macakova et al. 2016). Další oblastí s vysokým výskytem fragmentů Htt je mozek – konkrétně kortex, putamen a hippocampus. Fragmenty v oblasti mozku mohou souviset s vývojem choroby a s postupnou neurodegenerací. Na rozdíl od těchto výsledků jsou tkáně srdce a svalů, kde nejsou nalézány skoro žádné fragmenty Htt. U 36 měsíčních zvířat se objevují fragmenty již i v tkáních jater. A u 48 měsíčních zvířat přibývají i tkáně plic.

Ve světle těchto výsledků by se dalo naznačit, že fragmenty Htt se nejprve objevují v tkáních varlat a mozku a postupně s věkem se dostávají do dalších tkání.

V souladu s těmito výsledky se jeví i výsledek exprese mtHTT v cortexu 24, 36 a 48 měsíčních zvířat. Na Grafu 1 lze pozorovat zvýšenou expresi mtHTT rostoucí s věkem prasete. To by se mohlo přisuzovat k postupné neurodegeneraci mozku známé také u lidských pacientů s HD. Dalo by se tedy předpokládat, že u varlat tomu bude podobně, ale výsledky exprese mtHTT ve varlatech 24, 36 a 48 měsíčních zvířat ukazují pravý opak, a to snižování množství mtHTT. Tyto výsledky by mohly vysvětlit dřívější degeneraci varlat. Degenerace varlat je prvním znakem u 13 měsíčních samců miniprasat (Macakova et al. 2016) a proto tyto výsledky naznačují, že degenerace varlat snižuje množství exprimovaného mtHTT. Naopak u mozku dochází k degeneraci později, proto tam dochází k růstu exprese.

Behaviorální změny u HD miniprasat byly zkoumány pomocí zavedení nových metod. Tyto změny byly zkoumány u prasat generace F0, F1 a F2. Metody bylo třeba nejprve zavést, protože na prasatech toho stáří zatím žádné známé zavedené nejsou. Ale mladší miniprasata – samice generace F3 jsou v Německu testována na behaviorální a kognitivní změny, ale toto testování zatím nepřineslo žádné výsledky, což může být způsobeno nedostatečným stářím zvířat (Schramke et al. 2015, 2017; Schubert et al. 2015).

Starší miniprasata tedy byla testována v několika kategoriích, ve snaze nalézt správnou metodu pro rozeznání behaviorálních a kognitivních změn známých u lidských pacientů. Bylo tedy zavedeno několik metod, které rozdílně zvládala zvířata Tg a Wt v závislosti na věku. Taký byl rozdíl v učení postupu pro jednotlivé zkoušky. Hlavním cílem tedy bylo nalézt metody pro popsání behaviorálních a kognitivních změn u HD miniprasat. Tento cíl je důležitý hlavně pro lepší charakterizování modelu a pro možné použití tohoto modelu pro preklinické testování. Bylo celkem testováno 15 zvířat. 2 zvířata z F0 generace, 3 z F1 a 10 z F2. Ke každému Tg zvířeti byl do páru Wt. Soubor testů byl vztažen vždy na generaci. Bohužel z F0 a F1 generace nebylo možné mít více zvířat, proto tyto výsledky nejsou tak průkazné jako výsledky s F2 generací. Každopádně při shrnutí všech testů by se dalo definovat, že Tg zvířata mají větší problém s testy, které obsahují překážky a je nutné využít obratnost zvířete (Leg test, Stability test a Seesaw test). Samostatným testem pak byla Balance Beam, která byla vyrobena podle předlohy a na ní se projeví rozdíly mezi Tg a Wt zvířaty. Tyto rozdíly závisely na strachu a obratnosti zvířete přejít překážku a je důležité zde poznamenat, že se rozdíly postupně zmenšovaly, takže by tu mohl být i ukázán rozdíl v učlivosti zvířat. I na této malé skupince zvířat byly tedy nalezeny některé metody, které by mohly v budoucnu pomoci v charakterizaci fenotypu zvířete pro preklinické testování, protože u člověka jsou pohybové problémy jedním z nejvýraznějších znaků choroby.

U této skupiny možná absence těchto poruch jen nemusela být zatím ukázána a ukáže se až s dalším testováním, kterému byly těmito metodami položeny základy anebo jsou Liběchovská miniprasata ještě mladá na behaviorální změny, i když biochemické změny se již projevují.

Závěr

Huntingtonova choroba je neurodegenerativní onemocnění na které se v poslední době zaměřuje čím dál větší pozornost. Je to hlavně z důvodu kombinace vysoko procentní dědičnosti a pozdním projevem choroby. Příčina HD je známa již spoustu let, o to zarážející je, že stále není nalezen lék. Ještě zajímavější fakt je poté to, že stále není přesně známa hlavní funkce Htt v těle, pravděpodobně proto, že je to velmi komplexní protein, který se účastní mnoha drah a je pro řadu systémů fungování těla nepostradatelný.

Proto je důležité nalézt vhodný model pro tuto chorobu, aby se mohlo lépe prozkoumat fungování Htt a možné léky. Jako jeden z vhodných modelů se zatím jeví miniprase, které má podobnou hmotnost jako člověk, velikost a uspořádání mozku i celkovou stavbu těla. Liběchovské miniprase je zatím slibně vypadající model HD, proto je velmi důležitý popis tohoto modelu. Po biochemické stránce se výsledky podobají výsledkům u lidských pacientů, tyto výsledky jsou taktéž v této práci zmíněny, jako množství fragmentů Htt objevující se nejvíce ve varlatech a v mozku a stoupající s věkem. Teď již jen chybí behaviorální a kognitivní změny u miniprasete, které jsou známé u lidských pacientů. Z tohoto důvodu jsem se v této práci věnovala i této problematice a snažila jsem se zavést vhodnou metodiku pro testování těchto změn. Výsledky nebyly staticky průkazné, ale důvodů může být několik. Jednak nedostatečná velikost skupiny, z F0 generace v tuto chvíli již žádná zvířata nejsou a z F1 pouze 3, ale mohl hrát roli i nízký věk miniprasete. U člověka s pozdním nástupem nemoci také dochází až později k projevu behaviorálních a kognitivních změn, proto u Liběchovských prasat k těmto změnám ještě může dojít. V každém případě základy metody zavedené v této práci mohou sloužit jako základ pro budoucí behaviorální a kognitivní testování HD miniprasat i jiných miniprasečích modelů neurodegenerativních onemocnění.

Seznam citací

- Aronin, N. et al. 1995. "CAG Expansion Affects the Expression of Mutant Huntingtin in the Huntington's Disease Brain." *Neuron* 15(5):1193–1201.
- Arrasate, Montserrat, Siddhartha Mitra, Erik S. Schweitzer, Mark R. Segal, and Steven Finkbeiner. 2004. "Inclusion Body Formation Reduces Levels of Mutant Huntingtin and the Risk of Neuronal Death." 431(October).
- Arzberger, Thomas, Klaus Kramppl, Susanne Leimgruber, and Adolf Weindl. 1997. "Changes of NMDA Receptor Subunit (NR1, NR2B) and Glutamate Transporter (GLT1) mRNA Expression in Huntington's Disease - An In Situ Hybridization Study." *Journal Of Neuropathology and Experimental Neurology* 56(4):440–54.
- Atwal, Randy Singh et al. 2007. "Huntingtin Has a Membrane Association Signal That Can Modulate Huntingtin Aggregation, Nuclear Entry and Toxicity." *Human Molecular Genetics* 16(21):2600–2615.
- Baxa, M. et al. 2013. "A Transgenic Minipig Model of Huntington's Disease Monika Baxa." *Journal of Huntington's Disease* 2:47–68.
- Becher, Mark W. et al. 1998. "Intranuclear Neuronal Inclusions in Huntington ' S Disease and Dentatorubral and Pallidoluyian Atrophy : Correlation between the Density of Inclusions and IT15 CAG Triplet Repeat Length." 397:387–97.
- Beraldi, Rosanna et al. 2015. "A Novel Porcine Model of Ataxia Telangiectasia Reproduces Neurological Features and Motor de Fi Cits of Human Disease." 24(22):6473–84.
- Binedell, J., J. R. Soldan, J. Scourfield, and P. S. Harper. 1996. "Huntington's Disease Predictive Testing: The Case for an Assessment Approach to Requests from Adolescents." *Journal of medical genetics* 33:912–18.
- Brito, V. et al. 2013. "Imbalance of p75 NTR / TrkB Protein Expression in Huntington ' S Disease : Implication for Neuroprotective Therapies." 1–15.
- Buck, Eva et al. 2017. "High-Resolution Respirometry of Fine-Needle Muscle Biopsies in Pre-Manifest Huntington ' S Disease Expansion Mutation Carriers Shows Normal

- Mitochondrial Respiratory Function.” 1–21.
- Busch, Anne et al. 2003. “Mutant Huntingtin Promotes the Fibrillogenesis of.” *278(42):41452–61.*
- Cambon, Karine et al. 2017. “Preclinical Evaluation of a Lentiviral Vector for Huntingtin Silencing.” *Molecular Therapy: Methods & Clinical Development* 5(June):259–76. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.omtm.2017.05.001>).
- Caviston, Juliane P., Jennifer L. Ross, Sheila M. Antony, Mariko Tokito, and Erika L. F. Holzbaur. 2007. “Huntingtin Facilitates Dynein / Dynactin-Mediated Vesicle Transport.” *104(24):1–6.*
- Colpoys, J. D., C. E. Abell, and N. K. Gabler. 2015. “Feed Efficiency Effects on Barrow and Gilt Behavioral Reactivity to Novel Stimuli Tests 1.” 1267–75.
- Conneally, P. M. 1984. “Huntington Disease: Genetics and Epidemiology.” *American journal of human genetics* 36(3):506–26. Retrieved (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1684448&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>).
- Davies, Stephen W. et al. 1997. “Formation of Neuronal Intranuclear Inclusions Underlies the Neurological Dysfunction in Mice Transgenic for the HD Mutation.” *Cell* 90(3):537–48.
- Desmond, Carly R., Randy Singh Atwal, Jianrun Xia, and Ray Truant. 2012. “Identification of a Karyopherin κ 1 / κ 2 Proline-Tyrosine Nuclear Localization Signal in Huntingtin Protein *.” *287(47):39626–33.*
- DiFiglia, M. et al. 1995. “Huntingtin Is a Cytoplasmic Protein Associated with Vesicles in Human and Rat Brain Neurons.” *Neuron* 14(5):1075–81. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7748555>).
- DiFiglia, M. et al. 1997. “Aggregation of Huntingtin in Neuronal Intranuclear Inclusions and Dystrophic Neurites in Brain.” *Science* 277(5334):1990–93. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9302293>).
- El-Daher, Marie-Therese et al. 2015. “Huntingtin Proteolysis Releases Non-polyQ

- Fragments That Cause Toxicity through Dynamin 1 Dysregulation." 34(17):2255–71.
- Evers, Melvin M. et al. 2015. "Making (Anti-) Sense out of Huntingtin Levels in Huntington Disease." *Molecular neurodegeneration* 10(1):21. Retrieved (<http://www.molecularneurodegeneration.com/content/10/1/21>).
- Ferrante, Robert J., Neil W. Kowall, Edward P. Richardson, James Homer, and Wright Pathology. 1991. "Proliferative and Degenerative Changes in Striatal Spiny Neurons in Huntington ' S Disease : A Combined Study Using the Section-Golgi Method and Calbindin D28k Lmmunocytochemistry." (December).
- Folstein, S. E., G. A. Chase, W. E. Wahl, A. M. McDonnell, and M. F. Folstein. 1987. "Huntington Disease in Maryland: Clinical Aspects of Racial Variation." *American journal of human genetics* 41(2):168–79. Retrieved (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1684204&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>).
- Fusco, Francesca R. et al. 1999. "Cellular Localization of Huntingtin in Striatal and Cortical Neurons in Rats: Lack of Correlation with Neuronal Vulnerability in Huntington's Disease." *The Journal of neuroscience* 19(4):1189–1202.
- Gafni, Juliette and Lisa M. Ellerby. 2002. "Calpain Activation in Huntington's Disease." *J. Neurosci.* 22(12):4842–49. Retrieved (<http://www.jneurosci.org/content/22/12/4842.full>).
- Gauthier, Laurent R. et al. 2004. "And Survival of Neurons by Enhancing BDNF Vesicular Transport along Microtubules." *Cell* 118:127–38.
- Godin, Juliette D. et al. 2005. "Article Huntingtin Is Required for Mitotic Spindle Orientation and Mammalian Neurogenesis."
- Gutekunst, Claire-anne et al. 1999. "Nuclear and Neuropil Aggregates in Huntington ' S Disease : Relationship to Neuropathology." 19(7):2522–34.
- Hackam, Abigail S. et al. 1998. "The Influence of Huntingtin Protein Size on Nuclear Localization and Cellular Toxicity." 141(5):1097–1105.

- Hartl, F. Ulrich, Andreas Bracher, and Manajit Hayer-Hartl. 2014. "Molecular Chaperones in Protein Folding and Proteostasis." (July 2011).
- Hermel, E. et al. 2004. "Specific Caspase Interactions and Amplification Are Involved in Selective Neuronal Vulnerability in Huntington's Disease." *Cell death and differentiation* 11(4):424–38. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1038/sj.cdd.4401358>).
- Hickey, M. A., K. Gallant, G. G. Gross, and M. S. Levine. 2005. "Early Behavioral Deficits in R6 / 2 Mice Suitable for Use in Preclinical Drug Testing." 20:1–11.
- Hilditch-Maguire, P. et al. 2000. "Huntingtin: An Iron-Regulated Protein Essential for Normal Nuclear and Perinuclear Organelles." *Human Molecular Genetics* 9(19):2789–97. Retrieved (<http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=11092755&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers2://publication/uuid/BA6DB0F9-3AA5-4A1A-9066-89B6B16E18EE>).
- Hoffner, Guylaine, Pascal Kahlem, and Philippe Djian. 2002. "Perinuclear Localization of Huntingtin as a Consequence of Its Binding to Microtubules through an Interaction with Beta-Tubulin: Relevance to Huntington's Disease." *Journal of cell science* 115(Pt 5):941–48.
- Hözlner, E. et al. 2012. "C01 TRACK-TGHD MINIPIG -- Introduction of a Longitudinal tgHD Minipig Phenotyping Study Using MRI , Motor and Cognitive Endpoints These Include : Email Alerting Service."
- von Horsten, S. et al. 2003. "Transgenic Rat Model of Huntington's Disease." *Human Molecular Genetics* 12(6):617–24. Retrieved (<http://www.hmg.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/hmg/ddg075>).
- Huntington, George. 1872. "On Chorea." *The Medical and Surgical Reporter* 26(15):317–21.
- Huntington, The et al. 1993. "A Novel Gene Containing a Trinucleotide That Is Expanded and Unstable on Huntington ' S Disease Chromosomes." 72:971–83.

- Cha, J. H. J. 2007. "Transcriptional Signatures in Huntington's Disease." *Progress in Neurobiology* 83(4):228–48.
- Chen, Guo-lin, Qi Ma, Dharmendra Goswami, and Gregory M. Miller. 2017. "Modulation of Nuclear REST by Alternative Splicing: A Potential Therapeutic Target for Huntington's Disease." XX(X):1–11.
- Choo, Yeun S., G. V. W. Johnson, Marcy MacDonald, Peter J. Detloff, and Mathieu Lesort. 2004. "Mutant Huntingtin Directly Increases Susceptibility of Mitochondria to the Calcium-Induced Permeability Transition and Cytochrome c Release." *Human Molecular Genetics* 13(14):1407–20.
- Jacobsen, Jessie C. et al. 2010. "An Ovine Transgenic Huntington's Disease Model." *Human Molecular Genetics* 19(10):1873–82.
- Jahreiss, Luca, Fiona M. Menzies, and David C. Rubinsztein. 2008. "The Itinerary of Autophagosomes: From Peripheral Formation to Kiss-and-Run Fusion with Lysosomes." (5):574–87.
- Jansen, Anne H. P. et al. 2016. "Frequency of Nuclear Mutant Huntingtin Inclusion Formation in Neurons and Glia Is Cell-Type-Specific."
- Jimenez-sanchez, Maria et al. 2015. "Europe PMC Funders Group siRNA Screen Identifies QPCT as a Druggable Target for Huntington's Disease." 11(5):347–54.
- Kalchman, Michael A. et al. 1996. "Nucleic Acids, Protein Synthesis, and Molecular Genetics: Huntingtin Is Ubiquitinated and Interacts with a Specific Ubiquitin-Conjugating Enzyme." *Journal of Biological Chemistry* 271(32):19385–94.
- Kazantsev, A. K., E. P. Reisinger, A. D. Ranovsky, and D. G. Oldgaber. 1999. "Insoluble Detergent-Resistant Aggregates Form between Pathological and Nonpathological Lengths of Polyglutamine in Mammalian Cells." 96(September):11404–9.
- Kegel, Kimberly B. et al. 2002. "Huntingtin Is Present in the Nucleus, Interacts with the Transcriptional Corepressor C-Terminal Binding Protein, and Represses

- Transcription *." 277(9):7466–76.
- Kim, Mee Whi, Yogarany Chelliah, Sang Woo Kim, Zbyszek Otwinowski, and Ilya Bezprozvanny. 2009. "Secondary Structure of Huntingtin Amino-Terminal Region." *Structure* 17(9):1205–12.
- Kolli, Nivya, Ming Lu, Panchanan Maiti, and Julien Rossignol. 2017. "CRISPR-Cas9 Mediated Gene-Silencing of the Mutant Huntingtin Gene in an In Vitro Model of Huntington ' S Disease." 1–14.
- Krawczak, M. et al. 1991. "Covariate-Dependent Age-at-Onset Distributions for Huntington Disease." *American journal of human genetics* 49(4):735–45.
- Lajoie, Patrick and Erik Lee Snapp. 2010. "Formation and Toxicity of Soluble Polyglutamine Oligomers in Living Cells." 5(12).
- Lee, J., E. M. Ramos, J. Lee, and T. Gillis. 2012. "ARTICLES CAG Repeat Expansion in Huntington Disease Determines Age at Onset in a Fully Dominant Fashion."
- Li, Wei, Louise C. Serpell, Wendy J. Carter, David C. Rubinsztein, and James A. Huntington. 2006. "Expression and Characterization of Full-Length Human Huntingtin , an Elongated HEAT Repeat Protein * □." 281(23):15916–22.
- Liu, Kuan-yu et al. 2015. "Disruption of the Nuclear Membrane by Perinuclear Inclusions of Mutant Huntingtin Causes Cell-Cycle Re-Entry and Striatal Cell Death in Mouse and Cell Models of Huntington ' S Disease." 24(6):1602–16.
- Liu, Wan-chun et al. 2015. "Human Mutant Huntingtin Disrupts Vocal Learning in Transgenic Songbirds." *Nat Neurosci* 18(11):1617–22. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1038/nn.4133>).
- Lopes, Carla et al. 2016. "Dominant-Negative Effects of Adult-Onset Huntingtin Mutations Alter the Division of Human Embryonic Stem Cells-Derived Neural Cells." *PLoS ONE* 11(2):1–16.
- Luo, Shouqing, Coralie Vacher, Janet E. Davies, and David C. Rubinsztein. 2005. "Cdk5 Phosphorylation of Huntingtin Reduces Its Cleavage by Caspases: Implications for Mutant Huntingtin Toxicity." *Journal of Cell Biology* 169(4):647–56.

- Macakova, Monika et al. 2016. "Mutated Huntingtin Causes Testicular Pathology in Transgenic Minipig Boars." *Neuro-degenerative diseases* 16(3–4):245–59. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26959244>).
- Mangiarini, Laura et al. 1996. "Exon I of the HD Gene with an Expanded CAG Repeat Is Sufficient to Cause a Progressive Neurological Phenotype in Transgenic Mice." *Cell* 87(3):493–506.
- Mcfarland, Karen N. et al. 2014. "MeCP2 : A Novel Huntingtin Interactor." 23(4):1036–44.
- Mckinstry, X.Spencer U. et al. 2014. "Huntingtin Is Required for Normal Excitatory Synapse Development in Cortical and Striatal Circuits." 34(28):9455–72.
- Mende-mueller, Liane M., Thomas Toneff, Shin-rong Hwang, Marie-francoise Chesselet, and Vivian Y. H. Hook. 2001. "Tissue-Specific Proteolysis of Huntingtin (Htt) in Human Brain : Evidence of Enhanced Levels of N- and C-Terminal Htt Fragments in Huntington ' S Disease Striatum." 21(6):1830–37.
- Molano-Eslava, Juan Carlos et al. 2008. "Obsessive-Compulsive Disorder Symptoms in Huntington's Disease: A Case Report." *Revista colombiana de psiquiatria* 37(4):644–54. Retrieved (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2788954&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>).
- Morton, A.Jennifer et al. 2005. "A Combination Drug Therapy Improves Cognition and Reverses Gene Expression Changes in a Mouse Model of Huntington ' S Disease." 21:855–70.
- Myers, R. H. et al. 1989. "Homozygote for Huntington Disease." *American journal of human genetics* 45(4):615–18. Retrieved (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1683503&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>).
- Nasir, Jamal et al. 1995. "Targeted Disruption of the Huntington's Disease Gene Results in Embryonic Lethality and Behavioral and Morphological Changes in Heterozygotes." *Cell* 81:811–23. Retrieved

(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1092867495905421>).

- Neuwald, A. F. and T. Hirano. 2000. "HEAT Repeats Associated with Condensins, Cohesins, and Other Complexes Involved in Chromosome-Related Functions." *Genome Research* 10(10):1445–52.
- Nguyen, Giang D., Solen Gokhan, Aldrin E. Molero, and Mark F. Mehler. 2013. "Selective Roles of Normal and Mutant Huntingtin in Neural Induction and Early Neurogenesis." 8(5):1–11.
- Ochaba, Joseph et al. 2014. "Potential Function for the Huntingtin Protein as a Scaffold for Selective Autophagy." 111(47).
- Orr, Harry T. 2012. "Polyglutamine Neurodegeneration : Expanded Glutamines Enhance Native Functions." *Current Opinion in Genetics & Development* 22(3):251–55. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.gde.2012.01.001>).
- Palidwor, Gareth A. et al. 2009. "Detection of Alpha-Rod Protein Repeats Using a Neural Network and Application to Huntingtin." *PLoS Computational Biology* 5(3).
- Paulsen, J. .., R. Ready, J. Hamilton, M. .. Mega, and J. Cummings. 2001. "Neuropsychiatric Aspects of Huntington ' S Disease." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 5:310–14.
- Paulsen, Jane S. et al. 2014. "Clinical and Biomarker Changes in Premanifest Huntington Disease Show Trial Feasibility: A Decade of the PREDICT-HD Study." *Frontiers in Aging Neuroscience* 6(APR):1–11.
- Persichetti, Francesca et al. 1995. "Normal and Expanded Huntingtin â€™ S Disease Gene Alleles Produce Distinguishable Proteins Due to Translation Across the CAG Repeat." 1(4):374–83.
- Piel, Margaret J., Jeffrey S. Kroin, Andre J. van Wijnen, Ranjan Kc, and Hee-Jeong Im. 2014. "Pain Assessment in Animal Models of Osteoarthritis." *Gene* 537(10):184–88.
- Pokorný, M. et al. 2017. "Telemetry Physical Activity Monitoring in Minipig ' S Model of Huntington ' S Disease Monitoring Fyzické Aktivity U Miniprasečího Modelu Huntingtonovy Nemoci." 111(Suppl 2):2015–18.

- Politis, Marios et al. 2008. "Hypothalamic Involvement in Huntington's Disease: An in Vivo PET Study." *Brain* 131(11):2860–69.
- Project, The U. S.–Venezuelan Collaborative Research and Nancy S. Wexler. 2004. "Venezuelan Kindreds Reveal That Genetic and Environmental Factors Modulate Huntington's Disease Age of Onset." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(10):3498–3503. Retrieved (<http://www.pnas.org/content/101/10/3498.abstract>).
- Ravikumar, Brinda et al. 2004. "Inhibition of mTOR Induces Autophagy and Reduces Toxicity of Polyglutamine Expansions in Fly and Mouse Models of Huntington Disease." *Nature genetics* 36(6):585–95. Retrieved (<http://www.nature.com/ng/journal/v36/n6/full/ng1362.html#f1>).
- Ravikumar, Brinda et al. 2005. "Dynein Mutations Impair Autophagic Clearance of Aggregate-Prone Proteins Dynein Mutations Impair Autophagic Clearance of Aggregate-Prone Proteins." (August).
- Reiner, A. et al. 1988. "Differential Loss of Striatal Projection Neurons in Huntington Disease." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85(15):5733–37. Retrieved (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=281835&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Rigamonti, D. 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(10):3705–13. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10804212>).
- Rosenblatt, Adam. 2007. "Neuropsychiatry of Huntington's Disease." *Dialogues in Clinical Neuroscience* 9(2):191–97.
- Scahill, Rachael I. et al. 2013. "Clinical Impairment in Premanifest and Early Huntington's Disease Is Associated with Regionally Specific Atrophy." 529(November 2011):519–29.
- Shimojo, Masahito. 2008. "Huntingtin Regulates RE1-Silencing Transcription

- Factor/neuron-Restrictive Silencer Factor (REST/NRSF) Nuclear Trafficking Indirectly through a Complex with REST/NRSF-Interacting LIM Domain Protein (RILP) and Dynactin p150 Glued.” *Journal of Biological Chemistry* 283(50):34880–86.
- Schilling, Birgit et al. 2006. “By Mass Spectrometry MODULATION OF CLEAVAGE AND TOXICITY * □.” 281(33):23686–97.
- Schramke, S. et al. 2017. “The Libechov Minipig as a Large Animal Model for Preclinical Research in Huntington ’ S Disease – Thoughts and Perspectives.” 111(Suppl 2):55–60.
- Schramke, Sarah et al. 2015. “Behavioral Phenotyping of Minipigs Transgenic for the Huntington Gene.” *Journal of Neuroscience Methods* 265:34–45. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.jneumeth.2015.11.013>).
- Schubert, Robin et al. 2015. “Neuroimaging of a Minipig Model of Huntington’s Disease: Feasibility of Volumetric, Diffusion-Weighted and Spectroscopic Assessments.” *Journal of Neuroscience Methods* 265:46–55. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.jneumeth.2015.11.017>).
- Sipione, Simonetta and Elena Cattaneo. 2001. “Modeling Huntington ’ S Disease in Cells , Flies , and Mice.” 23(1):21–51.
- Steffan, J. S. 2004. “SUMO Modification of Huntingtin and Huntington’s Disease Pathology.” *Science* 304(5667):100–104. Retrieved (<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1092194>).
- Steffan, Joan S. et al. 2000. “The Huntington ’ S Disease Protein Interacts with p53 and CREB-Binding Protein and Represses Transcription.” (12).
- Sun, Ying, Anneli Savanenin, P.Hemachandra Reddy, and Ya Fang Liu. 2001. “Polyglutamine-Expanded Huntingtin Promotes Sensitization of N-Methyl-D-Aspartate Receptors via Post-Synaptic Density 95.” *Journal of Biological Chemistry* 276(27):24713–18.
- Takano, Hiroki and James Gusella. 2002. “The Predominantly HEAT-like Motif Structure

- of Huntingtin and Its Association and Coincident Nuclear Entry with Dorsal, an NF- κ B/Rel/dorsal Family Transcription Factor." *BMC Neuroscience* 3(1):15. Retrieved (<http://www.biomedcentral.com/1471-2202/3/15>).
- Tartari, Marzia et al. 2008. "Phylogenetic Comparison of Huntingtin Homologues Reveals the Appearance of a Primitive polyQ in Sea Urchin." *Molecular Biology and Evolution* 25(2):330–38.
- Thompson, J. C., J. S. Snowden, D. Craufurd, and D. Neary. 2002. "Behavior in Huntington's Disease: Dissociating Cognition-Based and Mood-Based Changes." *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 14(1):37–43. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11884653><http://psychiatryonline.org/data/Journals/NP/3917/37.pdf>).
- Tykalova, T. et al. 2017. "Grunt Ing in a Genetical Ly Modified Minipig Animal Model for Huntington ' S Disease – Pilot Experiments Chrochtání U Geneticky Modifi Kovaného Zvířecího Modelu Miniprasat pro Huntingtonovu Chorobu – Pilotní." 111(Suppl 2):61–65.
- Tykalova, Tereza, Jan Ruzs, Eva Baborova, and Jan Roth. 2014. "Characteristics and Occurrence of Speech Impairment in Huntington ' S Disease : Possible Influence of Antipsychotic Medication." 1529–39.
- Uchida, Masaki et al. 2001. "Production of Transgenic Miniature Pigs by Pronuclear Microinjection." 577–82.
- Valekova, Ivona et al. 2016. "Revelation of the IFN α , IL-10 , IL-8 and IL-1 β as Promising Biomarkers Re Fl Ecting Immuno-Pathological Mechanisms in Porcine Huntington â€™ S Disease Model." *Journal of Neuroimmunology* 293:71–81. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.jneuroim.2016.02.012>).
- Velier, James et al. 1998. "Wild-Type and Mutant Huntingtins Function in Vesicle Trafficking in the Secretory and Endocytic Pathways." *Experimental neurology* 152(1):34–40.
- Vodička, Petr et al. 2005. "The Miniature Pig as an Animal Model in Biomedical Research." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1049:161–71.

- Vonsattel, J. P. et al. 1985. "Neuropathological Classification of Huntington's Disease." *J Neuropathol Exp Neurol* 44(6):559–77. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2932539>).
- Vonsattel, Jean-paul and M. DiFiglia. 1998. "Huntington Disease." *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 57(5):369–84.
- Wang, Chuan-en et al. 2005. "Polyglutamine Expansion of Huntingtin Impairs Its Nuclear Export Polyglutamine Expansion of Huntingtin Impairs Its Nuclear Export." (March 2017).
- Wanker, Erich E. et al. 1999. "[24] Membrane Filter Assay for Detection of Amyloid-like Polyglutamine-Containing Protein Aggregates." *Methods in Enzymology* 309:375–86. Retrieved (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687999090266>).
- Wellington, Cheryl L. et al. 1998. "Caspase Cleavage of Gene Products Associated with Triplet Expansion Disorders Generates Truncated Fragments Containing the Polyglutamine Tract *." 273(15):9158–67.
- Wellington, Cheryl L. et al. 2000. "Inhibiting Caspase Cleavage of Huntingtin Reduces Toxicity and Aggregate Formation in Neuronal and Nonneuronal Cells." *Journal of Biological Chemistry* 275(26):19831–38.
- Wong, Yvette C. and Erika L. F. Holzbaur. 2014. "The Regulation of Autophagosome Dynamics by Huntingtin and HAP1 Is Disrupted by Expression of Mutant Huntingtin , Leading to Defective Cargo Degradation." 34(4):1293–1305.
- Xia, Jianrun, Denise H. Lee, Jillian Taylor, Mark Vandelft, and Ray Truant. 2003. "Huntingtin Contains a Highly Conserved Nuclear Export Signal." 12(12):1393–1403.
- Yang, Dongshan et al. 2010. "Expression of Huntington's Disease Protein Results in Apoptotic Neurons in the Brains of Cloned Transgenic Pigs." *Human Molecular Genetics* 19(20):3983–94.
- Yang, Shang-hsun et al. 2008. "Towards a Transgenic Model of Huntington's Disease in

- a Non-Human Primate." *Nature* 453(7197):921–24.
- Zheng, Shuqiu et al. 2010. "Deletion of the Huntingtin Polyglutamine Stretch Enhances Neuronal Autophagy and Longevity in Mice." 6(2).
- Zheng, Zhiqiang, Aimin Li, Brandon B. Holmes, Jayne C. Marasa, and Marc I. Diamond. 2013. "An N-Terminal Nuclear Export Signal Regulates Trafficking and Aggregation of Huntingtin (Htt) Protein Exon 1 *." 288(9):6063–71.
- Zuccato, Chiara and Elena Cattaneo. 2007. "Role of Brain-Derived Neurotrophic Factor in Huntington's Disease." *Progress in Neurobiology* 81(5–6):294–330.
- Zuccato, Chiara, Marta Valenza, and Elena Cattaneo. 2010. "Molecular Mechanisms and Potential Therapeutical Targets in Huntington ' S Disease." *Physiol Rev* 90(3):905–81.