

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Biologie

Buněčná a vývojová biologie



Bc. Nikola Butalová

Charakterizace imunitních buněk a sledování změn zánětlivých proteinů u miniprasečího modelu Huntingtonovy choroby

Characterization of immune cells and monitoring changes of inflammatory proteins in minipig model of Huntington's disease

Diplomová práce

Školitel: prof. MVDr. Jan Motlík, DrSc.

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 dne 14. srpna 2017

.....
Nikola Butalová

Školitel: prof. MVDr. Jan Motlík, DrSc.

Školitel - specialista: Mgr. Ivona Valeková, PhD.

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala svému školiteli, panu prof. MVDr. Janu Motlíkovi, DrSc. a své školitelce - specialistce, paní Mgr. Ivoně Valekové, PhD., za odborné vedení a cenné rady při zpracovávání této diplomové práce. Rovněž děkuji za ochotu a pomoc kolektivu z Laboratoře buněčné regenerace a plasticity Akademie věd České republiky v Liběchově.

Práce vznikla za finanční podpory nadace CHDI (A-8248, A-5378), projektu ExAM (CZ.1.05/2.1.00/03.0124), výzkumného záměru ÚŽFG AV ČR, v.v.i. (RVO 67985904) a Grantové agentury Univerzity Karlovy v Praze (projekt č. 378215).

ABSTRAKT

Huntingtonova choroba (HD - Huntington's disease) je dědičné neurodegenerativní onemocnění způsobené mutací v genu huntingtin, který kóduje stejnojmenný protein. Mutovaný huntingtin se podílí na mnoha patologických interakcích a ovlivňuje řadu buněčných mechanismů včetně imunitního systému, který by mohl sloužit jako modifikátor neuropatologie onemocnění. Buňky monocyto-makrofágové linie exprimují cytokiny, jejichž produkce se mění v závislosti na aktivaci buňky. Přítomnost mutovaného proteinu huntingtin v těchto buňkách způsobuje jejich hyper-responsivitu na imunitní podněty, což vede ke změnám v produkci cytokinů. Tyto rozdíly jsou patrné již několik let před nástupem symptomů. Změny hladin určitých cytokinů by tedy mohly sloužit jako vhodné biomarkery pro sledování nástupu a progresu onemocnění.

Součástí patogeneze HD je zánět v centrální nervové soustavě. Zánětlivé změny v periferních tkáních by mohly reflektovat zánětlivé procesy v centrální nervové soustavě. Vhodným modelovým organismem pro studium vlivu mHtt (mutovaného huntingtinu) na imunitní systém by mohlo být TgHD miniprase. Tento model umožňuje sledovat pomalou progresi onemocnění. U těchto miniprasat byly nalezeny změny v produkci cytokinů v cerebrospinální tekutině a sekretomu mikroglíí. Vzhledem k obtížné izolaci těchto tělních vzorků se nabízí otázka, zda se budou zánětlivé procesy nalezené v centrální nervové soustavě těchto miniprasat odrážet v periférii, s ohledem na méně invazivní izolaci periferních tkání a tekutin.

V periferních tkáních jsme pomocí vysoce citlivé kvantitativní proteomické analýzy Luminex xMAP detekovali několik změn v produkci cytokinů (zejména IL-1 β , TNF α , IL-4, IFN α). Tyto cytokiny by se mohly stát slibnými biomarkery HD. V současné době neexistuje na onemocnění lék, dostupná léčba je zaměřena pouze na symptomy choroby. Podrobná charakterizace transgenních HD miniprasat je nutná k nalezení vhodného terapeutického přístupu a případné možnosti léčby Huntingtonovy choroby.

Klíčová slova:

Huntingtonova choroba, huntingtin, monocyty, makrofágy, cytokiny

ABSTRACT

The Huntington disease (HD) is a hereditary neuro-degenerative disorder caused by a mutation of the huntingtin gene that codes a protein of the same name. The mutated form of the huntingtin gene plays its part in many pathological interactions and influences a number of cellular mechanisms, including the immune system that could serve as a modifier of the neuropathology of the disease. The cells of the monocyte-macrophage system express cytokines whose production changes in relation to the activation of the cell. The presence of the mutated huntingtin protein in these cells renders them hyper-responsive to immunity incentives leading to changes in the production of cytokines. These differences are discernible a few years prior to the appearance of the symptoms. Therefore, the changes in the levels of certain cytokines could serve as appropriate biomarkers for monitoring of the onset of the disease and its progression.

The HD pathogenesis includes an inflammation of the central neural system. Inflammatory changes in peripheral tissues could reflect inflammatory processes in the central neural system. A miniature TgHD pig could represent an appropriate model organism for studying of the impact of the mHtt on the immune system. This model enables to observe a slow progression of the disease. Changes in the production of cytokines in the cerebrospinal fluid and of microglia secretome have been detected in miniature pigs. Given the difficulty of isolation of these body samples, a question should be asked whether inflammatory processes found in the central neural system of these miniature pigs will correspond to those in the periphery with regard to the less invasive isolation of peripheral tissues and fluids.

Using the high-sensitive quantitative proteomic analysis Luminex xMAP, we have detected several changes in the production of cytokines (especially IL-1 β , TNF α , IL-4, IFN α) in peripheral tissues. These cytokines could be used as promising HD biomarkers. At the moment, there is no cure for the disease. Available treatment focuses solely on the symptoms of the disease. A detailed characterization of transgenic HD miniature pigs is necessary in order to find an appropriate therapeutic approach and prospective treatment of the Huntington disease.

Key words:

Huntington's disease, huntingtin, monocytes, macrophages, cytokines

OBSAH

ABSTRAKT	4
ABSTRACT.....	5
SEZNAM ZKRATEK	8
CÍLE PRÁCE.....	10
ÚVOD.....	11
Historie Huntingtonovy choroby	12
Gen huntingtin	13
Projevy a formy HD	15
Neuropatogeneze	17
Struktura a úpravy Htt	18
Funkce Htt	21
Imunitní systém a Huntingtonova choroba	22
Imunitní systém	22
Buňky monocyto-makrofágové linie	23
Role mutovaného huntingtinu v imunitním systému.....	26
Cytokiny	31
Modelové organismy.....	33
Model transgenního miniprasete pro HD	34
METODIKA	36
Monocyty	38
Izolace BPMCs	38
Izolace monocytů metodou MACS	38
Kultivace a stimulace monocytů	39
Makrofágy z diferenciováných monocytů	40
Izolace a kultivace monocytů	40
Diferenciace a stimulace monocytů/makrofágů	40
Makrofágy izolované z peritoneální laváže	41

Laváž peritonea a izolace PEC	41
Izolace makrofágů	41
Stimulace makrofágů	42
Krevní sérum	42
Určení životnosti buněk	42
Charakterizace buněk	43
Western blotting	46
Luminex xMAP®	48
Příprava vzorků a kalibrační řady	48
Příprava detekční protilátky a inkubace	50
Příprava Streptavidinu RPE a inkubace	50
Získání dat a analýza	50
VÝSLEDKY	53
Charakterizace imunitních buněk	53
Charakterizace PBMCs	53
Charakterizace makrofágů diferencovaných z monocytů	57
Charakterizace makrofágů získaných z peritoneální laváže	59
Detekce proteinu huntingtin	62
Profilování cytokinů	63
Monocyty	63
Makrofágy z diferencovaných monocytů	67
Makrofágy z peritoneální laváže	71
Sérum	74
DISKUZE	77
ZÁVĚR	83
CITACE	84

SEZNAM ZKRATEK

ANOVA	z angl. <i>Analyse of Variance</i>
APC	z angl. <i>Antigen Presenting Cell</i>
BDNF	z angl. <i>Brain Derived Neurotrophin Factor</i>
CAA	Cytosin - Adenin - Adenin
CAG	Cytosin - Adenin - Guanin
CB2	z angl. <i>Cannabinoid Receptor 2</i>
CBP	z angl. <i>CREB-binding protein</i>
CMA	z ang. <i>Chaperone-Mediated Autophagy</i>
CNS	centrální nervová soustava
CSF	z angl. <i>CerebroSpinal Fluid</i>
ELISA	z angl. <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
EPR5526	huntingtin antibody
F0, F1, F2	filiální generace
FACS	z angl. <i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>
FISH	fluorescenční in situ hybridizace
GABA	gama-aminomáselná kyselina
HD	z angl. <i>Huntington's disease</i>
HIP-1	z angl. <i>Huntingtin Interacting Protein 1</i>
HTT	gen huntingtin
Htt	protein huntingtin
GM-CSF	z angl. <i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
IFN α	z angl. <i>Interferon alpha</i>
IFN γ	z angl. <i>Interferon gamma</i>
IKK γ	z angl. <i>Inhibitor of κB Kinase gamma</i>
IL-1 β	z angl. <i>Interleukin 1 beta</i>
IL-4	z angl. <i>Interleukin 4</i>
IL-6	z angl. <i>Interleukin 6</i>
IL-8	z angl. <i>Interleukin 8</i>
IL-10	z angl. <i>Interleukin 10</i>
IS	imunitní systém
JAK/STAT	z angl. <i>Janus Kinas / Signal Transducer and</i>

	<i>Activator of Transcription proteins</i>
KMO	kynurenin 3-monooxygenáza
LPS	lipopolysacharid
MACS	z angl. <i>Magnetic-Activated Cell Sorting</i>
mHtt	mutovaný huntingtin
MMP-9	z angl. <i>Matrix Metalloproteinase 9</i>
MRI	z angl. <i>Magnetic Resonance Imaging</i>
NES	z angl. <i>Nuclear Export Signal</i>
NF κ B	z angl. <i>Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NS	nestimulovaný
NSL	z angl. <i>Nuclear Localization Signal</i>
PAMP	z angl. <i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i>
PBMC	z angl. <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PCR	z angl. Polymerase Chain Reaction
PEC	z angl. <i>Peritoneal Exudate Cells</i>
PET	z angl. <i>Positron Emission Tomography</i>
polyQ	polyglutaminový řetězec
RT	z angl. <i>Room Temperature</i>
RNA	ribonukleová kyselina
siRNA	z angl. <i>small interfering RNA</i>
ST	stimulovaný
SUMO	z angl. <i>Small Ubiquitin-like Modifier</i>
TG	transgenní
TGF- β 1	z angl. <i>Transforming Growth Factor beta 1</i>
TgHD	transgenní miniprase pro Huntingtonovu chorobu
TNF α	z angl. <i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>
TLR	z angl. <i>Toll-Like-Receptors</i>
VEGF	z angl. <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
WT	z angl. <i>Wild-Type</i>

CÍLE PRÁCE

- Zavedení metodiky izolace a kultivace monocytů HD miniprasat a jejich následná diferenciaci do makrofágů (méně invazivní přístup)
- Zavedení metodiky izolace a kultivace makrofágů jako příbuzné subpopulace mikroglíí mozku HD miniprasat (invazivní přístup)
- Charakterizace izolovaných buněk pomocí průtokové cytometrie
- Stanovení hladiny zánětlivých cytokinů v sekretu makrofágů a monocytů HD miniprasat pomocí Luminexu
- Stanovení hladiny zánětlivých cytokinů v séru získaném z HD miniprasat
- Charakterizace exprese mutovaného a endogenního huntingtinu pomocí metody Western-blot

ÚVOD

Huntingtonova choroba (HD - Huntington's disease) je dědičné neurodegenerativní onemocnění způsobené mutací v jediném genu. Příčinou HD je defekt v genu IT15 nacházejícím se na 4. chromozomu. Tento defekt je zapříčiněn expandovanou repeticí tripletu CAG kódujících aminokyselinu glutamin (Q) (The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993). V důsledku této mutace, expandované repetice genu IT15, vzniká patologická konformace proteinu huntingtinu (mHtt - mutovaný huntingtin). Vzniká fibrilární forma proteinu ve struktuře β -skládaného listu, která se za fyziologických podmínek nevyskytuje (Poirier et al., 2005). Díky této abnormální konformaci získává protein nové toxické vlastnosti. Patofyziologické rysy HD jsou zapříčiněny mutovaným proteinem huntingtinem.

Pro HD je charakteristická ztráta neuronů v oblasti striata a mozkové kůry, jenž má za následek progradující motorické dysfunkce, psychické problémy a snížení kognitivních funkcí (Ross and Tabrizi, 2011). Patologie onemocnění není izolována pouze na centrální nervovou soustavu (CNS). Abnormality jsou přítomné také v periferních tkáních. Mutovaný protein Htt ovlivňuje spoustu pochodů v buňkách. Jedním z typických znaků HD je přítomnost agregátů, které poškozují neurony (Prospero and Fischbeck, 2005). Mutovaný Htt se podílí například na dysfunkci mitochondrií (Browne, 2008), ovlivňuje transport BDNF (brain derived neurotrophic factor) (Gauthier et al., 2004), způsobuje excitotoxicitu, ovlivňuje transkripční mechanismy, apoptózu a další (Leegwater-Kim and Cha, 2004). Ovlivňuje rovněž imunitní systém, přičemž způsobuje zánět v CNS, aktivaci mikroglií (Tai et al., 2007) a také se podílí na aktivaci periferního imunitního systému (Björkqvist et al., 2008). Jelikož je mutovaný huntingtin exprimován ve všech buňkách organismu, nabízí se otázka, zda budou zánětlivé změny v periferních oblastech (monocyty, makrofágy a krevní sérum) reflektovat zánětlivé procesy nalezené v CNS (mikroglie a CSF - mozkomíšní mok). Cytokiny produkované buňkami imunitního systému (IS) se zdají být možnými biomarkery pro sledování účinnosti terapeutických strategií. Správně vybrané cytokiny by mohly sloužit k měření efektivity preklinického výzkumu. Vhodný biomarker by měl být snadno měřitelný, objektivní a dostupný ve snadno přístupné tělní tekutině. Dalším důležitým krokem k nalezení účinné léčby HD je vhodný modelový organismus. Tím by mohlo být transgenní HD miniprase, nesoucí lidský gen pro HD, které je fyziologicky velmi blízké člověku. V současné době se usiluje o charakterizaci tohoto modelového organismu.

Historie Huntingtonovy choroby

Pro Huntingtonovu chorobu se rovněž používá název Huntingtonova chorea. Termín chorea poprvé vyslovil Paracelsus na přelomu 15. - 16. století. Tento název se dodnes používá pro označení mimovolných krouživých pohybů, které jsou mimo jiné charakteristickým rysem HD. HD je také známá pod označením tanec „sv. Víta“, neboť chůze osob trpících tímto onemocněním připomíná spíše tanec.

První uznávaný popis Huntingtonovy choroby, nazvaný *On Chorea*, pochází z roku 1872. Jeho autorem je americký lékař George Huntington. Jedná se relativně výstižné pojednání, které shrnuje dřívější poznatky od psychických a fyzických problémů až po snahu o léčbu Huntingtonovy choroby (Huntington, 2003). Další důležitou osobností v rámci výzkumu HD byl doktor Amerigo Negrette, který objevil v 50. letech 20. století početnou skupinu lidí trpících tímto onemocněním poblíž jezera Maracaibo ve Venezuele. Díky této skupině postižených osob byl později objeven mutovaný gen huntingtin, který způsobuje Huntingtonovu chorobu (The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993).

Gen huntingtin

Gen huntingtin, známý také jako IT15, se nachází na krátkém raménku čtvrtého lidského chromozomu (4p16.3). Je tvořen 67 exony. Jedná se o velký gen obsahující 180 kb (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3064#summary>), který kóduje stejnojmenný protein. První exon tohoto genu obsahuje nestabilní trinukleotidovou repetici CAG (cytosin-adenin-guanin). CAG repetice je podle genetického kódu kodónem pro glutamin (Q). Pokud je v genu huntingtin 40 a více CAG repetic, vždy dojde k rozvoji Huntingtonovy choroby (The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993). HD tedy patří mezi tzv. polyQ onemocnění. Gen huntingtin je mezi obratlovci velmi konzervovaný (Zuccato et al., 2010). Homolog tohoto genu byl nalezen například v amébách a červech (Palidwor et al., 2009).

Počet CAG repetic v populaci se pohybuje mezi 9 - 35. Pokud jedinci mají počet glutaminů v genu HTT v tomto rozmezí, nikdy u nich HD nepropukne. Ovšem v případě genu huntingtin je známý jev tzv. genetické anticipace. Ta předpokládá, že k mutacím jsou náchylnější úseky s vyšším počtem repetitivních sekvencí. V případě Huntingtonovy choroby dochází ke zvýšení počtu CAG repetic během přenosu z generace na generaci (Ranen et al., 1995), zejména při paternálním přenosu, kdy je mutace zděděna od otce. Tudíž i zdraví jedinci mohou mít potomky, kteří budou postiženi HD. V tomto případě je za vznik onemocnění zodpovědná právě genetická anticipace. Pokud mají rodiče počet CAG repetic v rozmezí 27 - 35 opakování (Semaka et al., 2010), jsou nositeli tzv. premutace, nedojde u nich k propuknutí HD. Ta se může rozvinout u jejich potomků, pokud zdědí expandovanou repetici CAG, zvláště od otce. Tato expanze je u mužů patrná již v testikulárních zárodečných buňkách před koncem jejich prvního meiotického dělení a byla také detekována začátkem meiotického dělení (Yoon et al., 2003). Ovšem ve všech somatických buňkách se v tomto případě nachází HTT ve stádiu premutace. Neúplná penetrance, která je typická pro rozsah 36 - 39 CAG opakování, vysvětluje stav, kdy se HD může nebo nemusí projevit.

Počet CAG repetic	
< 27 CAG	norma
27 - 35 CAG	genetická anticipace
36 - 39 CAG	neúplná penetrance
> 40 CAG	klasická forma
> 60 CAG	počátek před 20. rokem života
> 90 CAG	počátek před 10. rokem života

Tabulka č. 1 - Vztah počtu CAG repetic na projevení HD

Projevy a formy HD

Huntingtonova choroba je charakteristická poruchami, které postihují psychickou i fyzickou stránku jedince. Dochází k progresivnímu snižování motorických i poznávacích funkcí, které vyústí v totální rozpad osobnosti, demenci, absolutní závislosti na okolí. Pacienti umírají přibližně 15 let od projevení prvních symptomů onemocnění. Doposud neexistuje účinná léčba zaměřující se na příčinu onemocnění, dostupná medikace řeší pouze symptomy nemoci. V současné době je dostupné genetické testování na HD. Testování spočívá buď v potvrzení diagnózy, případně lze testovat osoby v riziku onemocnění, nicméně se jedná o velmi náročný proces ať už z psychického či etického hlediska. Další možností je prenatální či preimplantační testování (Myers, 2004).

Pro HD jsou typické psychické poruchy, které ve většině případů předchází hybným poruchám. Psychické problémy jsou velmi často prvotními symptomy. Pacienti s HD vykazují poruchy osobnosti, vědomí o jejich kompetentnosti (Hoth et al., 2007), poruchy prostorového vnímání, úzkost, deprese. Výjimkou nejsou ani halucinace, agresivita a obsedantně kompulsivní porucha. Osoby trpící HD často podléhají závislosti na alkoholu, nezajímají se o své bezprostřední okolí. Dochází ke spánkovým poruchám, v pozdějších stádiích nemoci se vyskytují problémy s inkontinencí. Výjimkou nejsou ani sexuální poruchy (Rosenblatt, 2007).

Nejvýraznějším postižením a hlavním příznakem HD, jež je téměř nepřehlédnutelné, je výše zmíněná chorea. Jedná se o charakteristické trhavé pohyby, které nelze ovládat vlastní vůlí. V počátečních stádiích onemocnění je chorea patrná na horních končetinách a obličejové části. Přítomnost mutovaného proteinu rovněž způsobuje poruchy cílené motoriky. Chůze se s pokračujícím onemocněním HD stává obtížnou, pacienti chodí tzv. do široka. Ani časté pády nejsou výjimkou. S postupující progresí onemocnění dochází ke zhoršování pohyblivosti jedince, následnému ústupu mimovolních pohybů a celkové strnulosti. Další projevem nemoci je porucha řeči, která se postupem času stává trhavou až nesrozumitelnou. Dochází také k poruchám polykání, u pacientů není výjimečné ani vdechnutí potravy nebo tekutin. Nemocní často trpí výrazným snížením hmotnosti.

Huntingtonovu chorobu lze rozdělit do třech forem - klasická forma, juvenilní forma a forma s pozdním nástupem

Nejrozšířenější je klasická forma, jejíž nástup přichází obvykle kolem 40. - 50. roku života. Tato forma se vyskytuje v 90 % případů. Prvotní symptomy jsou často nespecifické, ale ve většině případů dochází z počátku spíše k psychickým poruchám. Následně dochází k rozvinutí motorických problémů. Nicméně průběh HD je u každého člověka individuální a mohou převládat jak poruchy fyzické tak i psychické. Pacienti s touto formou onemocnění se většinou do 15 let stávají zcela závislí na péči okolí a během pár let umírají.

Juvenilní forma HD manifestuje před 20. rokem života. U této formy není tolik patný výskyt chorey, ale spíše celková strnulost. Průběh nemoci je agresivnější než u klasické formy. Zpočátku se choroba projevuje poruchami psychiky, následně dochází k rychlému rozvoji demence. Expandovaná alela obsahuje vysoký počet CAG repetit, a ve většině případů je zděděna od otce. Přičemž k expanzi dochází během spermatogeneze (Kremer et al., 1995).

Forma s pozdním nástupem je charakteristická projevem symptomů po 60. roku života. Objevují se mimovolní pohyby, které většinou nejsou tak progradující a pacienty výrazně neomezují. Osoby trpící touto formou dosahují průměrného věku dožití v populaci.

Neuropatogeneze

Pro Huntingtonovu chorobu je charakteristické poškození a následná atrofie specifických projekčních neuronů především v oblasti *striata* a *kortexu* (Reiner et al., 1988; Vonsattel et al., 1985). Nicméně HD způsobuje poškození v dalších oblastech mozku (Kassubek et al., 2004; Politis et al., 2008). Oblast *striata* je součástí tzv. bazálních ganglií. Bazální ganglia jsou struktury nacházející se v koncovém mozku, které se skládají z *nucleus caudatus*, *putamen* a *globus pallidus*. Dále k nim patří např. párová část středního mozku *substantia nigra*, která zajišťuje několik funkcí převážně v řízení pohybu. *Substantia nigra* se skládá ze dvou částí s rozdílnou funkcí, *pars compacta* a *pars reticularis*.

V počátečních a středně pokročilých stádiích HD jsou více poškozeny striatální GABAergní projekční neurony, které produkují enkefaliny, což jsou opioidy nacházející se v nervové soustavě. Tyto neurony mají na svém povrchu dopaminové receptory typu D2. V pozdních stádiích odumírají neurony s D1 dopaminovými receptory vytvářející kromě GABA také substanci P, jež funguje jako neurotransmitter, který se vyskytuje zejména v oblasti *substantia nigra*. Projekční neurony propojující *striatum* se *substantia nigra pars compacta* zůstávají i v nejpokročilejších stádiích onemocnění nejméně poškozené (Reiner et al., 1988).(dopamin?)

BDNF (brain-derived neurotrophic factor) je nepostradatelný pro přežívání a aktivitu striatálních neuronů, které při HD odumírají nejdříve. Během HD dochází ke snížení hladiny tohoto neurotrofického faktoru v mozkové kůře v důsledku mutace genu huntingtin (Zuccato et al., 2005). BDNF je exprimován v centrální nervové soustavě savců, přičemž k největší produkci dochází v korových oblastech, odkud je anterogradně transportován do oblastí *striata* (Baquet et al., 2004). Snížení exprese BDNF je jedním z možných mechanismů vysvětlujících ztrátu striatálních neuronů (Cattaneo et al., 2001).

Struktura a úpravy Htt

Huntingtin obsahuje polyglutaminový úsek, který se nachází na N-konci proteinu. U savců se za tímto úsekem nachází polyprolinová oblast, jejíž nepřítomnost zabraňuje tvorbě inkluzí (Steffan et al., 2004). Jelikož je huntingtin všudypřítomně exprimován, intranukleární inkluze byly nalezeny v mozku (Davies et al., 1997) i v periférii (Sathasivam et al., 1999). V případě HD a dalších polyQ onemocnění jsou inkluze tvořeny polyglutaminou (Kaňovský, 2003). Důvodem vzniku inkluzí je expandovaná oblast glutaminů, kterou buňka nedokáže zpracovat a správně sbalit. Inkluze jsou tedy tvořeny špatně sbalenými proteiny, které jsou v případě HD tvořeny N-terminálními fragmenty mHtt. Pomocí imunocytochemie byla prokázána také přítomnost ubikvitinu v těchto útvarcích (Becher et al., 1998; Sieradzan et al., 1999).

U myších modelů R6/2 a R6/1, které vykazují symptomy typické pro HD, byly nalezeny neurální intranukleární inkluze, kdežto u HD modelů bez viditelných projevů tohoto onemocnění nebyly tyto struktury pozorovány (Davies et al., 1997). U myšího modelu HD (R6/2) byly inkluze detekovány také v tkáních, které nejsou neurálního původu. Vznik těchto bílkovinných agregátů byl nalezen ve svalových vláknech kosterního a srdečního svalu, v části nadledvinek a ledvin, v Langerhansových ostrůvcích slinivky břišní a v jaterních hepatocytech (Sathasivam et al., 1999).

Novější studie však vycházejí z toho, že inkluze mutovaného Htt mají spíše protektivní účinky na buňky. Formováním inkluzí se snižuje množství fragmentů mutovaného huntingtinu v oblastech mimo jádro, což má za následek delší schopnost přežívání neurálních buněk (Mitra et al., 2004). Vědci pracující v posledních letech na buněčných modelech HD přinášejí nové poznatky o agregaci huntingtin proteinu. Sahl a kolektiv přišel se zjištěním, že samotná tvorba inkluzí zřejmě poškozuje degradační systém buněk natolik, že v pozdějších stádiích onemocnění dochází ke vzniku nových potencionálně toxických útvarů, cytosolických fibril. Tato vlákna vznikají vždy až po zformování inkluzního tělíska (Sahl et al., 2015) a jsou několikanásobně menší než nukleární inkluze (Sahl et al., 2012).

Formování inkluzních tělísek v neuronech snižuje hladinu toxických fragmentů mHtt, které jsou pravděpodobně zodpovědné za smrt neuronů. Tvorba těchto agregátů má zřejmě pro neurony protektivní účinky (Mitra et al., 2004), což potvrzuje také novější kvantitativní studie (Miller et al., 2010).

Na degradaci chybně sbalených proteinů se podílí ubikvitin - proteázomový systém (UPS) a autofagické procesy v buňkách. K odstranění mHtt jsou využívány obě dvě degradační dráhy (Thompson et al., 2009). Typem autofagie podílejícím se na degradaci mutovaného HTT je tzv. makroautofagie (Qin et al., 2003), při níž dochází, za vzniku autofagozomů, k neselektivní degradaci proteinů. Dalším mechanismem odstranění mutovaného proteinu je autofagie, která je zprostředkována chaperony (CMA - chaperone-mediated autophagy). Jedná se o vysoce selekční systém degradace proteinů pomocí lysosomů za účasti heat shock proteinů (Hsp 70), které rozpoznávají dva specifické motivy. Mutovaná forma proteinu Htt má vyšší míru interakce s CMA než ostatní proteiny degradované pomocí této dráhy (Qi et al., 2012), čímž pravděpodobně dochází k postupnému zablokování degradačního systému a narušení proteinové homeostáze v buňkách. Tato cesta je jedním z možných vysvětlení vzniku cytoplasmatických agregátů a nukleárních inkluzí u pacientů s HD (Jeong et al., 2010).

Přítomnost expandované CAG repetice a její následné proteolytické štěpení proteinu Htt způsobuje poruchu degradačního systému v buňkách a nakonec vede ke vzniku Htt fragmentů, které jsou pro buňky toxické (Goldberg et al., 1996). Protein huntingtin je proteolyticky štěpen na specifických místech pomocí kaspázy 7, kaspázy 6 a kaspázy 2 (Hermel et al., 2004), Ca²⁺-dependentní proteázy kalpak (Gafni and Ellerby, 2002).

V mozcích HD pacientů, v *nucleus caudatus* a *putamen*, byla nalezena E3 ubikvitin ligáza, která je kódována genem Parkin. Tento gen je nejčastěji poškozen při Parkinsonově chorobě, která také spadá pod neurodegenerativní onemocnění. Důležitou funkcí této ligázy je ubikvitinace a degradace špatně sbalených proteinů obsahujících polyglutamin. Zmíněná ligáza byla detekována jak v cytoplasmatických, tak v jaderných inkluzních tělískách huntingtinu (Tsai et al., 2003).

Procesem SUMOylace dochází ke stabilizaci N-terminálních fragmentů mutovaného huntingtinu (Steffan et al., 2004), které jsou tvořeny proteinovými oligomery. SUMOylace je post-translační úprava, při které dochází k přidávání SUMO (small ubiquitin-like modifier), malého signálního proteinu, na lysinový zbytek. SUMO proteiny se neúčastní pouze stabilizace nebo degradace, ale hrají roli v několika dalších buněčných procesech (Geiss-Friedlander and Melchior, 2007). SUMOylace také zabraňuje vniknutí inkluzních tělísek (Steffan et al., 2004).

Agregáty mutovaného Htt v neuronech mohou odstranit gliové buňky pomocí scavengerového receptoru Draper (Pearce et al., 2015).

CREB-vazebný protein (CBP) obsahuje histon acetyltransferázu. Acetylace mutovaného proteinu huntingtin pomocí CBP na lysinu 444 vede k jeho zvýšené degradaci v autofagozomu v cytoplasmě, a tím může docházet ke snížení neurotoxicity (Jeong et al., 2010).

Huntingtin je schopen tvořit homodimery vazbou pomocí HEAT úseků, které vytváří α -ROD struktury (Palidwor et al., 2009). Každý úsek je složen ze dvou anti-paraletních α -helixů. Gen huntingtin je tvořen čtyřmi skupinami HEAT repetice (Tartari et al., 2008), které zajišťují proteinové interakce.

Na COOH-konci huntingtinu byla detekována aktivní jaderná exportní sekvence (NES) a naopak nebyl nalezen jaderný lokalizační signál (NLS). Protein huntingtin tedy využívá ke vstupu do jádra jiný způsob. Mezi obratlovci zůstává jaderná exportní sekvence huntingtinu velmi konzervovaná (Xia et al., 2003). Za asociaci huntingtinu s mitochondriemi, Golgiho aparátem a endoplasmatickým retikulem je zodpovědných prvních 17 aminokyselin na N-konci proteinu. Tento úsek se také podílí na tvorbě agregátů (Rockabrand et al., 2007).

Funkce Htt

Huntingtin je nepostradatelný pro správný embryonální vývoj. Protein hraje důležitou roli při vývoji mozku (Bhide et al., 1996). Knock-out tohoto genu způsobuje letalitu (Duyano et al., 1995). U bezobratlého modelu, *Drosophila melanogaster*, byl nalezen homolog HTT (Li, Karlovich, Fish, Scott, & Myers, 1999). U tohoto organismu není vývoj embrya závislý na HTT, nicméně nepřítomnost genu se projevuje během života dospělců jako snížená schopnost pohybu, dřívější úhyn a poškození nervového systému (Zhang et al., 2009). Myši (Wnt1 Cre/+; Hdhflo/-), u nichž v oblasti choroidního plexu (část mozku tvořící mozkomíšní mok (CSF)) nebyla nalezena přítomnost genu HTT, mají hydrocefalus (Dietrich et al., 2009). Hydrocefalus neboli vodnatelnost mozku je způsoben hromaděním CSF v mozkových komorách.

Huntingtin je všudypřítomně exprimován. Huntingtin se podílí na správném fungování jádra, mitochondrií, endoplasmatického retikula a Golgiho komplexu. U buněčných modelů s knock-out HTT genem byla zjištěna zmenšená velikost výše zmíněných buněčných struktur nebo jejich pozměněná distribuce v rámci buňky. Při nadměrném množství normálního HTT jsou tyto struktury také poškozeny, je tedy nutná regulace tohoto množství proteinu (Hilditch-Maguire et al., 2000).

Protein huntingtin je zapojen do buněčného transportu, díky asociaci s vezikuly. Přičemž expandovaný polyQ úsek způsobuje poruchy transportu (DiFiglia et al., 1995). Na transportu obou forem proteinu huntingtinu (mutované i wild-type) se podílí endocytická i sekreční dráha za účasti klatrinu (Velier et al., 1998), což je protein vytvářející váčky na buněčných membránách. Existuje několik proteinů, které interagují s Htt. Patří mezi ně například huntingtin interacting protein 1 (HIP1). Vazba tohoto proteinu s Htt je ovlivněna délkou polyQ úseku, ale také přítomností N-konce HIP1 (Harjes and Wanker, 2003; Wanker et al., 1997).

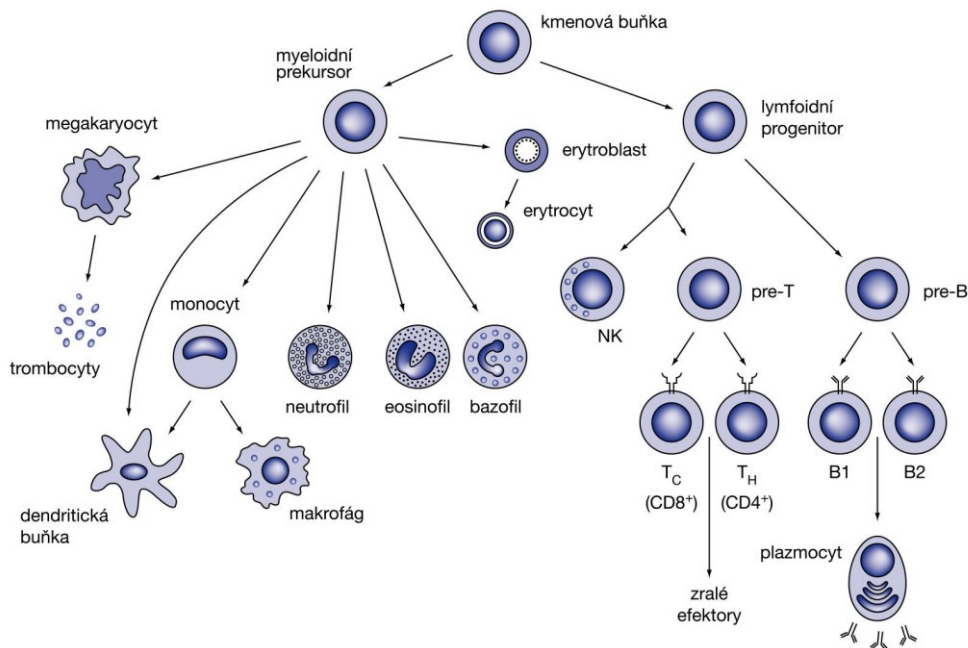
WT Htt (wild-type - zdravá forma) má protektivní účinek, a to tím, že snižuje množství mHtt fragmentů v neurálních buňkách, ale také v ne-neurálních (Ho et al., 2001). Mutovaný huntingtin také ovlivňuje NFκB dráhu, a tím produkci některých cytosinů (Khoshnan et al., 2004; Träger et al., 2014).

Imunitní systém a Huntingtonova choroba

Imunitní systém

Imunitní systém (IS) se podílí zejména na udržování integrity organismu. Hlavním úkolem IS je ochrana vnitřního prostředí před patogeny, ale také před vlastními buňkami, které jsou nějakým způsobem poškozené. Neméně důležitou funkcí IS je tzv. autotolerance neboli schopnost organismu tolerovat vlastní tkáň.

Imunitní buňky (leukocyty) patří do základních složek IS. Vznikají z kmenových pluripotentních buněk, které se nachází v kostní dřeni. Z těchto buněk vznikají dělením dvě základní linie leukocytů: lymfoidní a myeloidní. Z lymfoidní linie vznikají NK buňky, T a B lymfocyty. Myeloidní prekursor dává vznik granulocytům, monocytům a dalším typům buněk.



Obrázek č. 1 - Vývojová řada leukocytů (převzato ze *Základy imunologie*, 5. vydání, Hořejší a kol.)

Důležitou součástí IS tvoří lymfatické tkáňe a orgány, které se dělí na primární a sekundární. Primárním lymfatickým orgánem je brzlík neboli thymus a kostní dřeň. V těchto orgánech dochází k vývoji imunitních buněk. V thymu se vyvíjí většina T lymfocytů, místem vzniku

B lymfocytů je kostní dřev. Mezi sekundární lymfatické orgány patří slezina, jejíž hlavní funkcí je ochrana krve, slizniční pojivová tkáň a lymfatické uzliny. Lymfatická uzlina je místem, kde dochází ke kontaktu lymfocytů s antigeny a antigen-prezentujícími buňkami (APC). Prekurzorové lymfocyty se po setkání s kompetentním antigenem, a za účasti dalších kostimulačních signálů, aktivují, prolifерují a mění se na tzv. efektorové buňky. Efektorové T lymfocyty opouští uzlinu a přemísťují se do místa svého určení, kde v případě cytotoxických lymfocytů (T_c) ničí infikované buňky. Zatímco pomocné T lymfocyty (T_h) produkují různé cytokiny, kterými ovlivňují další buňky IS. V případě aktivovaných B lymfocytů je konečným stádiem diferenciacе plasmatická buňka, která opouští lymfatickou uzlinu, putuje do míst potřeby a tam produkuje specifické protilátky (imunoglobuliny).

Buňky monocyto-makrofágové linie

Monocyty jsou největší imunitní buňky patřící do bílých krvinek neboli leukocytů. Mají jedno jádro, často nepravidelného ledvinovitého tvaru. Vznikají z kmenových pluripotentních buněk. Vývoj monocytů dále probíhá přes mitoticky aktivní stádia monoblastu a promonocytu v kostní dřev. Monocyty opouští kostní dřev a stejně jako ostatní typy leukocytů se uvolňují do krevního oběhu. Existuje několik typů monocytů, které se liší velikostí, expresí receptorů a schopností diferenciacе (Auffray et al., 2009). Podle exprese povrchových markerů rozlišujeme 3 typy monocytů v lidském organismu: klasické ($CD14^{++} CD16^{-}$), které exprimují marker CD14, přechodné ($CD14^{++}CD16^{+}$) exprimující oba povrchové znaky a neklasické ($CD14^{+}CD16^{++}$) (Ziegler-heitbrock et al., 2010).

Monocyty v reakci na zánětlivé podněty, přibližně po 8 - 12 hodinách, vcestovávají do tkání a následně se přeměňují na různé typy makrofágů. Makrofágy se vyskytují ve většině tkání, přičemž nejvíce jsou známi v mozku jako mikroglie, v kostní tkáni to jsou osteoklasty, v kůži Langerhansovy ostrůvky a v játrech Kupfferovy buňky, atd. Monocyt při přeměně na makrofág zvětší svou velikost, zvýší se počet jejich mitochondrií a lysosomů. Dřívější názory tvrdily, že monocyty a dendritické buňky se vyvíjí ze společného obecného prekurzoru, tento názor už zřejmě ale neplatí (Sathe et al., 2014).

Monocyty a makrofágy se podílejí na řadě důležitých imunitních funkcí. Mají schopnost fagocytózy, tedy pohlcovat cizorodé částice ze svého bezprostředního okolí. Jsou rovněž významnými producenty cytokinů a C3 složky komplementu. Obsahují lysozomy, které se

podílejí na destrukci pohlcených složek. Mají rozvinuté endoplasmatické retikulum, Golgiho aparát a obsahují velké množství mitochondrií. Na své plasmatické membráně mají několik druhů receptorů, které zprostředkovávají kontakt s okolím. V procesu fagocytózy se uplatňují zejména lektiny na površích monocytů a makrofágů. Lektiny jsou proteiny schopné vázat sacharidy, které jsou často součástí povrchových struktur mikroorganismů. Existuje několik typů povrchových lektinů, např. mannosový receptor. Dalšími důležitými receptory na povrchu buněk monocyto-makrofágové linie jsou Fc receptory, které rozeznávají protilátky patogenů, a receptory komplementu. Na monocytech a makrofázích se vyskytuje receptor CD14, který spolu s TLR4 rozeznává bakteriální lipopolysacharidy. Monocyty neklasické, které exprimují receptor CD16, ale méně CD14 (CD14⁺CD16⁺⁺) se vyznačují sníženou schopností fagocytózy a mají spíše pro-zánětlivý potenciál (Skrzeczyńska-Moncznik et al., 2008). Receptor CD16, který patří do třídy Fc receptorů, exprimují ho jak cirkulující monocyty, tak i monocyty kultivované *in vitro* (Clarkson and Ory, 1988), makrofágy a další.

Pro-zánětlivé monocyty mají na svém povrchu TLR (Toll-like-receptors) a scavengerové receptory, které se účastní rozeznávání cizorodých struktur a reagují na tzv. PAMP (pathogen associated molecular pattern), což jsou struktury pro různé mikroorganismy shodné. Tyto monocyty putují do místa zánětu, uvolňují zánětlivé cytokiny a ovlivňují spuštění lokální nebo systémové odpovědi (Kurihara et al., 1997). Při zánětlivém podnětu dochází k navýšení proliferace monocytů v kostní dřeni, a tím dochází ke zvýšení počtu těchto buněk v krevním oběhu (Meuret et al., 1974).

Monocyty a makrofágy mají na svém povrchu tzv. Toll-like receptory (TLRs), které se dělí do několika rodin. TLRs byly odvozeny od receptoru Toll u octomilek (*Drosophila melanogaster*), u nichž slouží k určení dorzo-ventrální polarity během embryonálního vývoje. U savců se TLRs vyskytují na několika typech imunitních buněk vrozeného IS, ale nalezeny byly také na buňkách epiteliálních buňkách a fibroblastech (Akira et al., 2006). TLRs za spoluúčasti dalších molekul rozpoznávají mikrobiální komponenty, například výše zmíněné LPS - rozpoznáván konkrétně TLR4, čímž dochází k indukci zánětlivé odpovědi. Dojde ke spuštění TLR signální dráhy, která vede k aktivaci transkripčního faktoru NFκB, který řídí expresi zánětlivých cytokinů (Kawai and Akira, 2007).

Mikroglie, druh tkáňových makrofágů, jsou imunokompetentní buňky v CNS se schopností fagocytózy. Tyto buňky jsou velmi citlivé na změny ve svém bezprostředním okolí. Řadí se mezi neuroglie, podpůrné buňky nervového systému. Populace mikroglíí tvoří 10 - 20 %

z celkového počtu gliových buněk mozku. V normálním zdravém mozku se mikroglie nachází v klidovém stavu, pokud však dojde k nějakému poškození, přechází do aktivovaného stavu. Tyto aktivované mikroglie sekretují zánětlivé molekuly, mimo jiné IL-6, IL-8, IL-1 β a TNF α , neurotoxické cytokiny, a stávají se tak primárními zprostředkovateli zánětu v centrální nervové soustavě. Mikroglie v případě zánětu fagocytují odumírající buňky nervové soustavy a složky uvolněné ze zanikajících buněk spouští jejich aktivaci. Tento stav vyúsťuje ve změny morfologie mikroglíí a podílí se také na ovlivňování genové exprese (van Rossum and Hanisch, 2004). Právě tyto aktivované mikroglie zřejmě hrají důležitou úlohu v patogenezi HD. V posmrtných mozcích pacientů byla nalezena zvýšená aktivace mikroglíí (Sapp et al., 2001). Také již v pre-symptomatickém stádiu HD byla nalezena jejich zvýšená aktivace (Tai et al., 2007).

Role mutovaného huntingtinu v imunitním systému

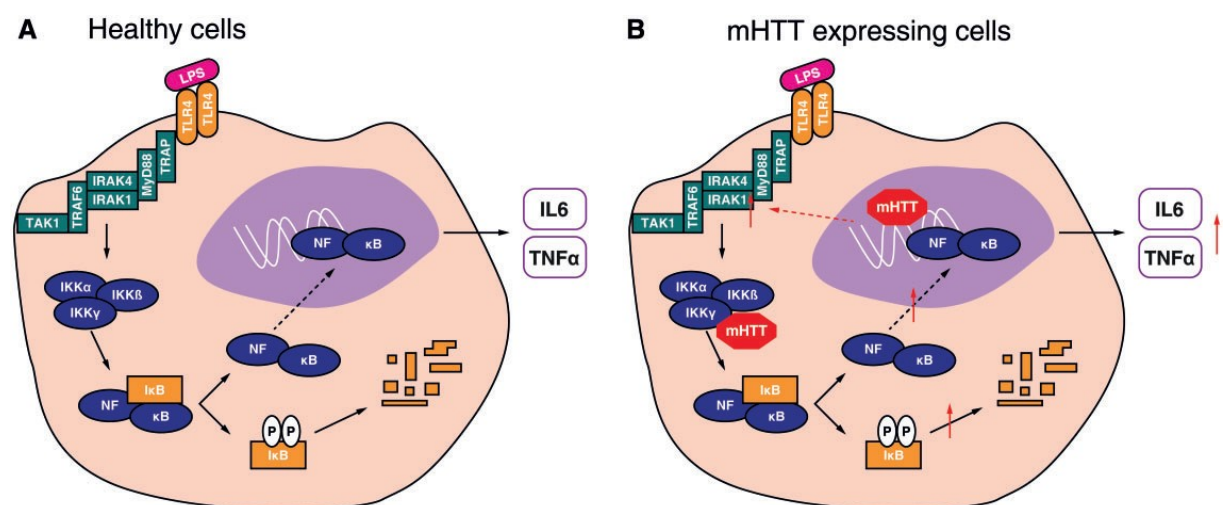
Nejen pro Huntingtonovu chorobu je charakteristický zánět centrální nervové soustavy. Na patologii několika dalších neurodegenerativních onemocnění, jako je Parkinsonova choroba, Alzheimerova choroba a amyotrofická laterální skleróza, se podílí zánětlivé změny v nervové soustavě (Harry and Kraft, 2009; Lobsiger and Cleveland, 2007). Klíčovou roli zde hrají právě aktivované mikroglie, které produkují reaktivní formy kyslíku a zánětlivé cytokiny jako je například $\text{TNF}\alpha$ a $\text{IL-1}\beta$ (Kim and de Vellis, 2005). Pro-zánětlivé cytokiny spustí další aktivaci mikroglíí, což vyústí ve vznik zánětlivé kaskády. Aktivované mikroglie produkují také excitotoxiny jako je například glutamát a chinolinová kyselina. Nedávná studie zkoumala krysy s příznaky HD, které u nich byly indukovány intrastriálním podáním kyseliny chinolinové. Po léčení klinicky dostupnými antidepresivy, sertalinem a venlafaxinem, došlo u těchto zvířat ke zlepšení HD fenotypu (Gill et al., 2017).

Patogeneze HD není ještě zcela jasně vysvětlena a pochopena. Ačkoliv je rozvoj patologie HD spjat především se ztrátou striatálních neuronů, mutovaný gen huntingtin je exprimován v řadě dalších ne-neurálních tkání (Li et al., 1993). Přičemž vyšší hladiny exprese RNA mHtt byly nalezeny v imunokompetentních buňkách (Crotti et al., 2015). Přítomnost abnormálního proteinu v imunitních buňkách mění jejich vlastnosti a funkce imunitního systému je v důsledku exprese mutovaného genu poškozena. Změny v rámci IS jsou patrné jak v centrálním nervovém systému, tak v periférii (Soulet and Cicchetti, 2011). Na poškození CNS má zřejmě vliv systémový zánět (Björkqvist et al., 2008). Zvýšené hladiny zánětlivých proteinů se vyskytují nejen v CNS, ale byly rovněž objeveny v periférii (Rocha et al., 2016).

Zapojení periferního IS do patogeneze onemocnění dokládá rovněž několik nedávných studií. V souvislosti s neurodegenerativními onemocněními jako je HD či Alzheimerova choroba se výzkum zaměřil mimo jiné na enzym metabolismu aminokyseliny tryptofanu kynurenin 3-monooxygenázu (KMO). Exprese KMO byla nalezena také v některých periferních imunitních buňkách, např. v makrofázích (Heyes et al., 1992). Perorální podání inhibitoru kynurenin 3-monooxygenázy potlačuje neurodegeneraci u myšího modelu HD, ačkoliv tento inhibitor není schopen penetrovat přes hematoencefalickou bariéru do mozku. Dále snižuje extracelulární hladinu glutamátu v mozku a zároveň redukuje aktivaci mikroglíí, což má za následek zmírnění zánětu v CNS (Zwilling et al., 2012). Myší modely HD rovněž vykazují po transplantaci WT kostní dřeně zlepšení motorických deficitů a zvýšení synaptogeneze v oblasti kortexu. Dochází k celkovému zlepšení jejich fenotypu a hladiny cytokinů IL-6 ,

IL-10 a IFN α se po zákroku vrátili na hodnoty, které odpovídaly WT kontrolám (Kwan et al., 2012a).

Monocyty, makrofágy a mikroglie získané od subjektů s HD, pokud nejsou stimulovány lipopolysacharidy, nevykazují žádné rozdílnosti v porovnání s WT buňkami (Träger et al., 2014). Nicméně stimulace pomocí LPS způsobuje hyper-aktivaci těchto imunitních buněk (Björkqvist et al., 2008). Tento fakt naznačuje působení mHtt v NF κ B signalizační dráze. U myši postižených HD dochází k interakci mHtt a transkripčního faktoru NF κ B (Khoshnan et al., 2004), který se v buňkách nachází v podobě dimeru. Tato interakce byla rovněž potvrzena u periferních myeloidních buněk získaných od pacientů s HD. Protein huntingtin reaguje s podjednotkami IKK trimeru, přičemž větší množství interakcí bylo zjištěno mezi mHtt, tedy proteinem s expandovanou CAG repeticí, a podjednotkou IKK γ , která plní regulační funkci. Tato interakce způsobí aktivaci trimeru IKK, jejímž výsledkem je fosforylace a následná zvýšená proteolytická degradace I κ B (Träger et al., 2014). Protein I κ B je inhibítoem NF κ B (Hayden et al., 2012). Štěpení I κ B umožní translokaci dimeru NF κ B do jádra, kde ovlivňuje genovou expresi (Beinke and Ley, 2004). V případě HD zvyšuje expresi genů kódujících zánětlivé cytokiny, například IL-6 a TNF α (Träger et al., 2014). Snížením množství mHtt v primárních lidských imunitních buňkách pomocí malých interferujících RNA (siRNA) nastává v buňkách zvrácení HD fenotypu, dochází ke snížení hyper-reaktivity, produkce cytokinů a změnám v transkripci. Tato data naznačují přímou závislost změn vlastností buněk IS na přítomnosti abnormální formy proteinu HTT (Träger et al., 2014).



Obrázek č. 2 - Znárodnění dysfunkce NF κ B signální dráhy v přítomnosti mHtt (převzato - Träger et al., 2014).

V krevní plasmě pacientů s HD jsou detekovatelné změny v hladinách určitých cytokinů. IL-6 a IL-8, které tvoří součást přirozené imunitní odpovědi, jsou při HD produkovány ve zvýšeném množství oproti kontrolám. Rovněž produkce proti-zánětlivých cytokinů IL-4 a IL-10 byla u pacientů zvýšena ve středně pokročilém stádiu onemocnění. Zvýšení hladiny TNF α koreluje s progresí onemocnění. Některé rozdíly jsou patrné i několik let před začátkem projevů HD, změna v produkci IL-6 byla zjištěna dokonce 16 let před počátkem klinických symptomů (Björkqvist et al., 2008). Další studie detekující hladiny plasmatických zánětlivých markerů u osob s HD zjistila zvýšené hladiny cytokinu IL-6, MMP-9 (matrix metalopeptidáza 9), VEGF a IL-1 β . Rovněž byla zjištěna snížená koncentrace cytokinu IL-18. Tyto výsledky, objevené u HD pacientů, korespondovaly s myším modelem pro HD (R6/2). Změny hladin těchto imunitních faktorů zřejmě přispívají k patogenezi HD (Chang et al., 2015). V séru HD myši byly nalezeny vyšší hladiny cytokinů IL-6, IL-10 a IL-1 β (Björkqvist et al., 2008). V séru 36 měsíčních transgenních HD miniprasat byla nalezena zvýšená hladina IL-8 (Valekova et al., 2016).

Nedávná studie našla potencionální terapeutický přístup týkající se regulace kanabinoidního receptoru typu 2 (CB2). CB2 receptory se vyskytují převážně na buňkách imunitního systému a kontrolují hladinu IL-6 v krvi. Po použití protilátky neutralizující IL-6 dochází u myšího kmene R6/2 ke zlepšení HD fenotypu (Bouchard et al., 2012). U myších modelů HD (R6/2, HdhQ150 a YAC128) byly nalezeny změny v hladinách cytokinů v krevní plasmě. Tyto změny odrážejí změny objevené u pacientů s HD (Björkqvist et al., 2008; Träger et al., 2015).

Monocyty pacientů s HD, které byly stimulovány LPS, vykazují *in vitro* zvýšenou produkci pro-zánětlivého IL-6, zvýšenou hladinu MMP-9, VEGF, TGF- β 1, TNF α , IL-1 β (Björkqvist et al., 2008; Chang et al., 2015; Träger et al., 2014). Vyšší koncentrace IL-1 β byla nalezena u monocytů získaných od pacientů v pre-manifestačním stádiu, přičemž hodnoty IL-6 a TNF α byly zvýšené ve všech stádiích nemoci. IL-6 a TNF α se podílejí na regulaci vrozené imunity (Träger et al., 2014). Stejně tak CD11⁺ myeloidní buňky získané z krve R6/2 myši mají po stimulaci zvýšenou produkci cytokinu IL-6 a TNF α , nicméně hladiny IL-1 β , IL-10 a IL-12 zůstávají nezměněné oproti kontrolní skupině. Myeloidní buňky získané ze sleziny a kostní dřeně tohoto myšího kmene rovněž naznačují rozdílnosti v produkci cytokinů. Buňky získané ze sleziny mají v porovnání s kontrolou zvýšené hladiny IL-1 β a IL-12. Nicméně hladiny cytokinů IL-6, TNF α a IL-10 zůstávají nezměněné. Buňky izolované z kostní dřeně nevykazují žádné rozdíly v produkci těchto cytokinů. (Träger et al., 2015). Myeloidní buňky izolované z krve HD myšího modelu HdhQ150, který exprimuje celou délku mHtt proteinu,

po stimulaci ukazují zvýšenou hladinu IL-1 β , TNF α a IL-12. Cytokin IL-6 je rovněž produkován buňkami ve zvýšené míře, ale tento nárůst není statisticky významný. Hladiny IL-6 a TNF α jsou zvýšené u buněk získaných ze sleziny kmene HdhQ150. IL-1 β a IL-10 jsou nenápadně zvýšené oproti WT. Buňky izolované z kostní dřeně opět nevykazují žádné rozdíly. Makrofágy diferencované *in vitro* z buněk kostní dřeně kmene YAC128 rovněž po stimulaci neukazují rozdíly v porovnání s kontrolní skupinou, přičemž u makrofágů získaných z peritoneální laváže jsou rozdíly zásadní. Zřejmě tedy záleží také na původu myeloidních buněk, nezralé myeloidní buňky získané z kostní dřeně se chovají jinak než již periferní diferencované monocyty a makrofágy, nejsou hyper-responsivní po stimulaci lipopolysacharidy. Přičemž množství mHtt proteinu se v CD11+ buňkách pocházejících přímo z kostní dřeně neliší od množství nalezeném v CD11+ buňkách získaných ze sleziny (Träger et al., 2015). U monocytů získaných z 36 měsíčních transgenních HD miniprasat nebyly nalezeny žádné významnější změny v produkci zkoumaných cytokinů (IFN α , IFN γ , IL-1 β , IL-4, IL-8, IL-10, TNF α) oproti WT miniprasatům (Valekova et al., 2016).

Mikroglie získané *post-mortem* od pacientů s HD se nachází v aktivním stavu, který koreluje s progresí onemocnění. Tyto buňky byly nalezeny především v oblasti striata a dále pak ve frontálním a parientálním kortexu (Pavese et al., 2006). Stimulované mikroglie získané z transgenních R6/2 myši vykazují identické rozdíly v produkci tohoto IL-6 (Björkqvist et al., 2008). Po 24 hodinách stimulace pomocí IFN γ + LPS byla významně snížena produkce IFN α u mikroglíí získaných z 36 měsíčních transgenních HD miniprasat. Snížená hladina tohoto cytokinu byla zjištěna již po 8 hodinách stimulace. Hladiny IL-1 β a IL-8 byly výrazně zvýšeny u nestimulovaných mikroglíích získaných z TG miniprasat. IL-10 byl po stimulaci zvýšen u WT miniprasat (Valekova et al., 2016).

Makrofágy získané diferenciací monocytů od pacientů s HD produkují vyšší hladiny cytokinů TNF- α a IL-8 ve všech zkoumaných stádiích onemocnění (pre-manifestační; brzké; pokročilé) v porovnání s kontrolami (Träger et al., 2015). Zvýšená hladina IL-6 byla nalezena u stimulovaných makrofágů, které byly získány z myšního transgenního kmene YAC128. Oproti tomu u stimulovaných makrofágů získaných z transgenního myšního modelu YAC18, který exprimuje lidský wild-type huntingtin s 18 CAG repeticemi (Hodgson et al., 1999), nebyly nalezeny změny v produkci IL-6 v porovnání s wild-type jedinci (Björkqvist et al., 2008). Stejně změny v produkci tohoto cytokinu byly po stimulaci nalezeny u makrofágů získaných z YAC128 myši metodou peritoneální laváže (Träger et al., 2015).

Mutovaný protein huntingtin tedy zřejmě způsobuje hyper-aktivaci mikroglíí, monocytů a makrofágů, ke které dochází po stimulaci zánětlivým faktorem (Björkqvist et al., 2008).

V mozkomíšním moku (CSF) HD pacientů byly také nalezeny rozdíly v produkci IL-6, IL-8 a TNF α odpovídající odlišnostem v krevní plasmě. Hladiny těchto cytokinů byly rovněž měřeny u třech myších HD modelů (R6/2, Hdh^{150Q/150Q} a YAC128). Získané výsledky odráží změny u lidských pacientů (Björkqvist et al., 2008). Mezi zánětlivé molekuly patří také protein YKL-40, který je detekovatelný ve vyšších koncentracích v CSF během zánětlivých onemocnění. Tento protein je produkován mikroglíemi a makrofágy (Bonneh-barkay et al., 2008). Ve studii dánských vědců nebyly změny hladin u pacientů s HD u tohoto proteinu zjištěny (Vinther-Jensen et al., 2014), přičemž novější výzkum prokázal vyšší koncentraci YKL-40 v CSF u pacientů trpících HD (Rodrigues et al., 2016).

Imunitní buňky exprimující mutovaný huntingtin (Björkqvist et al., 2008) mají poškozenou migraci. Mikroglie získané z HD myši vykazují poškozenou migraci za chemotaktickými podněty. Porucha migrace mikroglíí byla prokázána u myších modelů exprimujících plnou délku lidského mutovaného HTT; YAC128, který obsahuje 128 CAG repetice (Slow, 2003) a BACHD s 97 glutaminy (Gray et al., 2009). Deficit byl také nalezen u vytvořené buněčné linie mikroglíí (BV2), které expimovala fragmenty mutovaného Htt. Poškození migrace za zánětlivými podněty mají také makrofágy získané z peritonea BACHD a R6/2 myši. Monocyty získané z HD pacientů mají také poškozenou migraci, stejně tak makrofágy, které byly diferencovány z monocytů pomocí růstového faktoru GM-CSF. *In vivo* experiment ukázal sníženou infiltraci monocytů a makrofágů do peritonea u myši s HD. Za poškození migrace je pravděpodobně zodpovědná porucha v remodelaci aktinu, konkrétně snížení hladiny aktin-vazebného proteinu kofilinu (Kwan et al., 2012b), který je nezbytný pro migraci buněk (Dawe et al., 2003). Poškozená migrační schopnost imunitních buněk v důsledku mHtt může vést k neefektivním signalizačním mechanismům, čímž lze vysvětlit zvýšené hladiny pro-zánětlivých cytokinů (Kwan et al., 2012b). Novější studie kmene R6/2 naopak neprokázala migrační deficit makrofágů získaných z peritoneální laváže (Träger et al., 2015).

Makrofágy, *in vitro* diferencované z monocytů, získané od HD pacientů vykazují rovněž po stimulaci LPS vyšší úroveň fagocytózy oproti kontrolám, stejně tak jako peritoneální makrofágy R6/2 myši. Nicméně makrofágy diferencované z buněk kostní dřeně se od kontrolních skupin neliší (Träger et al., 2015).

Cytokiny

IFN α

Cytokiny z této rodiny zabraňují replikaci virů vazbou na receptory napadených buněk, a tím indukují tzv. antivirový stav. Nejvíce jsou IFN α produkovány speciálními plasmacytoidními dendritickými buňkami. Tyto buňky jsou aktivovány nukleovými kyselinami virů. IFN α se také podílí na vzniku horečky, tlumí proliferační vlastnosti buněk a využívají se také při léčbě hepatitidy typu B a C.

IFN γ

IFN γ má rovněž antivirový účinek a stimuluje expresi obou tříd MHC glykoproteinů. Cytokin je produkován Th1 buňkami, cytotoxickými T lymfocyty a NK buňkami. IFN γ způsobuje přeměnu makrofágů do aktivní formy, čímž dochází k likvidaci pohlcených parazitů, kteří jsou jinak schopni přežít ve fagozomech neaktivovaných makrofágů.

IL-1 β

Patří mezi pro-zánětlivé cytokiny a zprostředkovává zánětlivou odpověď. Je produkován aktivovanými makrofágy, monocyty a dendritickými buňkami. Aktivní forma tohoto interleukinu vzniká až po proteolytickém štěpení, pro které je nezbytná funkce inflamasonu.

IL-4

IL-4 patří do skupiny proti-zánětlivých cytokinů a je produkován bazofily a mastocyty. Cytokin se podílí na diferenciaci Th-lymfocytu na Th2 buňku, která sama také produkuje IL-4 a odpovídá na něj. Th2 buňka, způsobí přeměnu B buňky na plasmatickou buňku, která produkuje IgE. Osoby nesoucí mutaci α -podjednotky IL-4 receptoru, která je způsobena záměnou guaninu za adenin, mívají sklony k alergickým onemocněním (Khurana Hershey et al., 1997).

IL-10

IL-10 patří do rodiny proti-zánětlivých cytokinů. Tento cytokin je produkován mnoha imunitními buňkami, včetně monocytů, makrofágů, Treg buňkami, Th2 buňkami a neutrofilny. Zároveň se vyznačuje pleiotrofními účinky, tedy ovlivňuje širokou škálu buněk (Mosser and Zhang, 2009). Primárně působí na epiteliální buňky, udržuje jejich homeostázu, vyvolává obranné mechanismy organismu proti patogenům a podílí se na procesu hojení (Ouyang et al., 2011). Tento cytokin není kontinuálně exprimován ve většině tkání, ale po stimulaci zánětlivým podnětem dochází ke zvýšení jeho produkce (Li et al., 2012). Jeho hlavní funkcí je inhibice vývoje Th1 buněk, čímž potlačuje rozvoj zánětlivé odpovědi, stejnou funkci má také IL-4. Pomocí negativní zpětné vazby dokáže inhibovat vlastní syntézu makrofágy. Indukuje přeměnu nezralých B-lymfocytů na plasmatické buňky a zajišťuje izotypový přesmyk z IgM na IgA. IL-10 a TGFβ inhibují buněčnou odpověď typu Th1 (Bettini and A. Vignali, 2010).

IL-8

IL-8 je cytokin (chemokin), který je tvořen během zánětu. Je součástí vrozené imunitní odpovědi. Jeho hlavním producentem jsou fagocyty. Po zánětlivé stimulaci je taktéž produkován řadou dalších buněk. Klíčová funkce tohoto interleukinu je přilákávání neutrofilních leukocytů do místa zánětu, působí tedy jako tzv. chemoatraktat. IL-8 existuje v několika biologicky aktivních formách (Baggiolini and Clark-lewis, 1992).

TNFα

TNFα je produkován několika typy imunitních buněk, primárně však makrofágy (Olszewski et al., 2007). Tento prozánětlivý cytokin se podílí na řízení vývoje zánětu, na indukci lokální imunitní odpovědi, teploty a případné sepsi.

Modelové organismy

Pro studium neurodegenerativních onemocnění bylo vytvořeno již několik zvířecích modelů. Mezi nejznámější patří myši, krysy, ovce, prasata, opice a primáti. Nejpoužívanějším a nejprozkoumanějším organismem pro studium HD jsou bezesporu myši modely. Tyto malé modelové organismy umožňují studovat základní patologické rysy HD (Zuccato et al., 2010), nicméně vzhledem k jejich tolik rozdílné neuroanatomii od člověka je potřebné využít vhodnější modelový organismus. Nejvhodnější modelem pro studium takového onemocnění se doposud zdá být prase a to jak z fyziologického, morfologického (Swindle et al., 2012), ale také etického hlediska (Lind et al., 2007). Prasata dosahují pohlavní dospělosti již v 5 měsících a dožívají se průměrně 15 let, což poskytuje možnost provádět dlouhodobé studie. Poměrně snadno a rychle se rozmnožují. Doba březosti trvá 114 dní. Mívají až 12 selat ve vrhu.

Prasata jsou ze všech modelových organismů nejbližší člověku. Postavení orgánů v jejich těle odpovídá lidskému organismu. Mají gyrifikovaný povrch mozku stejně jako člověk, oproti myším, jejichž mozková kůra je hladká, bez závitů, tzv. lisencephalon (Hofman, 1985). Prasečí mozek je svým vývojem a anatomií mnohem více podobný lidskému mozku, ve srovnání s používanými menšími savčími modely. Velikost prasečího mozku umožňuje použití neinvazivních zobrazovacích metod, např. PET (pozitronová emisní tomografie), MRI (magnetická rezonance) a elektroencefalografie.

Miniprasata se kvůli svým vlastnostem a podobnosti s člověkem v současné době využívají při mnoha biomedicínských výzkumech a zdá se, že četnost využívání tohoto modelového organismu ještě vzroste. Fyziologická a morfologická podobnost prasečích orgánů s lidskými umožňuje studium xenotransplantací a onemocnění kůže. Výzkum chromozomálních aberací a kmenových buněk patří mezi další oblasti studií využívajících miniprasata (Vodicka et al., 2005). Rovněž pro modelování lidských neurodegenerativních onemocnění se miniprasata zdají být vhodným modelovým organismem (Lind et al., 2007), i přes relativně náročné podmínky ustájení a finanční prostředky.

Model transgenního miniprase pro HD

Pro studium Huntingtonovy choroby bylo vytvořeno transgenní miniprase (TgHD). TgHD miniprasata byla vytvořena v Liběchově na Ústavu živočišné fyziologie a genetiky ve spolupráci s několika mezinárodními laboratořemi. První TgHD miniprase se narodilo v roce 2009. Tato prasata nesou N-terminální část lidského mutovaného huntingtinu, který je pod kontrolou lidského promotoru.

Prasečí a lidský gen pro endogenní huntingtin vykazují až 96% podobnost (GenBank, Accession No. AB016794). Prasečí homolog lidského genu huntingtin má velký ORF (otevřený čtecí rámec - 9417 nukleotidů kódujících 3139 aminokyselin). Prasečí huntingtin je ve všech tkáních exprimován jako dva transkripty o velikosti 11 a 13 kb. Počet CAG repetice se u prasat pohybuje mezi 8 - 14 (Matsuyama et al., 2000). Předpokládaná velikost prasečího huntingtin proteinu je 345 kDa (GenBank, Accession No. AB016793).

Transgeneze proběhla pomocí lentivirového vektoru (HIV1-HD-548aaHTT-145Q), který obsahoval 548 aminokyselin lidského HTT proteinu, v nichž bylo zahrnuto 145 glutaminů (CAG/CAA) (Baxa et al., 2013). Takto upravený vektor byl přenesen do perivitellinního prostoru pronukleárního stádia prasečích embryí. Transfekovaná embrya byla poté laparoskopicky přenesena do vejcovodů náhradních prasnic. V prvním vrhu bylo transgenní jedno z šesti narozených selat. K vytvoření F1 generace bylo nutné zkřížit jediné TgHD prase s jeho WT sourozencem. Postupným křížením vybraných jedinců vznikly další generace.

Metodou PCR (polymerázová řetězová reakce) a FISH (fluorescenční in situ hybridizace) bylo ověřeno začlenění lidského mutovaného HTT genu do dlouhého raménka chromozomu 1 (1q24-q25). Fragmentační analýza PCR amplikonů prokázala, že integrovaný transgen obsahoval 124 CAG/CAA repetice místo původních 145. Zabudování lentivirového insertu do prasečího genomu nepoškodilo kódující sekvence, tudíž patologie tohoto modelového organismu jsou způsobeny právě expresí mHtt (Macakova et al., 2016). Metodou Western blot byla ověřena přítomnost mHtt fragmentů (o velikosti 120 kDa) v kortexu, putamen, kaudate nukleus, hippokampu, hypothalamu, thalamu, mozečku a hřbetní míše. mHtt byl nalezen také v některých periferních tkáních, zejména v tenkém střevu, plicích, játrech, ledvinách, ováriích a kůži (Baxa et al., 2013). Exprese mutovaného proteinu byla rovněž detekována v testes, spermatozoích a semenotvorných kanálcích (Macakova et al., 2016).

V nedávné době byly zaváděny nové metody pro behaviorální testování F0, F1, F2 generace, které prozatím neprokázaly žádné signifikantní rozdíly mezi TG a WT jedinci. Transgenní zvířata dospívají ve stejném věku jako jejich WT sourozenci.

Byla prokázána snížená schopnost reprodukce TgHD kanců u F1 generace. Spermatogeneze byla testována u 13 - 26 měsíčních TgHD a WT kanců. U transgenních zvířat docházelo k postupnému snižování počtu spermií v ejakulátu s přibývajícím stářím. Metodou *in vitro* fertilizace (IVF) byla zjištěna snížená schopnost spermií TgHD kanců proniknout do oocytů získaných od WT samic, na rozdíl od spermií WT jedinců. Po odstranění zona pellucida (glykoproteinový obal oocytu) byla schopnost penetrace spermií od TgHD a WT kanců totožná. Přítomnost mutovaného HD genu zřejmě poškozuje schopnost proniknutí spermií přes zona pellucida, avšak nemá vliv na splynutí spermie s cytoplasmatickou membránou oocytu (Baxa et al., 2013). U jedinců z F1 (24 - 36) a F2 (12 - 36) generace bylo od 13 měsíce věku pozorovatelné snížené množství spermií v ejakulátu. Stejně jako v předchozí studii počet spermií s přibývajícím věkem zkoumaných transgenních miniprasat klesal. Rovněž byly zjištěny změny morfologie spermií, schopnost penetrace a snížení jejich pohyblivosti. Souběžně dochází k celkové degeneraci spermatogenních buněk (Macakova et al., 2016).

Protein DARPP-32 je exprimován středně velkými ostnitými neurony (medium-size spiny neurons) nacházejícími se ve striatu (Walaas and Greengard, 1984). U TgHD miniprasat byla v oblasti kaudate nukleus a putamen nalezena snížená hladina tohoto proteinu již v 16 měsících (Baxa et al., 2013). Snížená koncentrace tohoto proteinu byla nalezena i u dalších modelů HD, dokonce již v presymptomatickém stádiu (Bibb et al., 2000). DARPP-32 lze tedy označit jako marker neurodegenerace.

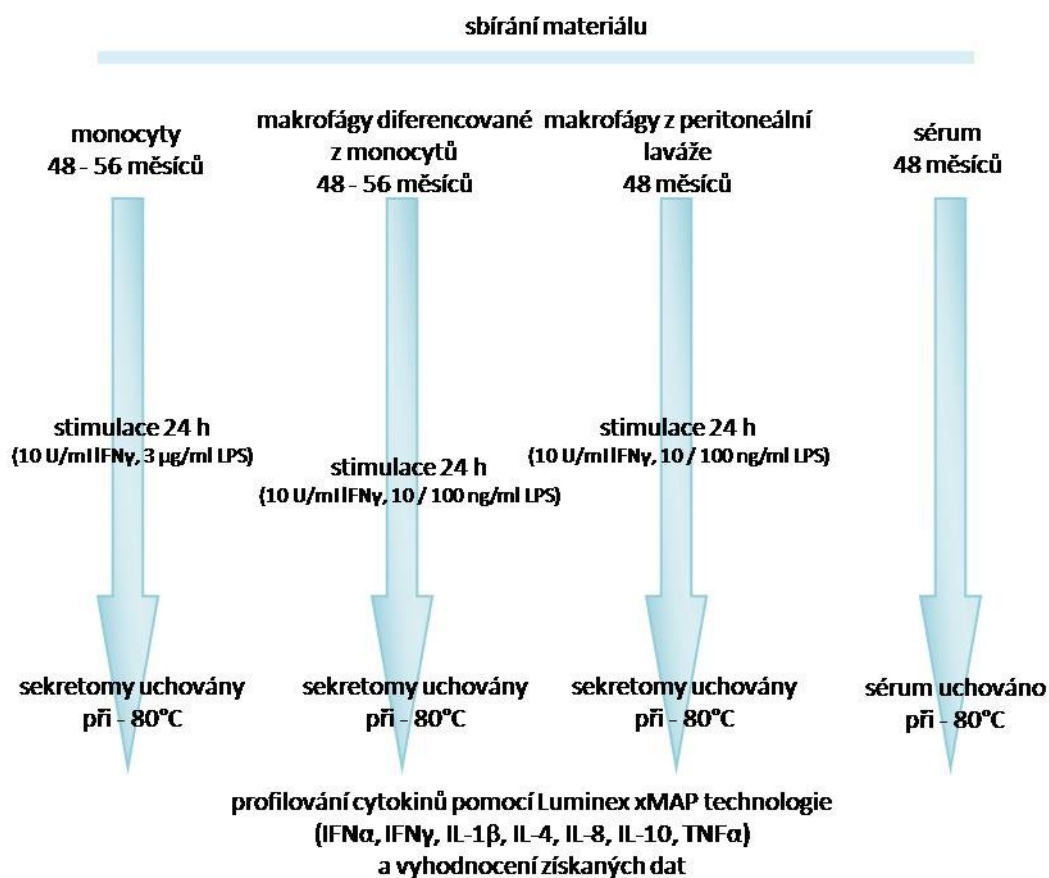
Imunitní systém transgenních HD miniprasat je rovněž ovlivněn přítomností mutovaného HTT. Přítomnost mutované formy tohoto proteinu pravděpodobně způsobuje paralelní aktivaci zánětlivých procesů v CNS a periférii. Mikroglie získané z mozků transgenních zvířat jsou rovněž hyper-responsivní na externí stimuly (IFN γ + LPS). V sekretomu mikroglíí a CSF 36 měsíčních TG miniprasat byla nalezena snížená produkce IFN α a IL-10. Naopak v sekretomu těchto buněk byla detekována zvýšená hladina IL-8 a IL-1 β . Zvýšená hladina IL-8 byla rovněž zjištěna i v séru (Valekova et al., 2016). Zřejmě tedy i periferní systém TgHD miniprasat je zapojen do patologie onemocnění.

METODIKA

Modelovým organismem bylo transgenní miniprase s vloženou N-terminální sekvencí lidského mutovaného huntingtinu obsahující 124Q pod kontrolou lidského promotoru (Baxa et al., 2013).

Byla použita transgenní prasata stará 48 - 56 měsíců a jejich stejně staří wild-type sourozenci (viz Tabulka č. 2). Všechna miniprasata použitá v této práci mají stejné podmínky chovu. Porovnávání jedinci jsou buď sourozenci, nebo jsou párování podle stáří a mají stejné genetické pozadí. V tomto věku miniprasat odpovídají brzkému presymptomatickému stádiu Huntingtonovy choroby u člověka.

Periferní krevní mononukleární buňky (BPMCs) byly izolovány z krve miniprasat, která byla odebírána z krční tepny. Zvířata měla před odběry hladovku. Zralé makrofágy byly získány *post mortem* peritoneální laváží, tzn. výplachem břišní dutiny.



Obrázek č. 3 - Ilustrace metodických postupů. Plán práce.

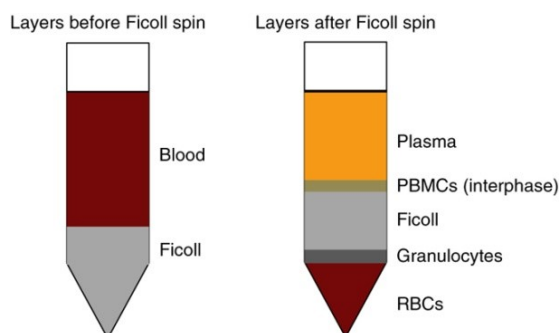
		Stáří v době odběru (měsíce)	
	TG/WT	1. odběr	2. odběr
Miniprasata použitá pro získání monocytů			
K150	TG	49,2	55,9
K151	WT	49,2	55,9
K223	TG	52,7	55,7
K226	WT	52,7	55,7
K351	TG	50,8	53,8
K353	WT	50,8	53,8
Miniprasata použitá pro získání makrofágů diferencovaných z monocytů			
K150	TG	50,8	56,6
K151	WT	50,8	56,6
K152	TG	51,9	55,2
K155	WT	51,9	55,2
K156	TG	51,9	55,2
K153	WT	56,6	
Miniprasata použitá pro získání peritoneálních makrofágů			
K207	WT		48
K208	WT		48
K209	TG		48
K162	TG		49
Miniprasata použitá pro získání séra			
K207	WT		48
K208	WT		48
K209	TG		48
K162	TG		48
K14	WT		48
K101	TG		48
K99	WT		48
K102	TG		48
K97	WT		48
K154	WT		48
L38	TG		48
L39	TG		48

Tabulka č. 2 - Přehled miniprasat použitých v této diplomové práci.

Monocyty

Izolace BPMCs

Monocyty byly získány z periferní krve TgHD a WT miniprasat. Plná krev (cca 10 ml) byla odebrána do injekční stříkačky s Heparinem, čímž se předešlo jejímu sražení. Takto získaná krev byla naředěna 1:2 v PBS (2x 5 ml krve +10 ml PBS - Phosphate Buffer Saline). Následně byla krev opatrně navrstvena na separační roztok (Ficoll-Paque Plus 1077, GE Healthcare) a centrifugována (400g, 30 min, 20°C), čímž došlo k separaci krevních buněk podle hustotního gradientu.



Obrázek č. 4 - Separace krevních buněk na základě hustotního gradientu (převzato <https://www.nature.com/nprot/journal/v9/n7/pdf/nprot.2014.104.pdf>).

Vrstva mononukleárních buněk nacházející se na rozhraní Ficoll a krevní plasmy byla pomocí pipety opatrně přenesena do nové zkumavky s roztokem PBS a centrifugována (300g, 5 min, 20°C). Po odsání supernatantu byla peleta resuspendována v roztoku PBS a znovu centrifugována (200g, 12 min, 20°C), čímž došlo k odstranění trombocytů. Poté byl supernatant znovu odsán a peleta resuspendována v 1 ml PBS s 0,5% BSA (Bovine Serum Albumin). Buněčným analyzátozem (Vi-CELL®), který pracuje na principu barvení trypanovou modří, byly buňky spočítány a byla určena jejich životnost.

Izolace monocytů metodou MACS

Magnetická separace (MACS = magnetic cell separation) je metoda založená na vazbě buněk a magnetických mikrokuliček, které na sobě mají navázanou protilátku. Pomocí magnetu lze poté pozitivní selekcí vyizolovat žádanou populaci buněk. Na základě celkového počtu

PBMCs byly buňky označeny anti-CD14 mikrokuličkami (CD14 MicroBeads, Miltenyi Biotec), o koncentraci 20 μ l mikrokuliček na 2×10^7 buněk a inkubovány (15 min, 4°C). Metodou MACS byly získány CD14⁺ monocyty. Povrchový marker CD14 je charakteristický pro monocyty/makrofágy.

Kultivace a stimulace monocytů

Vyizolované CD14⁺ buňky byly vysazeny do 24 jamkové destičky (hustota $0,5 \times 10^6$ buněk / jamka) a kultivovány v 0,5 ml RPMI-1640 médiu (Sigma-Aldrich) s přidaným 5% FBS, 2 mM L-glutamínem a 0,1% gentamycinem. CD14⁺ monocyty byly po 16-ti hodinách kultivace stimulovány IFN γ (10 U/ml, Sigma-Aldrich) a LPS (3 μ g/ml, Sigma-Aldrich) po dobu 24h. Následující den byla zjištěna životnost buněk pomocí PI (propidium jodid, ředění 1:1000) a inverzního fluorescenčního mikroskopu (IX 70, Olympus). Supernatant byl zmražen (-80°C) a uchován k dalšímu použití.

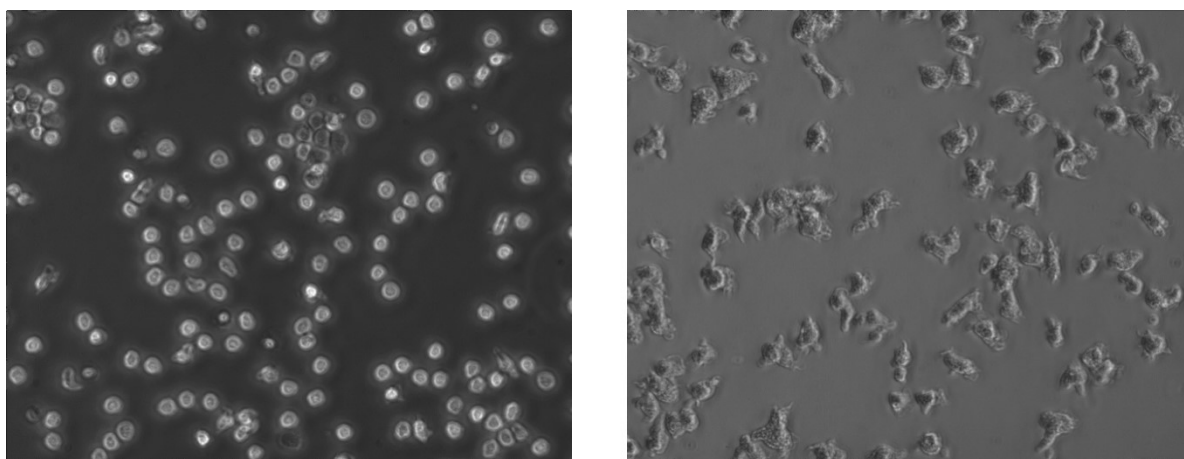
Makrofágy z diferenciováných monocytů

Izolace a kultivace monocytů

Z plné krve byly získány CD14⁺ buňky (monocyty) pomocí gradientové centrifugace a následné magnetické separace (viz *Izolace monocytů metodou MACS*). Buňky byly vysazeny do 24-ti jamkové destičky o hustotě $0,5 \times 10^6$ buněk na jamku a kultivovány v RPMI-1640 médiu 10% FBS, 2mM L-glutamínem, 0,1% gentamycinem. Do média byl přidán také rekombinantní prasečí růstový faktor GM-CSF (20 ng/ml), který indukoval diferenciaci monocytů do makrofágů. Čtvrtý den po vysazení bylo vyměněno kultivační médium za nové.

Diferenciace a stimulace monocytů/makrofágů

Po dobu šesti dní probíhala diferenciaci monocytů v makrofágy. Šestý den buňky již vykazovaly fenotyp plně diferencovaných buněk - makrofágů (viz Obrázek č. 5). Bylo vyměněno kultivační médium, v němž byla snížena koncentrace přidávaného FBS (1%) a také GM-CSF (0,2 ng/ml). Buňky byly stimulovány IFN γ (10 U/ml) a LPS o různé koncentraci (10; 100 ng/ml) po dobu 24-ti hodin. Následující den byl posbírán a centrifugován supernatant (1000g, 5 min, 4°C), který byl poté hluboce zamrazen (-80°C) a uchován k dalšímu použití. Životnost buněk byla zjišťována pomocí PI (ředění 1:1000).



Obrázek č. 5 - Diferenciace monocytů do makrofágů. Na levém obrázku - vysazené monocyty, na pravém - již diferencované makrofágy. Přeměna buněk trvala 6 dní (zvětšení 20x; IX 70, Olympus).

Makrofágy izolované z peritoneální laváže

Laváž peritonea a izolace PEC

Zralé makrofágy byly získány peritoneální laváží z usmrcených miniprasat. Propláchnutí břišní dutiny bylo provedeno pomocí PBS. Peritoneální tekutina obsahující PEC (peritoneal exudate cells - buňky z břišní dutiny) byla odebrána do 50ml zkumavky a byly odpipetovány velké kusy tuku. Poté byla tekutina přefiltrována přes 100 μ m filtr a následně centrifugována (400g, 10min, 4°C) a byl odsán supernatant. Pro odstranění erytrocytů byla peleta buněk resuspendována v lyzačním roztoku (EXCELLYSE Easy, Exbio) a inkubována (5 min, RT). Poté bylo přidáno PBS a buněčná suspenze byla centrifugována (400g, 10 min, RT). Zbylá peleta buněk, která obsahovala makrofágy a neutrofilů, byla resuspendována v kultivačním médiu (Kapetanovic and Fairbairn, 2009). Pomocí buněčného analyzátoru Vi-CELL® byl zjištěn počet a také životnost buněk.

Izolace makrofágů

Pro izolaci mini-prasečích makrofágů bylo potřeba zavést protokol, který byl následně optimalizován. Byla testována metoda magnetické separace a test adherence. Pro izolaci makrofágů byl nakonec použit test adherence.

MACS

Suspenze PEC byla centrifugována (300g, 10 min, 4°C), poté byl odsán supernatant. Peleta buněk byla resuspendována s primární protilátkou CD172a (10 μ l Ab/10⁷ buněk; inkubace 30 min, 4°C). Buňky byly následně 2x promyty 0,5% BSA a centrifugovány (300g, 10 min, 4°C), byl odsán supernatant. Buněčná peleta byla resuspendována v 0,5% BSA a byly přidány Anti-Mouse IgG1 mikrokuličky (inkubace 15 min, 4°C). Poté byly buňky promyty, opět centrifugovány (300g, 10 min, 4°C), byl odsán supernatant a peleta buněk byla resuspendována v 0,5% BSA. Na základě markeru prasečích makrofágů (CD172a) byla provedena magnetická separace. Buňky vyizolované MACS (CD172a+) byly následně měřeny na průtokovém cytometru. Zároveň byla měřena populace buněk, u které nebyla provedena magnetické separace (viz Obrázek č. 16). Touto metodou byla získána 96% populace CD172a+ makrofágů.

Test adherence

Test adherence byl prováděn v 24-ti jamkové destičce. Do každé jamky byly vysazeny buňky o stejné hustotě (2×10^6 buněk/1 ml kultivačního média), vše v duplikátech. Buněčná suspenze byla 2 hodiny inkubována v termostatu (37°C). Poté byly odmyty nepřisedlé buňky - neutrofilily a k adherovaným buňkám bylo přidáno kultivační médium.

Suspenze neadherentních buněk byla centrifugována (400g, 10 min, 4°C) a peleta byla následně resuspendována v PBS. Suspenze takto získaných neadherentních buněk byla vyhodnocena pomocí průtokové cytometrie. Byl určen procentuální poměr adherentní a neadherentní frakce buněk, které byly získané z peritoneální laváže.

Stimulace makrofágů

Po 24 hodinách kultivace byly buňky stimulovány IFN γ (10 U/ml) a LPS o různé koncentraci (10; 100 ng/ml). Po dalších 24 hodinách byl sebrán supernatant a zmražen (-80°C) k dalšímu využití.

Krevní sérum

Odebraná plná krev se nechala při pokojové teplotě srážet 1 hodinu. Po 10 min byl odtrhnut krevní koláč. Tekutina byla centrifugována (1500g, 10 min, 4°C). Supernatant byl přenesen do nové zkumavky a opět centrifugován (1500g, 10 min, 4°C), čímž došlo k odstranění zbylých krevních buněk. Sérum bylo odebráno do čisté zkumavky a následně zmraženo na -80°C.

Určení životnosti buněk

Životnost byla ověřena PI (ředění 1:1000), který byl k buňkám přidán. Poté byly buňky vizualizované pod fluorescenčním mikroskopem (IX 70, Olympus). Pořízené fotografie byly následně vyhodnoceny programem ImageJ a bylo zjištěno procentuální zastoupení živých a neživých buněk.

Charakterizace buněk

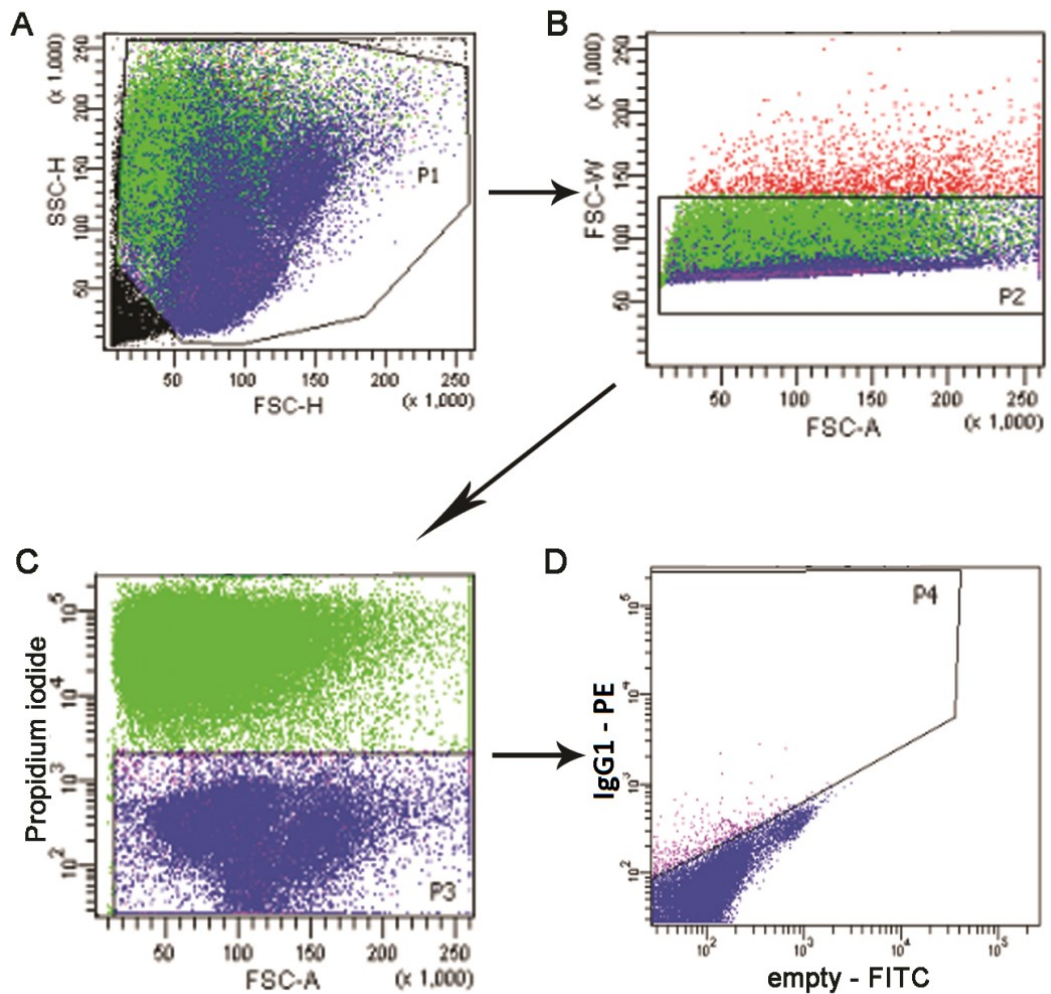
Buňky byly charakterizovány pomocí průtokového cytometru FACS ARIAII (Becton Dickinson, San Jose, CA). Na základě přítomnosti povrchových markerů byl ověřen buněčný typ a čistota buněk. Pro charakterizaci buněk pomocí průtokové cytometrie byla připravena suspenze buněk v roztoku 10% Pig serum + PBS (10^6 buněk/100 μ l PBS). Detektory průtokového cytometru snímají přímý rozptyl (FSC), který je přímo úměrný velikosti buňky, boční rozptyl (SSC) vyjadřující komplexitu, resp. granularitu buněk a fluorescenci.

Buňky byly centrifugovány (400g, 3 min, RT) a poté byl odsán supernatant. K peletě buněk byl přidán roztok PBS s 10% Pig serum a buňky byly blokovány 15 minut. Následně buňky byly označeny primární protilátkou v 96-ti jamkové destičce. Ke každé protilátce byla připravena izotopová kontrola a vzorky byly inkubovány v tmě (30 min, 4°C). Vzorky byly dvakrát promyty v 1% Pig serum + PBS. K promytým vzorkům s nekonjugovanou primární protilátkou byla následně přidána sekundární protilátka a takto připravené vzorky byly ve tmě inkubovány (30 min, 4°C). Poté byla destička se vzorky znovu dvakrát promyta 1% Pig serum + PBS. Rovněž byl připraven propidium jodid (ředění 1:1000) kvůli stanovení životnosti.

Následně byly vzorky měřeny na průtokovém cytometru v programu BD FACSDIVA a data byla analyzována za použití softwaru FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, OR). Pomocí tzv. gating strategy byla postupně vybrána námi požadovaná populace buněk.

Gating strategy

Tube: IgG1 (PE)			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	100,000	###	100.0
P1	93,172	93.2	93.2
P2	91,524	98.2	91.5
P3	41,570	45.4	41.6
P4	423	1.0	0.4



Obrázek č. 6 - Gating strategy - příklad strategie „gatování“ na IgG

A - „gate“ P1 označuje hlavní populaci buněk

B - P2 - odstranění dubletů (dublety - červená populace)

C - P3 - odstranění mrtvých buněk pomocí propidium jodidu

D - P4 - daná populace buněk našeho zájmu

	Izotyp	Ředění	Firma	
<i>CD14 MicroBeads, human</i>	mouse, IgG2a	20μl/10 ⁷ bb	Miltenyi Biotec	MACS
<i>CD14</i>	mouse, IgG2a	1:20	Santa Cruz Biotechnology	mAb
<i>CD172a (SWC3)</i>	mouse, IgG1	1:100	AbD Serotec	mAb
<i>CD11b (Mac-1)</i>	mouse IgG1, κ	1:20	BD Pharmingen™	mAb
<i>CD3 (PE/Cy5)</i>	mouse, IgG1	1:50	abcam	mAb
<i>CD163-FITC</i>	mouse, IgG1	1:10	AbD Serotec	mAb
<i>CD45-FITC</i>	mouse, IgG1	1:20	AbD Serotec	mAb
<i>IgG2a</i>	mouse, IgG2a	1:10	AbD Serotec	neg. Ctrl
<i>IgG1</i>	mouse, IgG1	1:10	AbD Serotec	neg. Ctrl
<i>IgG1-PE/Cy5</i>	mouse, IgG1	1:10	Abcam	neg. Ctrl
<i>IgG1-FITC</i>	mouse, IgG1	1:10	AbD Serotec	neg. Ctrl
<i>Goat Anti-Mouse IgG1 (RPE)</i>		1:500	SouthernBiotech	sek. Ab
<i>Goat Anti-Mouse IgG2a (RPE)</i>		1:500	SouthernBiotech	sek. Ab

Tabulka č. 3 - Přehled protilátek použitých k charakterizaci buněk. MACS - magnetická separace buněk; mAb - monoklonální protilátka; neg. Ctrl - negativní kontrola; sek. AB - sekundární protilátka

Western blotting

Metoda Western blotting byla použita pro imunodetekci endogenního a mutovaného proteinu huntingtinu (EPR5526), a tubulinu v CD14+ monocytech.

Lýze buněk

Peleta buněk byla resuspendována v lyzačním pufru (RIPA pufr -Radio Immuno Precipitation Assay buffer -150 mMNaCl, 1% NP-40, 0,5% deoxycholát, 0,1% SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 8) doplněným o inhibitory proteáz a fosfatáz. Vzorky byly lyzovány (30 min, 4°C), sonikovány (10 min) a poté centrifugovány (10 000g, 15 min, 4°C).

Měření koncentrace proteinů

Následně byla v každém vzorku měřena koncentrace proteinů pomocí kitu (Pierce BCA Protein Assay Kit 660 nM, Thermo Fisher). Vzorky byly měřeny v 96-ti jamkové destičce. Nejdříve byl napipetován Blank, poté kalibrační řada a vzorky, které byly v duplikátech. Poté byla destička se vzorky vložena do spektrofotometru a pomocí programu Gen5 2.09 (Synergy/HTX, BioTec) byla změřena absorbance proteinů. Data byla vyexportována do programu Excel a byla vypočítána koncentrace proteinů v každém vzorku.

Elektroforéza

Poté byly připraveny vzorky na elektroforézu. Do každé zkumavky bylo napipetováno stanovené množství vzorku, 4 μ l loadingu, 2 μ l redukce a vše bylo doplněno do 25 μ l RIPA purfem. Takto připravené vzorky byly zahřáty (5 min, 95°C). Mezitím byla připravena elektroforéza (xCell Surelock, Invitrogen). Bylo připraveno 800 ml running pufru (40 ml Tris-acetate SDS Running bufr doplněno chlazenou destilovanou vodou), ke kterému bylo přidáno 500 μ l antioxidantu (NuPAGE® Antioxidant, Invitrogen). Byly použity 4-12% prefabrikované polyakrylamidové gradientové gely (NuPAGE® Bis-Tris gels, Invitrogen). Po zahřátí byly vzorky nanесeny spolu s markerem (HiMark, BioRad) na gel a byla spuštěna elektroforéza (1,5 h, 150 V). Po dokončení elektroforézy byl gel 10 minut inkubován v 10% roztoku TOWBINu (BioRad).

Western blotting - iblot

Následně byl gel opláchnut v ultračisté vodě a podle návodu byl sestaven tzv. blotovací sendvič (iBlot Gel Transfer Stacks Nitrocellulose, Mini, Life Technologies). Gel byl následně přiložen na nitrocelulózovou membránu a pomocí blotovacího zařízení (iBlot, Invitrogen) došlo působením elektrického proudu (250 mA) k přenosu proteinů z gelu na povrch membrány. Membrána byla poté 1 hodinu blokována v 5% roztoku mléka.

Imunoznačení

Poté byla membrána označena primární protilátkou (huntingtin - EPR5526, 1:3000; β -tubulin, 1:10000) a přes noc inkubována při 4°C. Následující den byla membrána 3x promyta v TTBS (NaCl, Tween, Tris pH = 7,6, destilovaná voda) a inkubována 1 hodinu v sekundární protilátce (anti-rabbit, anti-mouse, 1:10 000).

	Izotyp	Ředění	Firma	
<i>EPR5526</i>	IgG	1:3000	Abcam	mAB
<i>β-tubulin</i>	IgG1	1:10000	Sigma-Aldrich	mAB
<i>Anti-mouse</i>		1:10000	Jackson ImmunoResearch	Sek. AB
<i>Anti-rabbit</i>		1:10000	Jackson ImmunoResearch	Sek. AB

Tabulka č. 4 - Přehled protilátek použitých na imunoznačení. **mAb** - monoklonální protilátka; **sek. AB** - sekundární protilátka

Vyvolání

Poté byla membrána opět promyta v TTBS a po dobu 5 minut inkubována v roztoku ECL (ECL Prime Western Blotting Detection Reagent RPN 2232, GE Healthcare). Marker byl na membráně označen pomocí speciálního pera (Western Sure Pen, LI-COR). Následně byla membrána vyvolána za použití přístroje Bio-Rad (Hercules, CA).

Přeznačení

Membrána byla stripována peroxidem vodíku (30 min, RT), aby mohla být přeznačena jinou primární protilátkou. Membrána byla promyta v roztoku TTBS (5 min, RT), umístěna do zkumavky s H₂O₂ a inkubována na rolleru (30 min, RT). Následně byla membrána 3x promyta v TTBS a po dobu jedné hodiny blokována v 5% roztoku mléka. Poté byla membrána označena jinou primární protilátkou a inkubována na rolleru (12 h, 4°C).

Luminex xMAP®

Přítomnost cytokinů byla detekována přístrojem Luminex 200 se softwarem xPONENT 3.1.871.0 (Luminex Corp., Austin, TX), který kombinuje principy ELISA a průtokové cytometrie. Pro kvantifikaci cytokinů byl použit 5-parametrový logistický regresní algoritmus.

Pro kvantitativní stanovení koncentrace cytokinů byl použit kit Swine Cytokine Magnetic 7-Plex Panel (Invitrogen TMLSC0001M, Thermo Fisher Scientific Inc.), který umožňuje simultánní detekci 7 cytokinů (IFN α , IFN γ , IL-1 β , IL-4, IL-8, IL-10, TNF- α) v jednom vzorku. Hladina cytokinů byla měřena v séru a v sekretu (= kondiciované médium) monocytů/makrofágů. Jako metodický postup byl použit již vytvořený protokol (Valekova et al., 2014)

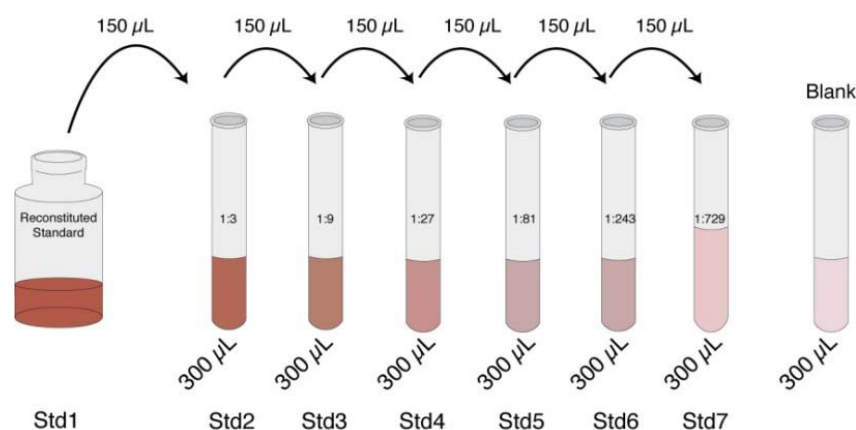
Složení kitu:

- Swine Cytokine Magnetic 7-Plex Antibody Bead Concentrate (10x)
- Swine Cytokine Magnetic 7-Plex Biotinylated Antibody Concentrate (10x)
- Swine Cytokine 7-Plex Standard
- Wash Solution Concentrate (20x)
- Assay Diluent
- Biotin Diluent
- Streptavidin RPE Concentrate (10x)
- Streptavidin RPE Diluent
- 96-well Flat Bottom Plate

Příprava vzorků a kalibrační řady

Reagencie byly před použitím zahřáté na RT. Vzorky byly rozmrazeny na ledu a krátce zvortexovány, sonikovány a nakonec centrifugovány (20 000g, 10 min, 4°C), čímž byla odstraněna případná debris. Kvůli zajištění identického pozadí a minimalizaci efektu matrice by měl být poměr diluentu, ve všech vzorcích, kalibračních standardech a kontrolách, stejný. Vzorky byly naředěny, aby jejich MFI (medián intenzity fluorescence) nepřesahoval kalibrační křivku, a tím byla umožněna jejich detekce a také kvůli odstranění vysoce abundantních proteinů.

Vzorky a standardy byly připraveny v duplikátech. Standardní křivka byla připravena postupným ředěním 1:2 (STD1 - STD5) a 1:1 (STD6 - STD9). Místo sedmi bodů, dle protokolu, byla připravena standardní křivka o devíti bodech, čímž byla získána vyšší přesnost detekce nízkých hodnot. Standardy použité pro sérum byly naředěny pomocí Assay Diluent (AD). Standardy pro sekretomy tkáňových kultur byly naředěny mixem AD (50 %) a kultivačního média (50 %).



Obrázek č. 7 - Příklad postupu vytvoření kalibrační křivky. Námí vytvořená ředící řada byla modifikována (převzato - *protokol Swine Cytokine Magnetic 7-Plex Panel; novex - life technologies*).

Dále byl připraven promývací roztok (1x WB) z Wash Solution Concentrate (20x), který byl naředěn deionizovanou vodou v poměru 1:19.

Magnetické kuličky (Antibody Bead Concentrate (10x)) byly před použitím krátce vortexovány a sonikovány. Následně byly naředěny (1:10) promývacím roztokem (1x Wash Solution).

Vzorky buněčných kultur

Vzorky sekretomu monocytů/makrofágů byly nejprve naředěny (1:1) v čistém kultivačním médiu. Takto naředěné vzorky byly naneseny na destičku, kde byly znovu ředěny (1:1) pomocí Assay Diluent (AD). Vzorky pro buněčné kultury byly tedy ředěny celkem 4x. Jako pozadí bylo použito čisté kultivační médium a AD.

Vzorky séra

Vzorky séra byly ředěny (1:1) za použití čistého kultivačního média. Jako pozadí byl použit AD a WB.

Veškeré vzorky byly v příslušném ředění nanесeny do 96-ti jamkové destičky (Flat Bottom Plate), která byla překryta folií a umístěna na třepačku (2 hod, RT) a poté 2x promyta promývacím roztokem za použití magnetické destičky.

Příprava detekční protilátky a inkubace

Detekční protilátka (Biotinylated Antibody Concentrate (10x)) byla naředěna (1:10) pomocí Biotin Diluent a přidána do každé jamky. Destička byla následně na třepačce inkubována (1 hod, RT). Poté byla destička 2x promyta promývacím roztokem, opět za použití magnetické destičky.

Příprava Streptavidinu RPE a inkubace

Streptavidin (Streptavidin RPE Concentrate (10x)) byl zředěn (1:10) Streptavidin RPE Diluent a napipetován do všech jamek. Destička byla poté umístěna na třepačku (0,5 hod, RT). Následně byla destička, za použití magnetické destičky, 3x promyta promývacím pufrem.

Získání dat a analýza

Do každé jamky bylo přidáno 150 μ l promývacího roztoku a destička byla umístěna na třepačku (3 min, RT). Poté byla destička se vzorky vložena do přístroje Luminex 2000 se zabudovaným softwarem xPONENT. Na základě kalibrační křivky a mediánu intenzity fluorescence (MFI) byla určena koncentrace cytokinů. Získaná data (MFI) byla analyzována a statisticky vyhodnocena ve spolupráci s Thermo Fisher Scientific, USA. Data byla vyhodnocena v programu GraphPad Prism 6 a zobrazena jako dotplot. P-hodnota udává hladinu významnosti ($P < 0,1$).

Pro statistické vyhodnocení byly použity následující testy:

Monocyty

- Kolmogorovův-Smirnovův test následovaný ANOVA - Bonferroniho mnohočetným srovnávacím testem

Makrofágy diferencované z monocytů

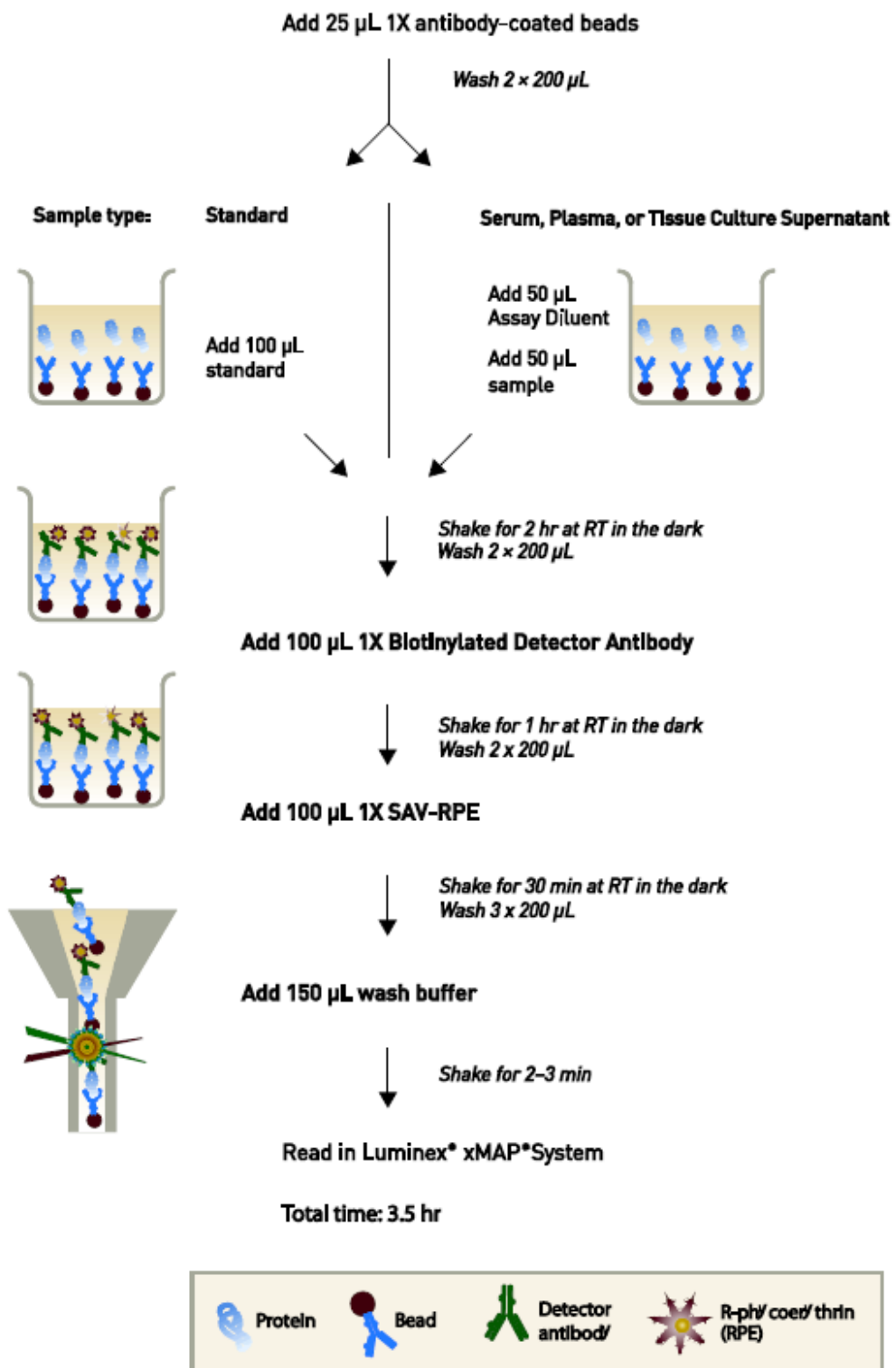
- Kolmogorovův-Smirnovův test následovaný ANOVA - Bonferroniho mnohočetným srovnávacím testem (IL-10, IL-4)
- Kolmogorovův-Smirnovův test následovaný Kruskal-Wallis testem - Dunnův mnohočetný srovnávací test (IL-1 β , IFN α , TNF α)

Makrofágy získané z peritonea

- ANOVA - Bonferroniho mnohočetný srovnávací test

Sérum

- Kolmogorovův-Smirnovův test následovaný Mann-Whitney testem nebo nepárovým t-testem



Obrázek č. 8 - Znáornění metodického postupu kvantitativní detekce cytokinů (převzato - *protokol Swine Cytokine Magnetic 7-Plex Panel; novex - life technologies*).

VÝSLEDKY

Charakterizace imunitních buněk

Imunitní buňky byly získány z plné krve a peritoneální laváže. Z plné krve byly vyizolovány CD14⁺ monocyty, dále pak CD14⁺ monocyty, které byly následně diferencovány do makrofágů. Z peritoneální laváže byly získány makrofágy. Získané imunitní buňky byly charakterizovány pomocí průtokové cytometrie a daných protilátek (viz Metodika).

Charakterizace PBMCs

Vyizolované PBMCs z plné krve byly charakterizovány pomocí monoklonálních protilátek CD45, CD172a, CD14 a CD163. Bylo zjištěno procentuální zastoupení PBMCs.

Markery:

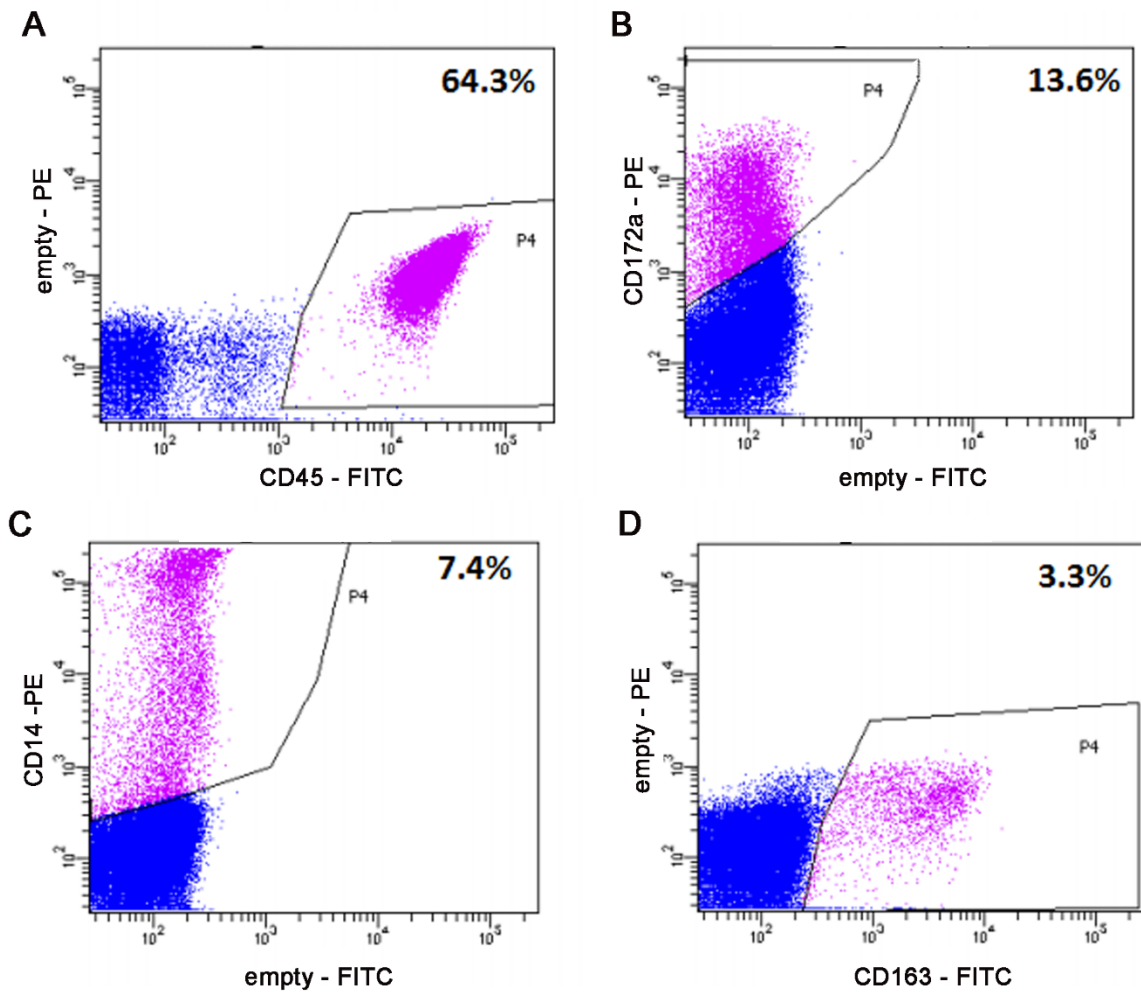
CD45 - marker leukocytů (lymfocyty + monocyty)

CD172a - marker monocytů i makrofágů

CD14 - marker nezralých monocytů

CD163 - marker zrajících a zralých monocytů (=> makrofágů)

Monoklonální protilátka CD14 se specificky váže na povrchový marker nezralých monocytů, kdežto CD163 je charakteristický marker scavengerových membránových receptorů na maturovaných tkáňových makrofázích (Fabriek et al., 2005). Povrchový receptor CD172a patří do skupiny signálních regulačních proteinů a je asociovaný s protein-tyrosin fosfatázou SHP-1 (Bullido et al., 2000). CD172a je charakteristický pro monocyty/makrofágy a granulocyty (Piriou-Guzylack and Salmon, 2008).



Obrázek č. 9 - Charakterizace miniprasečích PBMCs pomocí FACS

A - V populaci buněk bylo 64,3 % leukocytů

B - Monocyty a makrofágy tvořily 13,6 % buněčné populace

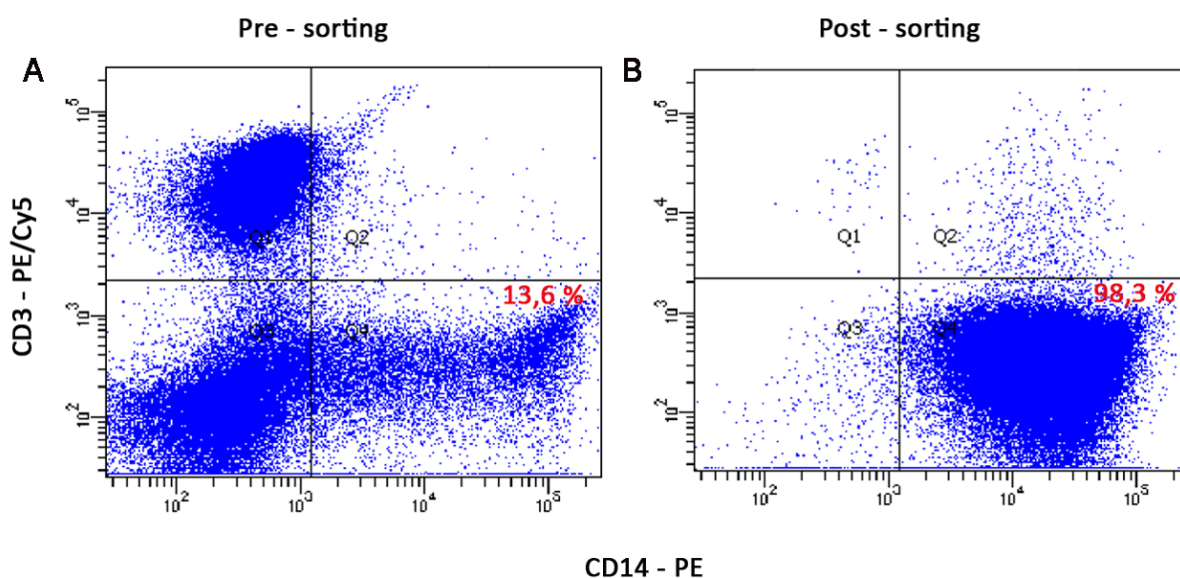
C - Nezralých a zrajících monocytů bylo v buněčné populaci 7,4 %

D - Populace zrajících a zralých monocytů tvořila 3,3 %

Po sečtení populace nezralých monocytů (7,4 %) a zrajících-zralých monocytů (3,3 %) získáme 10,7% populaci monocytů, což odpovídá poměrnému zastoupení monocytů v krvi, které je zpravidla 5-10 %. Tomu také odpovídá CD172a+ populace monocytů a makrofágů, která tvoří 13,6 % z celkového počtu buněk.

Čistota monocytů

Populace CD14⁺ monocytů získaná z plné krve tvořila přibližně 13% z celkového počtu buněk. Provedením magnetické separace (MASC) bylo dosaženo 98% čistoty populace CD14⁺ monocytů (tzn. necelé 2% buněk nebyly CD14⁺ monocyty). Byly použity monoklonální protilátky CD3 (marker T-lymfocytů) a CD14 (marker monocytů/makrofágů). Pro určení CD3⁺ buněk byla použita konjugovaná monoklonální protilátka CD3-PE/Cy5. Populace CD14⁺ buněk byla zjištěna monoklonální protilátkou CD14.



Obrázek č. 10 - Čistota monocytů - dvojitě barvení (CD14; CD3). A - před sortováním 13,6 % CD14⁺; B - po sortování MACS 98,3 % CD14⁺

CD14⁺ buňky byly následně kultivovány a stimulovány. Pomocí průtokové cytometrie bylo ověřeno, že metodou magnetické separace byla získána téměř čistá populace CD14⁺ monocytů (98,3 %).

Životnost monocytů

Životnost byla zjišťována u buněk získaných od transgenních i wild-type jedinců a také u stimulovaných i nestimulovaných buněk.

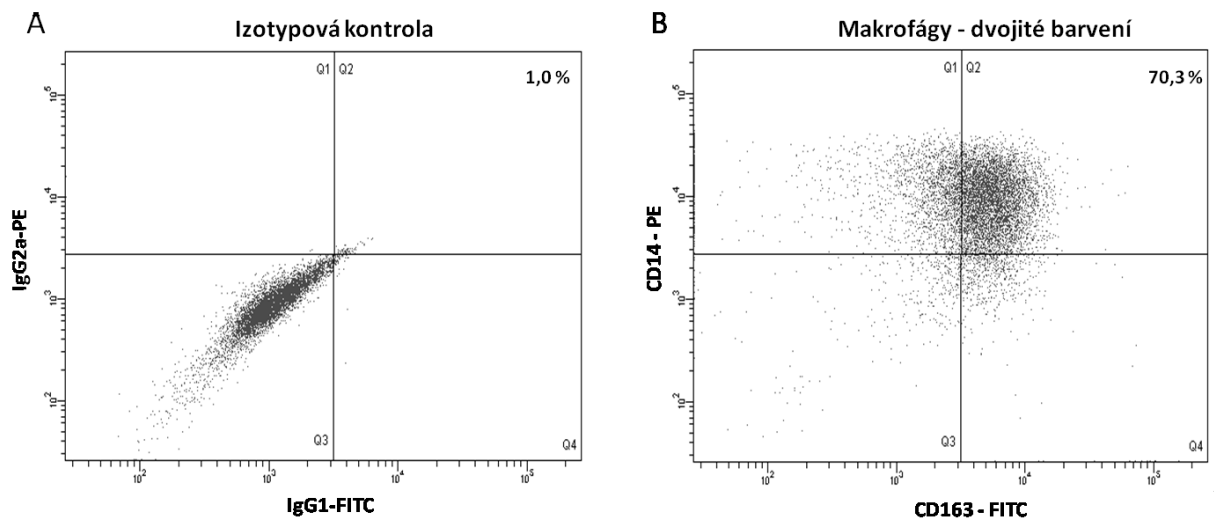
Životnost	Živé (%)	Neživé (%)
TG NS	78,92	21,08
TG ST	85,10	14,90
WT NS	83,17	16,83
WT ST	79,87	20,13

Tabulka č. 5 - Životnost monocytů - Propidium jodid. TG NS - nestimulovaný transgen; TG ST - stimulovaný transgen; WT NS - nestimulovaný wild - type; WT ST - stimulovaný wild - type

Dle vypočítaných dat lze vyvodit, že stimulace buňky nepoškozuje (viz Tabulka č. 5). Nebyl nalezen významný rozdíl ani mezi stimulací transgenních a wild-type buněk.

Charakterizace makrofágů diferencovaných z monocytů

Makrofágy byly získány diferenciací monocytů pomocí růstového faktoru GM-CSF. Fenotyp buněk byl prokázán dvojitým barvením monoklonálními protilátkami CD14 a CD163.

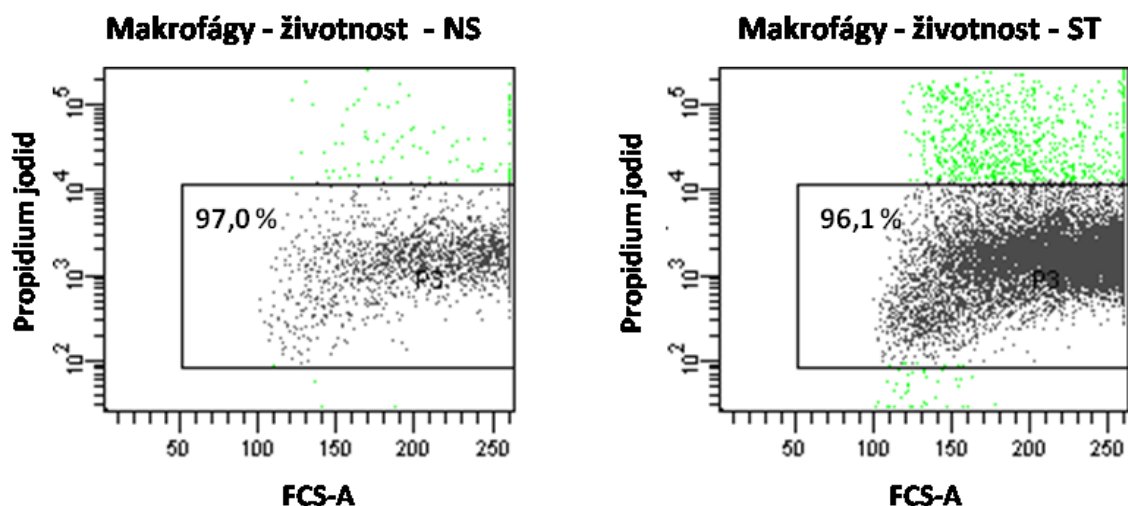


Obrázek č. 11 - Fenotyp diferencovaných makrofágů - dvojitě barvení (CD14; CD163). A - izotopová kontrola; B - charakterizace makrofágů - kvadrant Q2 obsahuje 70,3 % buněčné populace, která je pozitivní pro oba markery. V kvadrantu Q1 jsou buňky, které mají znak CD14. V kvadrantu Q4 (4,5 %) se vyskytují buňky, které dozrávají a ztratili marker CD14 (Chamorro et al., 2005; Mccullough et al., 1997). Q2 a Q4 tedy obsahuje buňky, které již diferencovaly v makrofágy.

Mezi makrofágy získanými z transgenních a wild-type miniprasat nebyl nalezen rozdíl ve fenotypu. Množství takto získaných makrofágů bylo podobné u Tg i WT miniprasat. Tyto buňky byly následně použité na stimulaci.

Životnost makrofágů diferencovaných z monocytů ověřená pomocí FACS

Životnost makrofágů, které byly diferencovány z monocytů, byla ověřena propidium jodidem. Životnost těchto buněk byla zjišťována u vzorků získaných z transgenních i wild-type miniprasat, jak stimulovaných, tak nestimulovaných buněk.



Obrázek č. 12 - Určení životnosti nestimulovaných (NS) a stimulovaných (ST) makrofágů pomocí PI. Reprezentativní dot-ploty ukazují, že 97 % populace nestimulovaných buněk je životaschopná. Stimulaci pomocí LPS a IFN γ přežilo 96,1 % buněk (platí pro stimulaci 10 i 100 ng/mL LPS). Stimulace nemá vliv na životnost buněk.

Životnost makrofágů diferencovaných z monocytů

Za použití PI (ředění 1:1000) byla, stejně jako u monocytů, prokázána životaschopnost buněk. Buňky byly opět pomocí fluorescenčního mikroskopu (IX 70, Olympus) a programu ImageJ vyhodnoceny. Následně byla v programu Excel vypočítána jejich průměrná životnost (viz Tabulka č. 6)

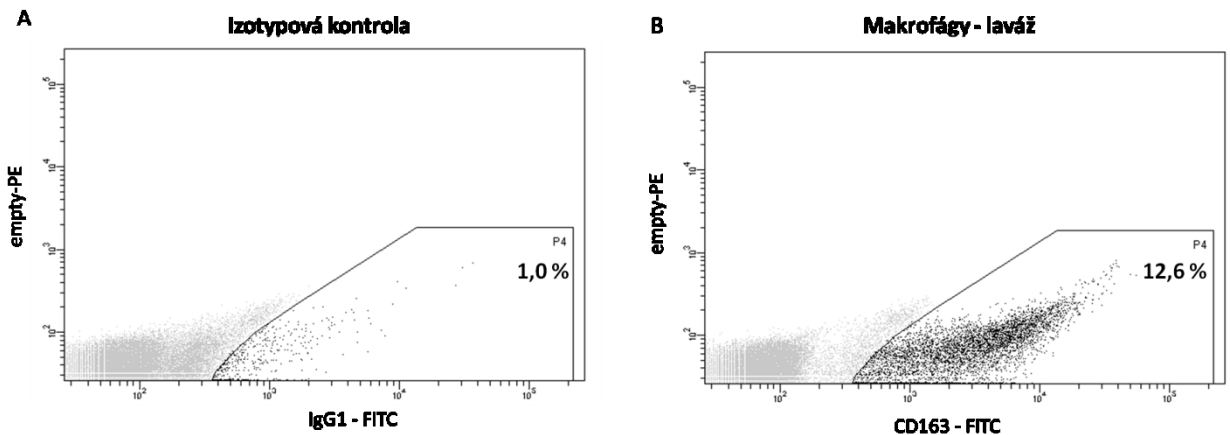
Životnost	Živé (%)	Neživé (%)
TG NS	97,11	2,89
TG 10	98,14	1,86
TG 100	98,27	1,73
WT NS	98,19	1,81
WT 10	97,35	2,65
WT 100	97,91	2,09

Tabulka č. 6 - Životnost makrofágů - Propidium jodid. TG NS - nestimulovaný transgen; TG ST - stimulovaný transgen; WT NS - nestimulovaný wild - type; WT ST - stimulovaný wild - type

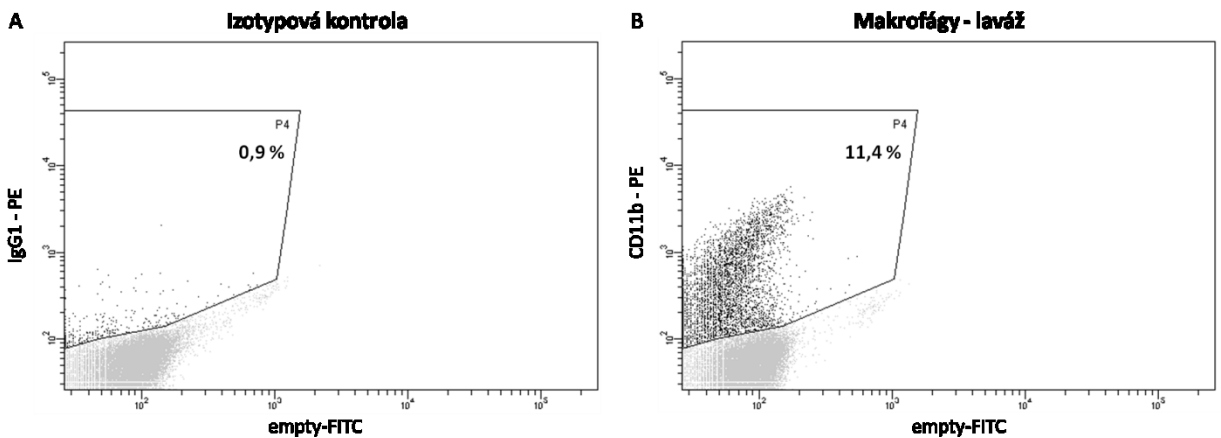
Nebyly nalezeny rozdíly v životnosti buněk získaných od transgenních a wild-type miniprasat. Lze tedy vyvodit, že stimulace buňky nepoškozuje a nemá vliv na jejich životaschopnost. Obdobné výsledky byly nalezeny u monocytů, kde však byla životnost buněk přibližně o 10 % nižší.

Charakterizace makrofágů získaných z peritoneální laváže

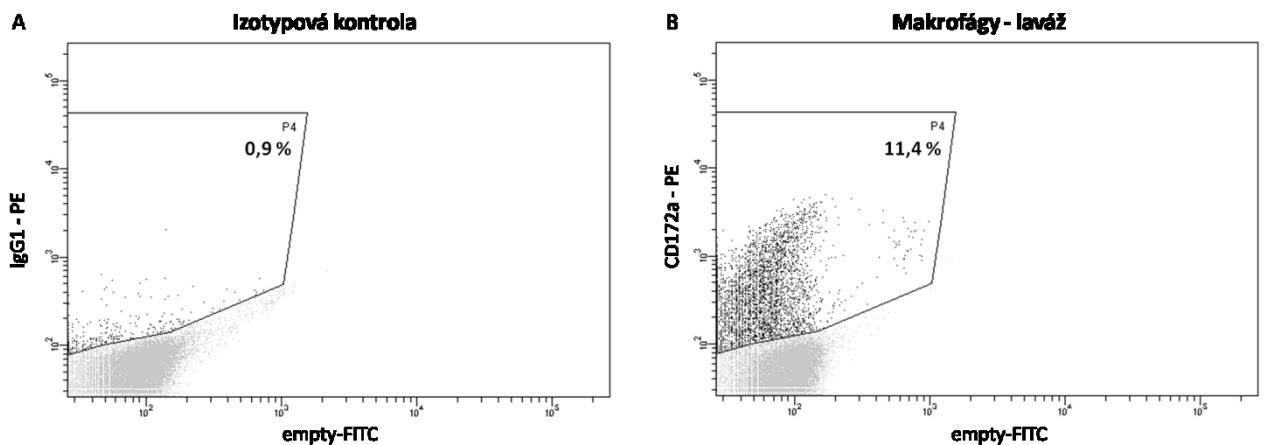
Makrofágy získané z miniprasat metodou peritoneální laváže byly charakterizovány primárními protilátkami CD163, CD172a a CD11b.



Obrázek č. 13 - Charakterizace makrofágů z peritoneální laváže primární protilátkou CD163. A - izotypová kontrola; B - charakterizace makrofágů - makrofágy tvořily 12,6 % populace buněk.



Obrázek č. 14 - Charakterizace makrofágů z peritoneální laváže primární protilátkou CD11b. A - izotypová kontrola; B - charakterizace makrofágů - 11,4 % buněčné populace bylo tvořeno makrofágy.

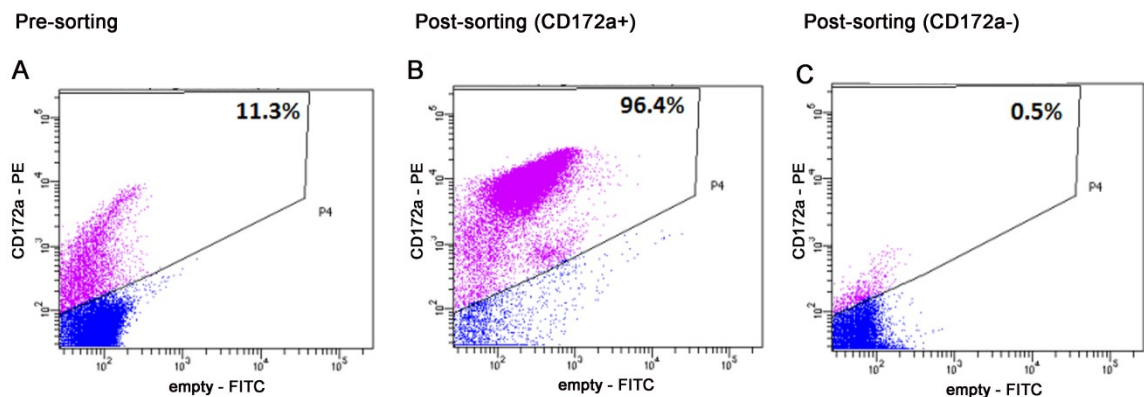


Obrázek č. 15 - Charakterizace makrofágů z peritoneální laváže primární protilátkou CD172a. A - izotypová kontrola; B - charakterizace makrofágů - detekováno 11,4 % makrofágů ve vzorku.

Čistota makrofágů z peritoneální laváže

MACS

Po magnetické separaci byla pomocí primární protilátky CD172a získána téměř 100% čistá populace makrofágů.



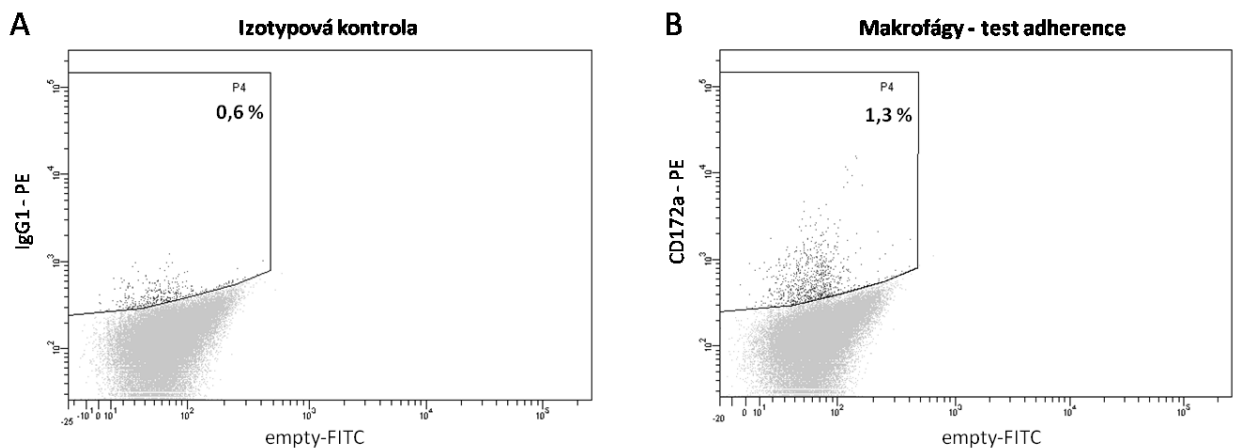
Obrázek č. 16 - Čistota makrofágů. Makrofágy získané z peritoneální laváže tvořily 11,3 % buněčné populace (A). Po provedení magnetické separace byla získána 96,4% populace makrofágů pozitivních pro marker CD172a (B). Populace buněk, která byla po MACS CD172a- tvořila 0,5 % (C).

Metoda adherence makrofágů na podklad

Vyizolované buňky z peritoneální laváže byly po přečištění vysazeny do 24-ti jamkové destičky a neadherentní buňky byly následně odmyty.

Neaderentní buňky

Za použití protilátky CD172a bylo zjištěno množství neadherentních makrofágů, které nepřisedly na podklad během testu adherence. Primární protilátka CD172a je charakteristická vazbou na monocyty a makrofágy.



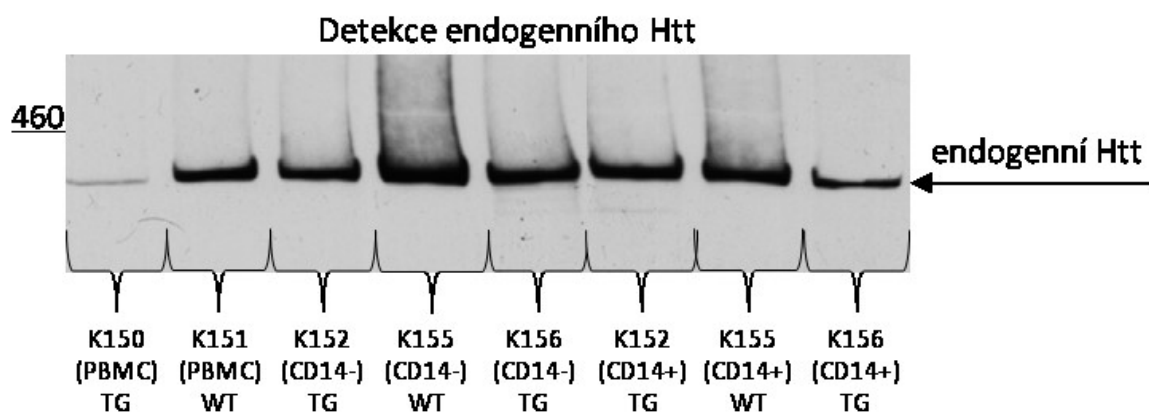
Obrázek č. 17 - Množství nepřisednutých makrofágů po testu adherence. A - izotypová kontrola; B - charakterizace makrofágů - po provedení testu adherence pouze 1,3 % makrofágů neadherovalo na podklad.

Makrofágy získané z břišní dutiny miniprasat byly nakonec izolovány pomocí adherentní metody. Tato metoda byla upřednostněna před izolací pomocí magnetické separace zejména z důvodu jednoduššího provedení a menšího zatížení buněk během izolace.

Takto získané adherentní buňky byly použity pro kultivaci a následnou stimulaci.

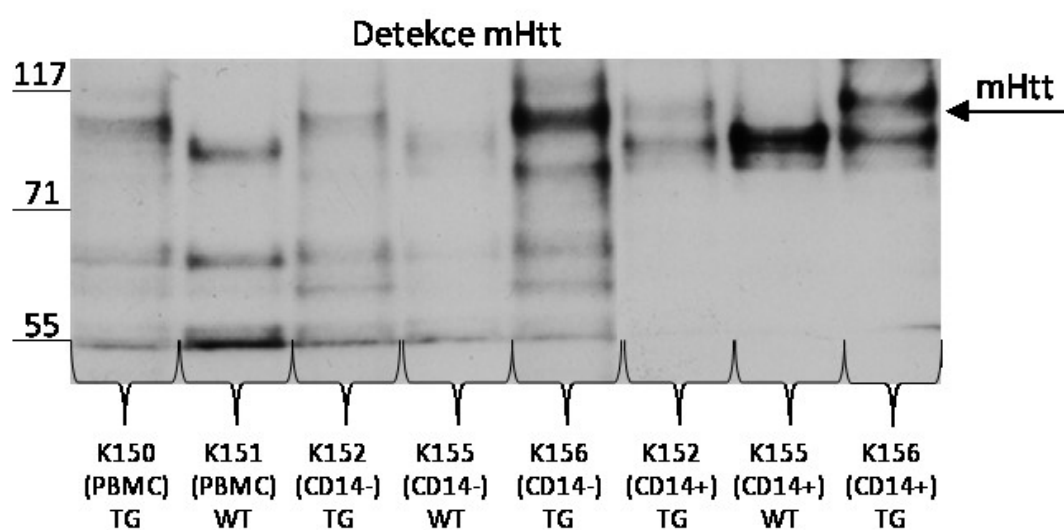
Detekce proteinu huntingtin

Přítomnost proteinu huntingtin byla zjištěna metodou Western blot za použití protilátky EPR5526 o ředění 1:3000. Nanáška byla zkontrolována obarvením membrány pomocí β -tubulinu. Byla detekována endogenní forma proteinu a rovněž mutantní. Endogenní Htt byl zjištěn v periferních krevních mononukleárních buňkách, v CD14- buňkách a CD14+ buňkách (monocytech) nezávisle na tom, zda byly vzorky získány od transgenních nebo WT jedinců.



Obrázek č. 18 - Přítomnost endogenního proteinu Htt ve zkoumaných vzorcích detekována pomocí protilátky EPR5526.

Mutantní forma proteinu Htt byla detekována u vzorků získaných od transgenních zvířat. mHtt byl nalezen v periferních krevních mononukleárních buňkách, CD14- buňkách a CD14+ monocytech.



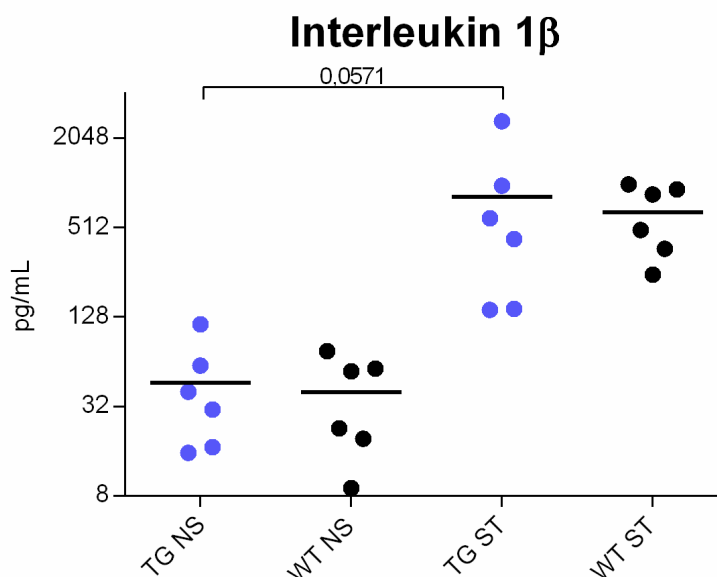
Obrázek č. 19 - Přítomnost mHtt nalezena ve vzorcích získaných od transgenních jedinců. Detekováno protilátkou EPR5526.

Profilování cytokinů

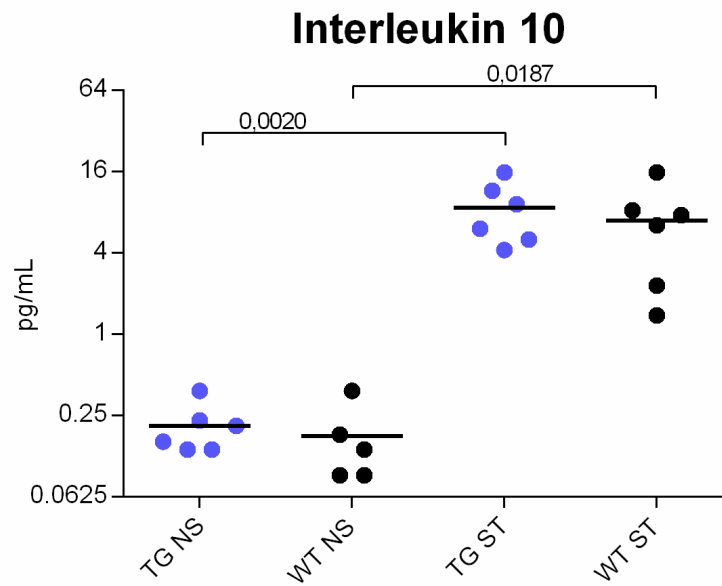
Monocyty

CD14⁺ monocyty, získané z plné krve 48 - 56 měsíčních TG-HD miniprasat, byly izolovány metodou magnetické separace. Následně byly po dobu 16 hodin kultivovány. Poté byly stimulovány IFN γ (10 U/ml) a LPS (3 μ g/ml). Po 24 hodinách stimulace byl odebrán sekretom, který byl následně vyhodnocován metodou Luminex xMAP. Data byla statisticky analyzována pomocí Kolmogorova-Smirnova testu normality a následně metodou ANOVA (Bonferroniho test). P-hodnota < 0,1.

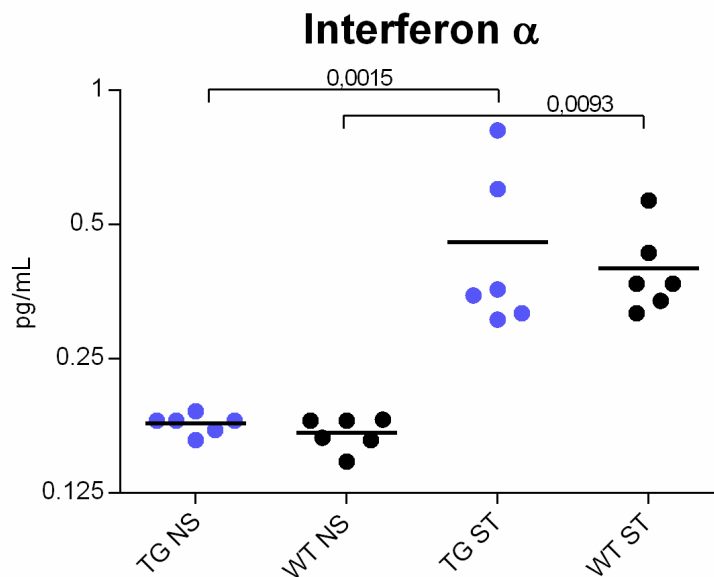
Získané výsledky prokázaly určité rozdíly mezi transgenými a wild-type jedinci. U transgenních miniprasat byla po stimulaci detekována signifikantně zvýšená koncentrace IL-1 β , IL-10 a IFN α v sekretomu monocytů. Oproti tomu koncentrace IL-8 byla u nestimulovaných vzorků získaných z transgenních zvířat snížena.



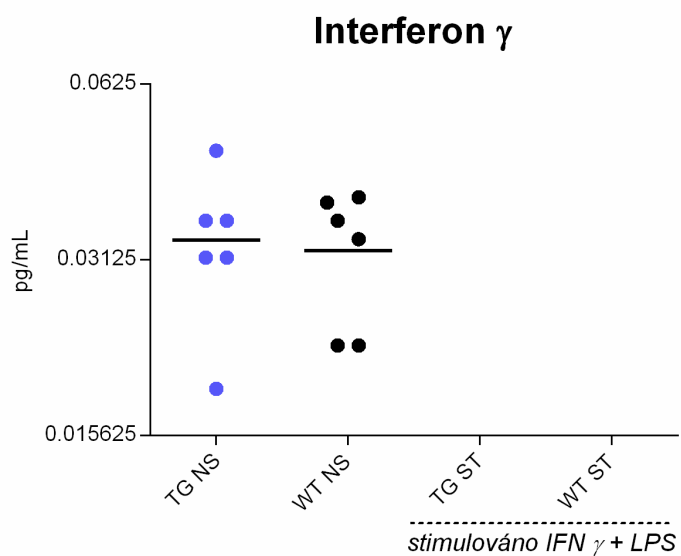
Obrázek č. 20 – Koncentrace IL-1 β v sekretomu monocytů. Nalezena významně vyšší koncentrace cytokinu v sekretomu monocytů získaných z transgenních miniprasat. V porovnání s WT monocyty byla po stimulaci detekována vyšší koncentrace IL-1 β u TG monocytů.



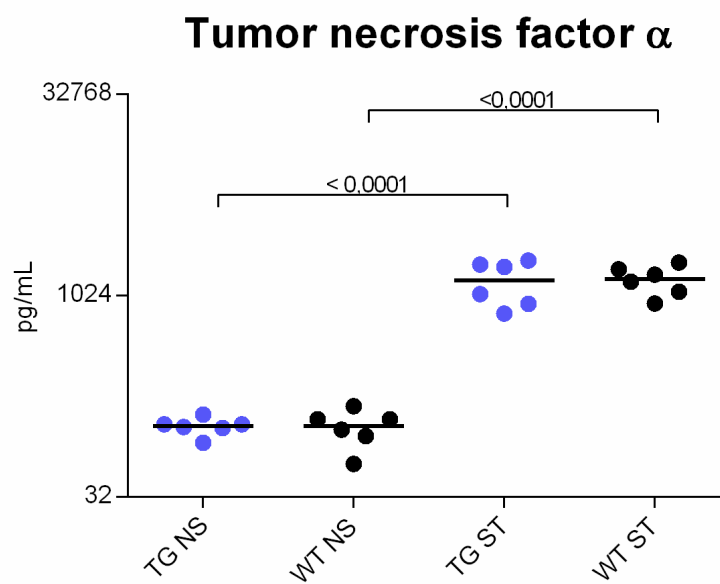
Obrázek č. 21 - Koncentrace IL-10 v sekretu monocyty: Vyšší imunitní odpověď monocyty získaných z transgenních miniprasat oproti WT. Signifikantně vyšší odpověď (hyper-stimulace) TG monocyty na externí stimul. Možná aktivace proti-zánětlivé imunity v CD14+ monocyttech.



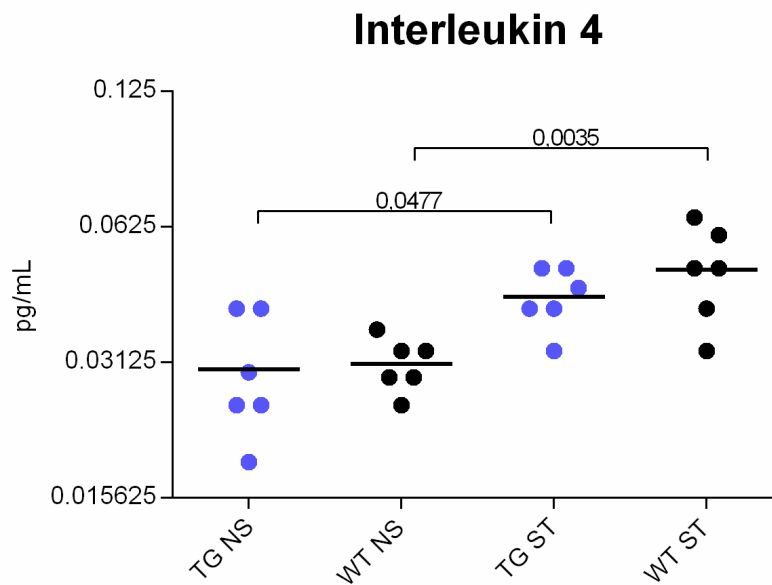
Obrázek č. 22 - Koncentrace IFN α v sekretu monocyty. U TG zvířat byla detekována vyšší odpověď na stimulaci v porovnání s WT.



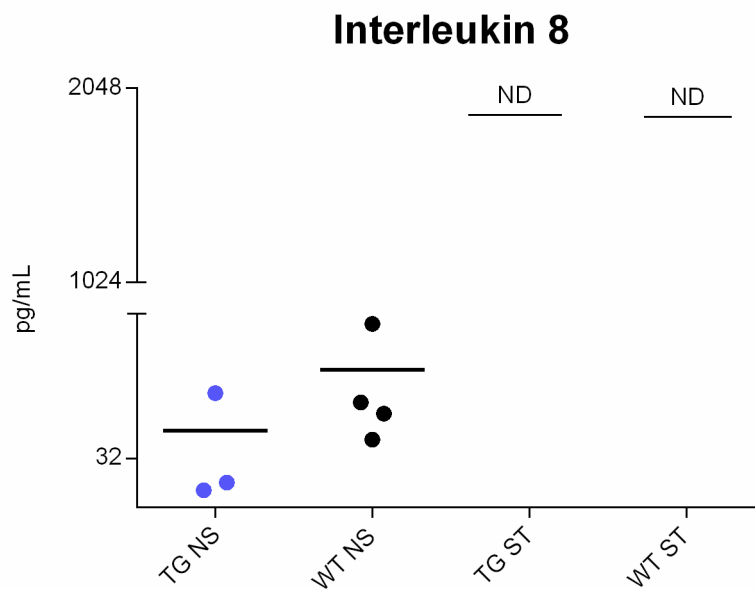
Obrázek č. 23 - Koncentrace IFN γ v sekretomu monocytů. Nebyly detekovány žádné rozdílnosti.



Obrázek č. 24 - Koncentrace TNF α v sekretomu monocytů. Koncentrace cytokinu byla mezi vzorky beze změn.



Obrázek č. 25 - Koncentrace IL-4 v sekretu monocyťů. Pozorováno mírně navýšení koncentrace IL-4 u stimulovaných WT monocyťů oproti monocyťům získaných z TG zvířat

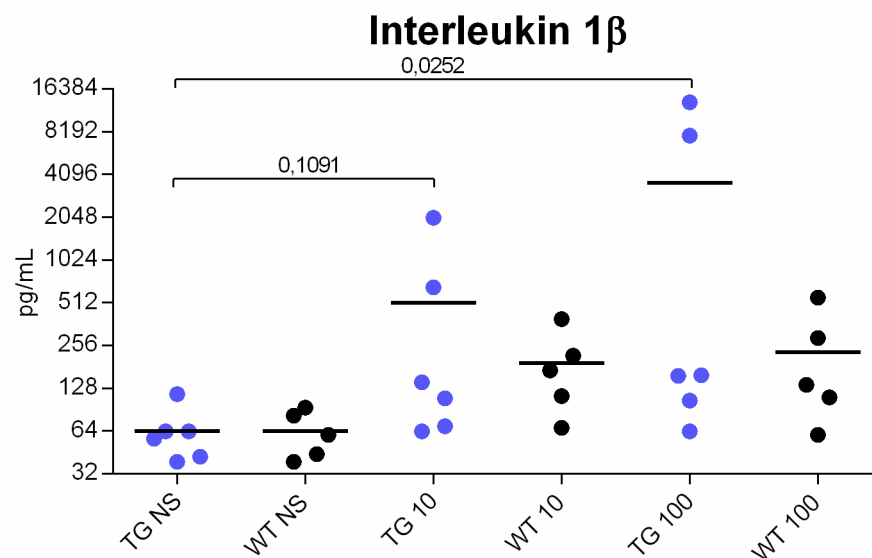


Obrázek č. 26 - Koncentrace IL-8 v sekretu monocyťů. Snížená koncentrace cytokinu u transgenních miniprasat oproti WT v nestimulovaných vzorcích. Zvýšená koncentrace IL-8 u WT detekovaná i v séru. Po stimulaci nárůst mimo detekční limit (ND).

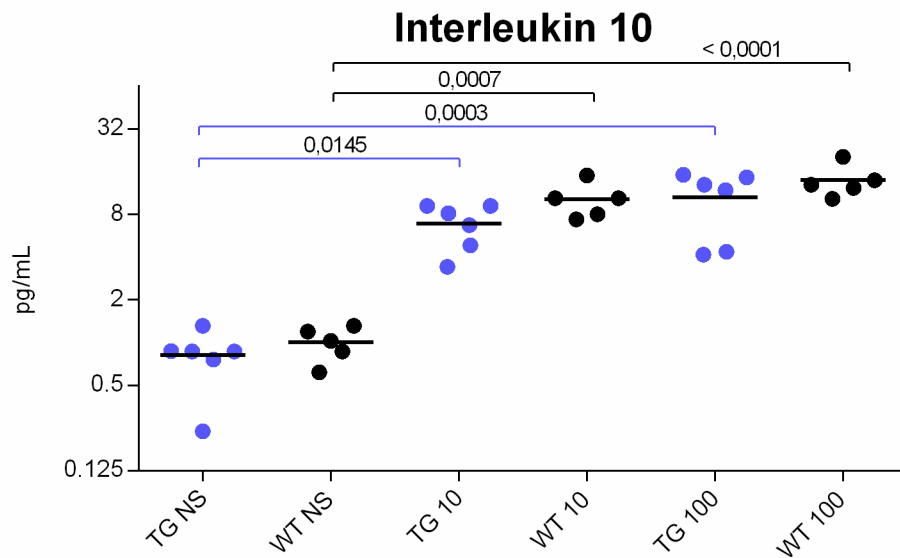
Makrofágy z diferencovaných monocytů

CD14⁺ monocyty byly izolovány z prasečí krve metodou MACS. Vyizolované buňky byly kultivovány v médiu za použití 20 ng/ml rekombinantního prasečího růstového faktoru GM-CSF. Po šesti dnech CD14⁺ monocyty diferencovaly v makrofágy. Fenotyp a čistota buněk byly ověřeny průtokovou cytometrií. Po dobu dalších 24 hodin byly buňky stimulovány IFN γ (10 U/ml) a LPS o dvou koncentracích (10; 100 ng/ml). Posléze byly detekovány koncentrace jednotlivých cytokinů v sekretomech za využití metody Luminex. Získaná data byla statisticky analyzována pomocí Kolmogorova-Smirnova testu normality a metodou ANOVA (Bonferroniho test) v případě IL-10 a IL-4. U cytokinů IL-1 β , IFN α a TNF α byl použit Kruskal-Wallis test (Dunnův mnohočetný srovnávací test). P-hodnota < 0,1.

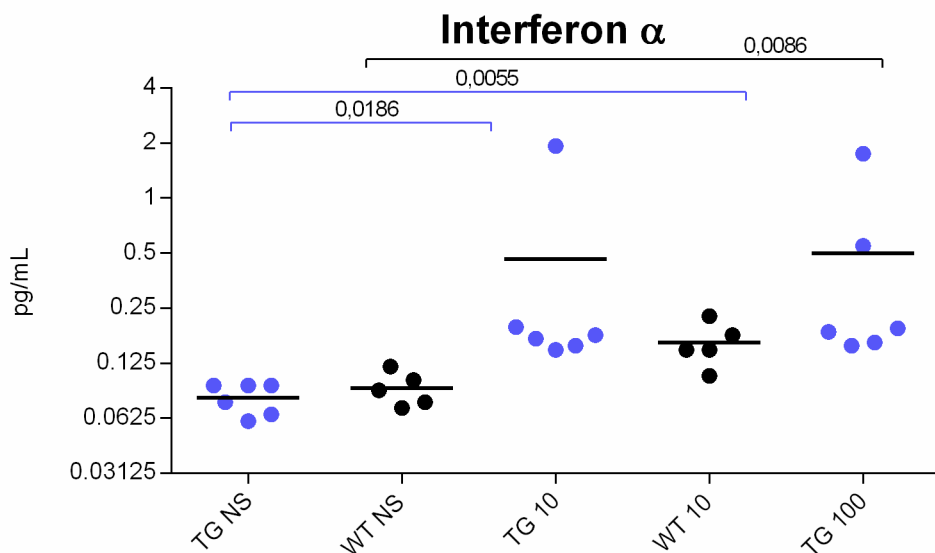
V sekretomech stimulovaných makrofágů diferencovaných z TG monocytů byla nalezena signifikantně zvýšená koncentrace cytokinů IL-1 β , IFN α a TNF α . Rovněž byla detekována zvýšená koncentrace IL-4 v sekretomu transgenních makrofágů, ale až při stimulaci 100 ng/ml LPS.



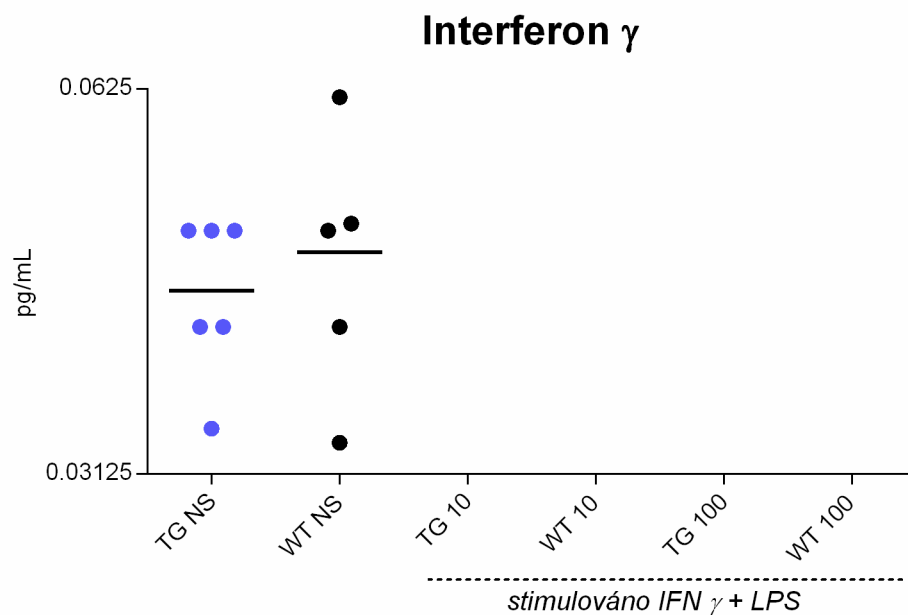
Obrázek č. 27 - Koncentrace IL-1 β v sekretomu makrofágů diferencovaných z monocytů. Po stimulaci vyšší dávkou LPS (100 ng/ml) byla detekována signifikantně vyšší koncentrace tohoto cytokinu v sekretomech makrofágů získaných z transgenních zvířat. Nárůst koncentrace IL-1 β oproti WT byl evidentní i po stimulaci 10 ng/ml.



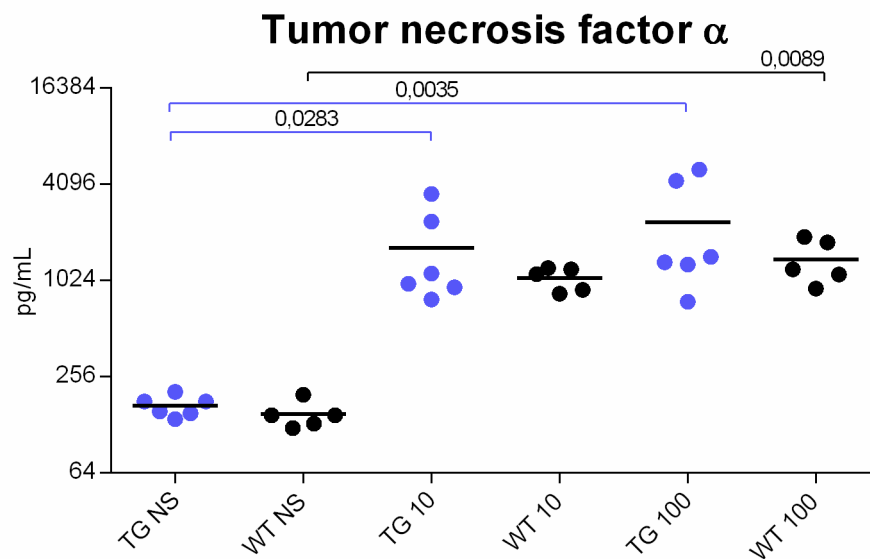
Obrázek č. 28 - Koncentrace IL-10 v sekretomu makrofágů diferencovaných z monocytů. Nutná vyšší dávka externího stimulu (100 ng/ml LPS) u TG vzorků oproti WT. Možná aktivace proti-zánětlivé imunity u TgHD miniprasat.



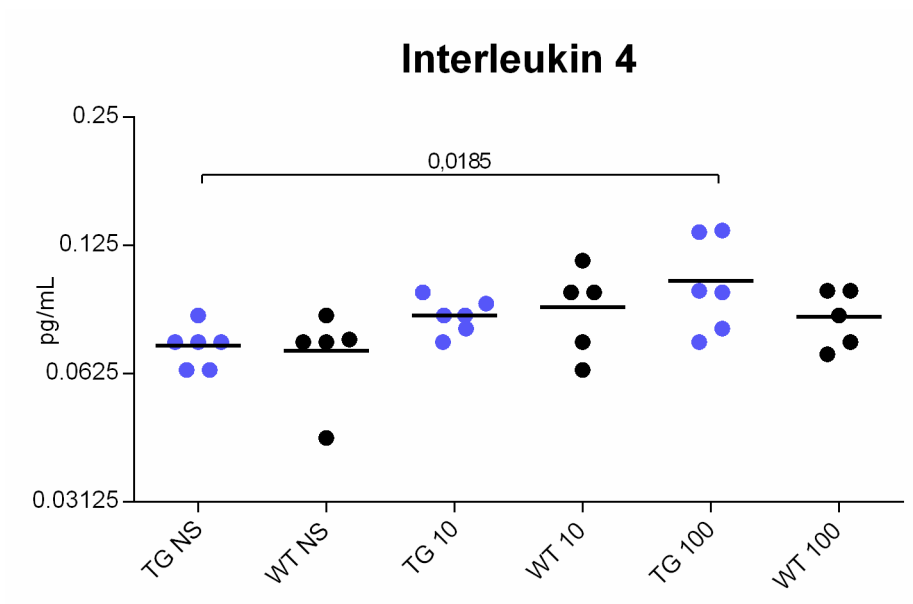
Obrázek č. 29 - Koncentrace IFN α v sekretomu makrofágů diferencovaných z monocytů. Detekována signifikantně zvýšená koncentrace IFN α u transgenních zvířat po stimulaci v porovnání s WT.



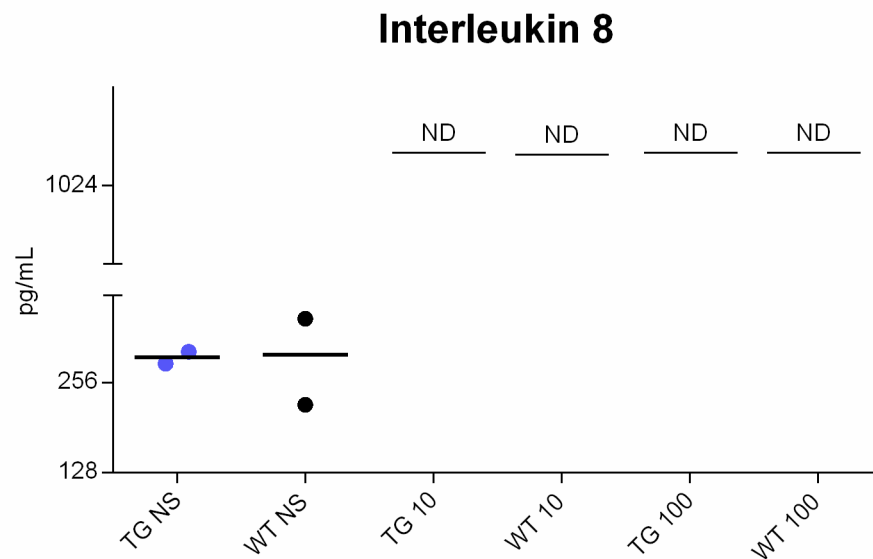
Obrázek č. 30 - Koncentrace IFN γ v sekretu makrofágů diferencovaných z monocytů. Při detekci tohoto cytokinu nebyly nalezeny žádné rozdíly.



Obrázek č. 31 - Koncentrace TNF α v sekretu makrofágů diferencovaných z monocytů. Zjištěna signifikantně vyšší koncentrace TNF α po stimulaci u TgHD miniprasat oproti WT, už po stimulaci 10 ng/ml LPS.



Obrázek č. 32 - Koncentrace IL-4 v sekretu makrofágů diferencovaných z monocytů. Signifikantní nárůst koncentrace IL-4 v sekretu TG makrofágů po stimulaci LPS 100 ng/ml. Možná aktivace proti-zánětlivé imunity u TgHD miniprasat.

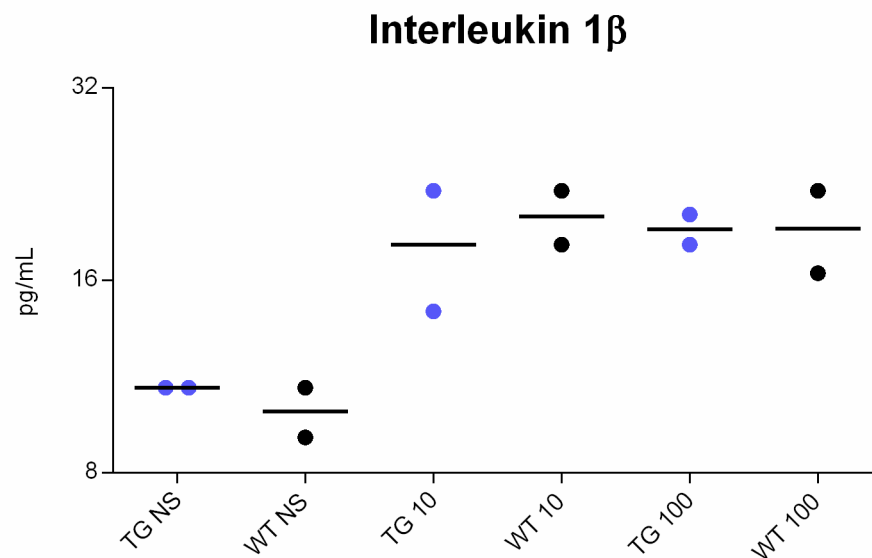


Obrázek č. 33 - Koncentrace IL-4 v sekretu makrofágů diferencovaných z monocytů. Po stimulaci nárůst mimo detekční limit (ND).

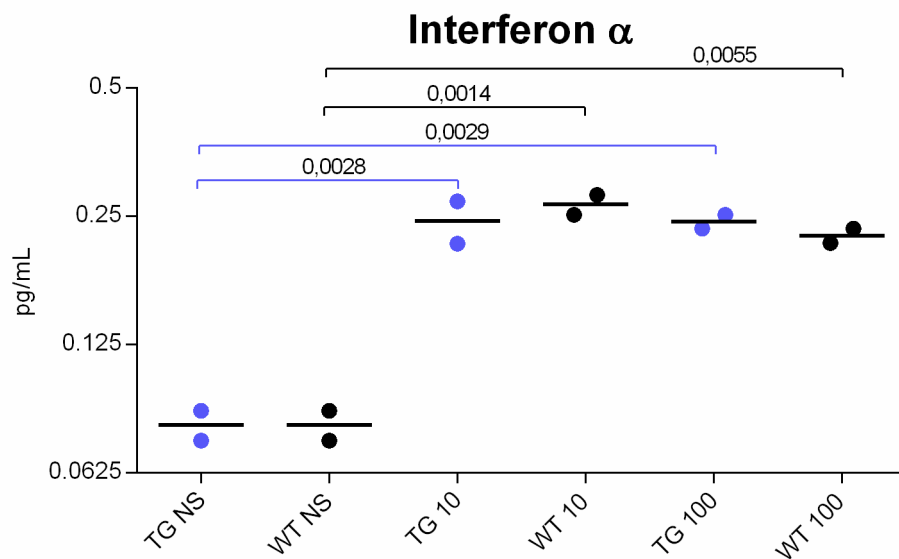
Makrofágy z peritoneální laváže

Plně diferencované makrofágy byly získány *post mortem* peritoneální laváží neboli výplachem břišní dutiny za použití PBS. Peritoneální tekutina obsahující PEC byla postupně přečištěna a testem adherence byla izolována populace makrofágů. Fenotyp peritoneálních makrofágů byl ověřen metodou průtokové cytometrie. Získané buňky byly 24 hodin kultivovány a následně po dobu dalších 24 hodin stimulovány IFN γ (10 U/ml) a LPS o různých koncentracích (10; 100 ng/ml). Posléze byly detekovány koncentrace jednotlivých cytokinů v sekretomech peritoneálních makrofágů metodou Luminex. Vzhledem k normální gausovské distribuci byla pro statistickou analýzu využita metoda ANOVA (Bonferroniho test). P-hodnota < 0,1.

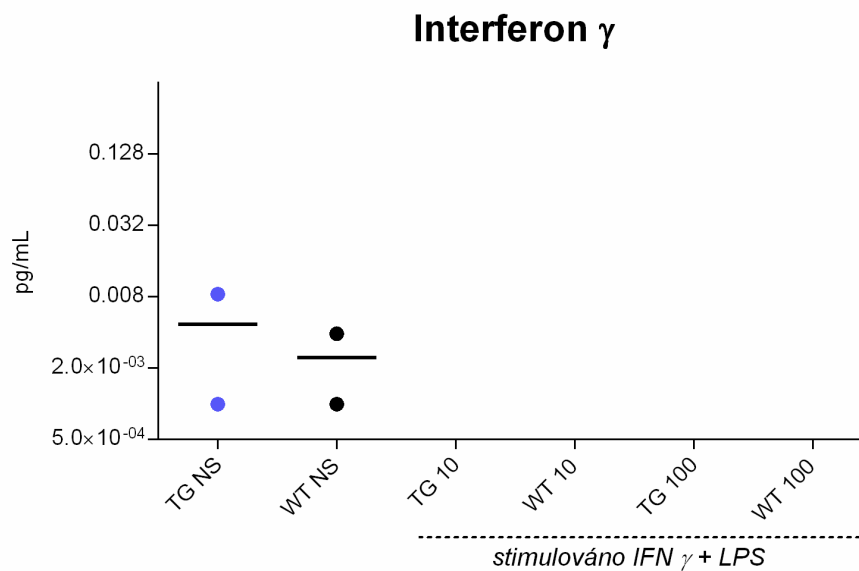
Koncentrace cytokinů získaných ze sekretomů makrofágů metodou peritoneální laváže z transgenních HD minipraset neukázala žádné signifikantní rozdíly oproti WT jedincům. Koncentrace cytokinů IL-10 a IL-8 se nacházela pod limitem detekce.



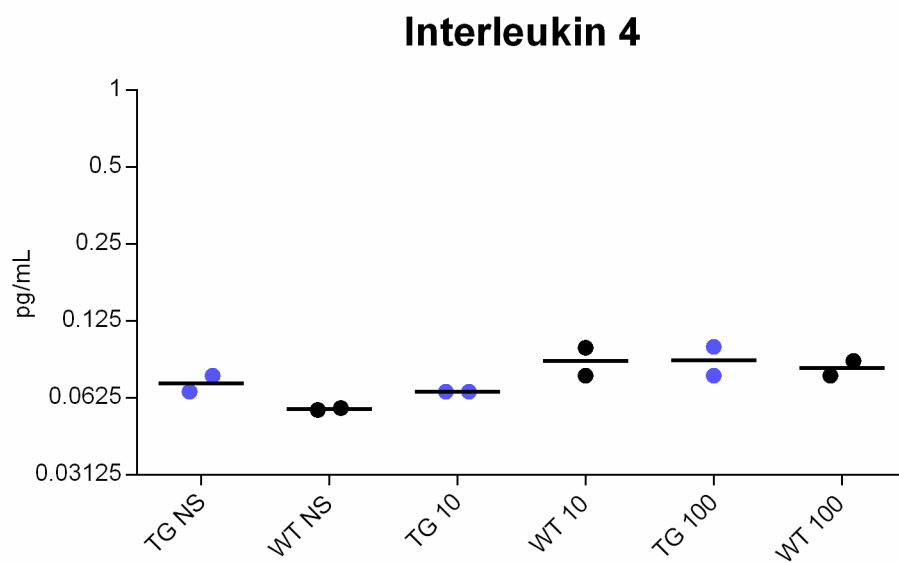
Obrázek č. 34 - Koncentrace IL-1 β v sekretomu makrofágů z peritoneální laváže.



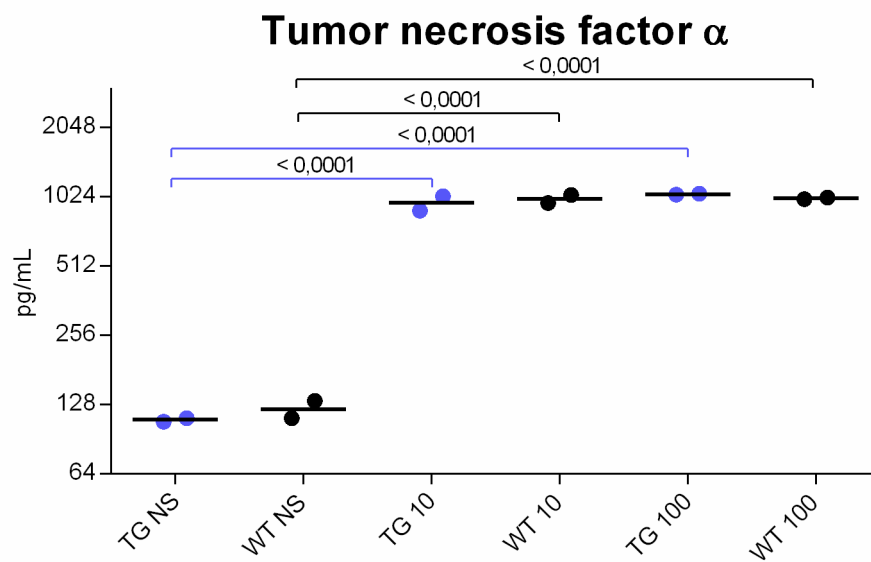
Obrázek č. 35 - Koncentrace IFN α v sekretomu makrofágů z peritoneální laváže. Po stimulaci došlo ke zvýšení koncentrace IFN α v sekretomu TG i WT makrofágů.



Obrázek č. 36 - Koncentrace IFN γ v sekretomu makrofágů z peritoneální laváže.



Obrázek č. 37 - Koncentrace IL-4 v sekretomu makrofágů z peritoneální laváže.

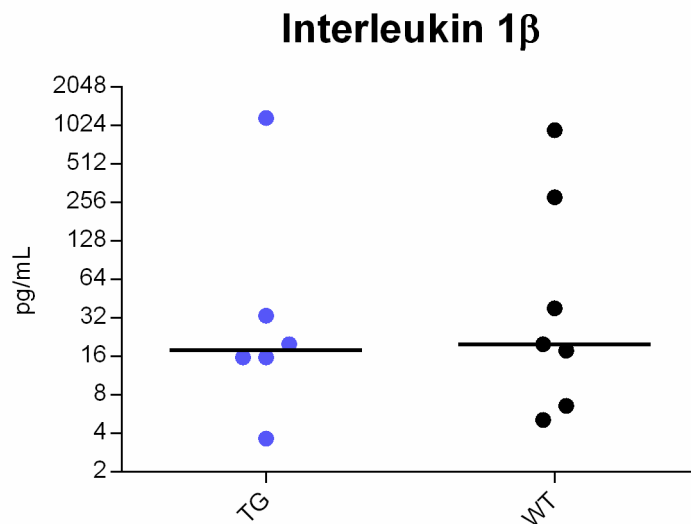


Obrázek č. 38 - Koncentrace TNF α v sekretomu makrofágů z peritoneální laváže.

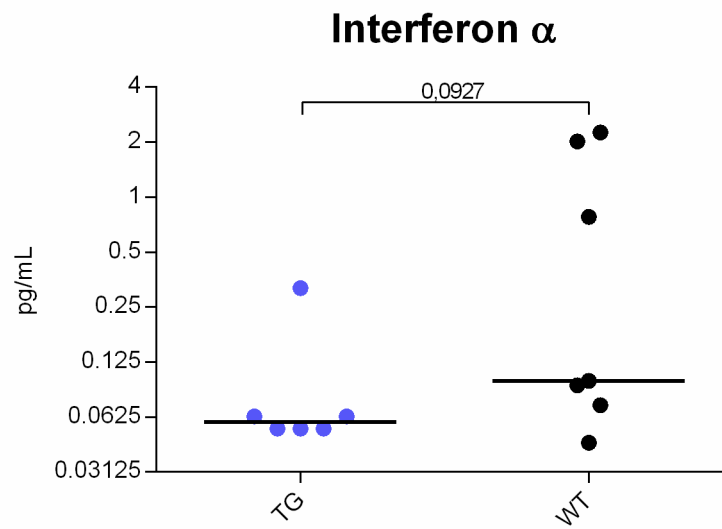
Sérum

Sérum bylo získané z plné krve miniprasat, která se nechala srážet při RT. Po následných centrifugacích bylo získáno čisté sérum, ve kterém byla měřena koncentrace cytokinů metodou Luminex. Pro statistické vyhodnocení získaných dat byl použit Kolmogorovův-Smirnovův test následovaný Mann-Whitney testem nebo nepárovým t-testem. P-hodnota $< 0,1$.

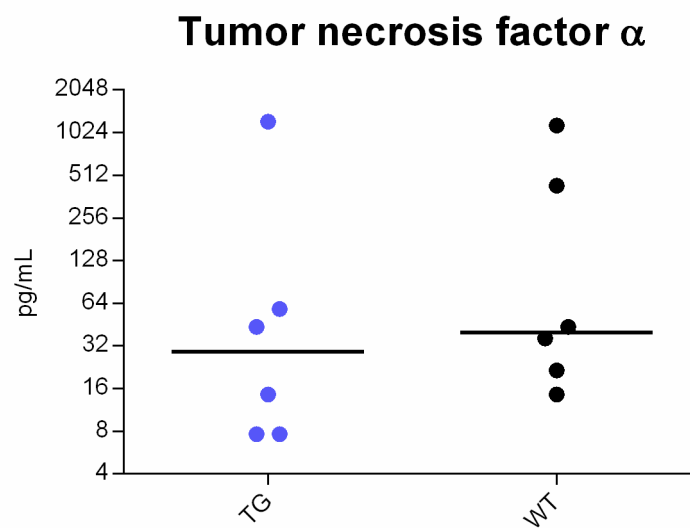
V séru byla zjištěna signifikantně vyšší koncentrace IFN α u WT miniprasat. IL-8 byl zvýšený rovněž u WT jedinců oproti TG. Stejné zvýšení bylo pozorováno u nestimulovaných WT monocytů. Koncentrace ostatních analyzovaných cytokinů neukázala žádné rozdíly mezi WT a TG miniprasaty.



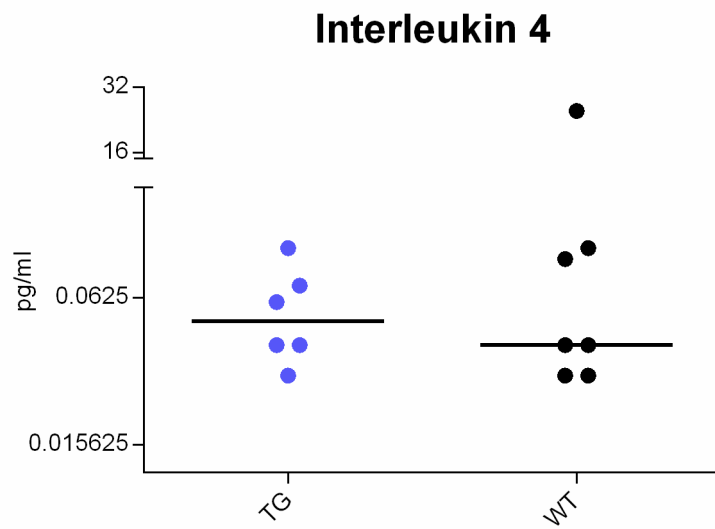
Obrázek č. 39 - Koncentrace IL-1 β v krevním séru.



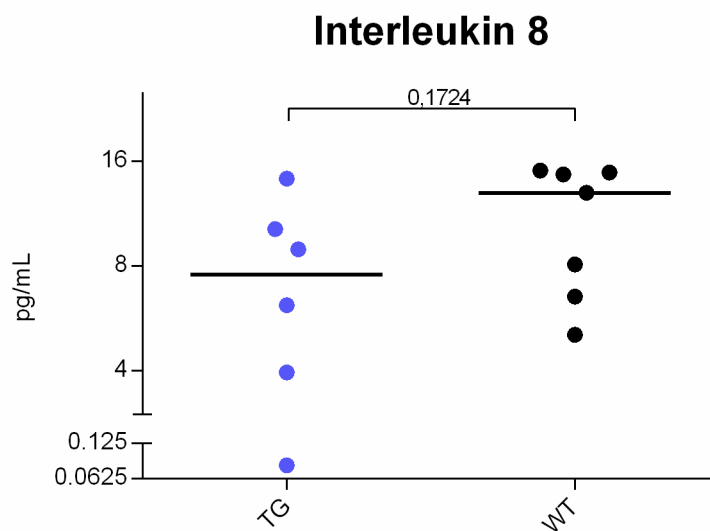
Obrázek č. 40 - Koncentrace IFN α v krevním séru. Koncentrace tohoto cytokinu byla u transgenních miniprasat signifikantně snižená oproti WT.



Obrázek č. 41 - Koncentrace TNF α v krevním séru.



Obrázek č. 42 - Koncentrace IL-4 v krevním séru.



Obrázek č. 43 - Koncentrace IL-8 v séru. Zvýšená koncentrace cytokinu u WT jedinců. Stejně zvýšení bylo detekováno u NS WT monocytů.

DISKUZE

Zapojení imunitního systému do patologie Huntingtonovy choroby zůstává stále otevřeným tématem. Několik studií prokázalo výskyt zánětu v centrální nervové soustavě (Möller, 2010), který je způsobený především aktivovanými mikroglie (Sapp et al., 2001; Pavese et al., 2006; Tai et al., 2007). Aktivace těchto buněk je pozorovatelná již u pre-symptomatických stádií onemocnění (Tai et al., 2007). Jelikož jsou mikroglie obtížně dostupným biologickým materiálem, nabízí se možnost studovat periferní imunitní systém a ověřit, zda se děje odehrávající se v CNS odráží rovněž v periférii.

Mutovaný protein huntingtin (mHtt) je exprimován nejen v neurálních buňkách, ale rovněž v buňkách ne-neurálního původu, tedy i v monocyto-makrofágové linii buněk. K patologii onemocnění rovněž přispívají imunitní mechanismy odehrávající se v periferních tkáních (van der Burg et al., 2009). Tyto buňky zastávají v organismu mnoho funkcí. Zprostředkovávají antimikrobiální ochranu, podílí se na udržování homeostáze organismu a mimo jiné produkují cytokiny, které se podílejí na řízení imunitních pochodů.

Monocyty, makrofágy a mikroglie jsou hyper-responsivní na *in vitro* stimulaci bakteriálním lipopolysacharidem (Björkqvist et al., 2008). Důležitou roli v průběhu onemocnění má tedy rovněž imunitní systém, přičemž právě cytokiny mohou sloužit jako biomarkery progresu HD. Tyto polypeptidové molekuly, které lze relativně snadno získat z buněk periferní krve a následně velmi citlivými metodami detekovat, by mohly umožňovat sledování nástupu a vývoje onemocnění. Cytokiny pravděpodobně představují nový terapeutický cíl, na který lze zaměřit možné léčebné postupy.

Použití velkého zvířecího modelu, transgenního HD miniprasete, které je v mnohém podobné lidskému organismu (Lind et al., 2007; Vodicka et al., 2005), umožňuje sledovat pomalou progresi tohoto neurodegenerativního onemocnění. Pomocí metody lentivirové transgeneze bylo v roce 2009 v Liběchově vytvořeno transgenní miniprase nesoucí lidský mutovaný huntingtin se 124 CAG/CAA repeticemi, který se předává z generace na generaci. Mutovaný protein je u těchto miniprasat exprimován v CNS i v periferních tkáních (Baxa et al., 2013; Macakova et al., 2016; Rausova et al., 2016). Tento model poskytuje možnost studovat poruchy fungování imunitního systému během HD. Fyziologický stav miniprasat (stáří 48 - 56 měsíců) použitých v této práci odpovídá brzkému pre-symptomatickému stádiu

onemocnění u člověka. V roce 2016 byla na libečovských transgenních miniprasatech (stáří 9 - 36 měsíců) provedena studie, která analyzovala přítomnost cytokinů (IFN α , IFN γ , IL-1 β , IL-4, IL-8, IL-10, TNF- α) pomocí Luminex xMAP technologie v sekretomu mikroglíí, cerebrospinální tekutině, séru a v sekretomu monocytů. U TG jedinců byla v sekretomech mikroglíí a mozkomíšním moku (CSF) oproti wild-type sourozencům detekována zvýšená koncentrace pro-zánětlivých cytokinů IL-1 β a IL-8. Dále byla u TG v CSF zjištěna snížená koncentrace antivirového INF α a proti-zánětlivého IL-10 (Valekova et al., 2016).

Snahou této diplomové práce bylo zjistit, zda jsou patrné některé patologické změny v periférii u miniprasečího modelu HD u zvířat ve věku 48 - 56 měsíců. Imunitní buňky získané z transgenních HD miniprasat byly ocharakterizovány metodou průtokové cytometrie. Monocyty byly z periferní krve transgenních HD miniprasat, která byla ve věku 48 - 56 měsíců, vyizolovány pomocí gradientové centrifugace. Magnetickou separací byla získána 98% populace CD14⁺ monocytů. Tyto buňky byly kultivovány a následně po dobu 24 hodin stimulovány IFN γ (10 U/ml) a LPS (3 μ g/ml). Makrofágy byly získány diferenciací z CD14⁺ buněk pomocí růstového faktoru GM-CSF. Přeměna buněk trvala 6 dnů. Získaná buněčná populace byla tvořena téměř ze 75 % CD163⁺ makrofágy. Tyto buňky byly následně stimulovány IFN γ (10 U/ml) a LPS o dvou různých koncentracích (10 ng/ml a 100 ng/ml). Peritoneální makrofágy byly získány izolací z břišní dutiny. Metodou adherence na podklad byla získána populace makrofágů, která byla opět stimulována IFN γ (10 U/ml) a LPS o dvou různých koncentracích (10 ng/ml a 100 ng/ml). Koncentrace cytokinů ze sekretomů CD14⁺ monocytů, makrofágů diferencovaných z CD14⁺ monocytů, makrofágů izolovaných z peritonea a séra byla analyzována kvantitativní proteomickou metodou Luminex xMAP. Metodou Western blot byla potvrzena přítomnost mHtt v PBMC, CD14⁻ buňkách a CD14⁺ monocytech získaných z transgenních zvířat. Získané výsledky prokázaly několik významných rozdílů mezi myeloidními buňkami získanými od 48 - 56 měsíčních transgenních a wild-type miniprasat. Odlišnosti byly rovněž nalezeny i v séru 48 měsíčních miniprasat.

Žádné signifikantní rozdíly mezi TG a WT nebyly nalezeny v sekretomu CD14⁺ monocytů odebraných z prasat ve stáří 36 měsíců, naproti tomu v séru byla detekována statisticky významně zvýšená hladina IL-8 u transgenních zvířat oproti WT (Valekova et al., 2016). Přičemž v CSF a sekretomu mikroglíí získaných z 36 měsíčních miniprasat byly nalezeny signifikantní změny hladin IFN α , IL-10, IL-8 a IL-1 β mezi WT a TG vzorky. Tyto výsledky naznačují přítomnost aktivovaných mikroglíí a zánětu v CNS u TgHD miniprasat (Valekova

et al., 2016), který je typickým průvodcem neurodegenerativních onemocnění. Výsledky studie provedené na 36 měsíčních TG miniprasatech prokázaly rozdíly mezi zkoumanými buněčnými populacemi - mikroglie z CNS a monocytů izolovanými z periferní krve. V sekretomech monocytů nebyly nalezeny žádné signifikantní rozdíly mezi TG a WT. Oproti tomu v sekretomech mikroglie byly nalezeny signifikantní změny v koncentracích cytokinů mezi TG a WT, v případě IL-1 β a IL-8 byly signifikantní rozdíly detekovány i bez stimulace *in vitro*. Množství mHtt bylo v periferních buňkách až o dvacet procent nižší než v mikroglie, to může být mimo jiné jeden z důvodů, proč v periférii nejsou změny tak patrné (Valekova et al., 2016).

U monocytů izolovaných z TG miniprasat byla detekována zvýšená koncentrace IL-10, tedy zvýšená imunitní reakce na vnější stimul u TG oproti WT, což může poukazovat na možnou aktivaci proti-zánětlivé imunity v CD14⁺ buňkách. Oproti tomu statisticky významně snížená koncentrace IL-10 byla detekována po stimulaci 100 ng/ml LPS v sekretomu mikroglie 36 měsíčních transgenních miniprasat (Valekova et al., 2016). U makrofágů diferencovaných z monocytů získaných ze 48 - 56 měsíčních miniprasat byla detekována nižší koncentrace IL-10 u transgenních zvířat po stimulaci LPS o koncentraci 10 i 100 ng/ml. V séru získaném z myššího kmene YAC128 bylo nalezeno zvýšení IL-10 u transgenních jedinců (Kwan et al., 2012a). U monocytů byla koncentrace IL-4 po stimulaci vyšší u vzorků získaných od WT jedinců. IL-4 byl při stimulaci nižší dávkou LPS (10 ng/ml) u transgenních vzorků nenápadně snížen, ale při vyšším externím stimulu (100 ng/ml LPS) došlo u vzorků od transgenních jedinců k navýšení hladiny tohoto proti-zánětlivého cytokinu. U pacientů s HD byl v plasmě detekován nárůst koncentrace IL-4 a IL-10 oproti kontrole a toto zvýšení pozitivně korelovalo s progresí onemocnění. Oba tyto proti-zánětlivé cytokiny se podílejí na adaptivní imunitní odpovědi (Björkqvist et al., 2008).

U nestimulovaných vzorků získaných z monocytů od transgenních 48 - 56 měsíčních miniprasat byla nalezena snížená koncentrace IL-8. Toto snížení bylo nalezeno také v séru 48 měsíčních jedinců. Možné propojení se zvýšenou koncentrací IL-10 u TG. Rovněž možná souvislost s kolísáním koncentrace IL-8 podobně jako v CSF u transgenních miniprasat (nepozorované u WT), přičemž u transgenních zvířat ve věku 9 - 36 měsíců byly v CSF nalezeny dynamické změny v produkci IL-8, kdy docházelo k poklesu i nárůstu koncentrace tohoto cytokinu v závislosti na stáří zvířat. V CSF získaném od WT jedinců nebyly takové rozdíly pozorovány. V séru transgenních 36 měsíčních miniprasat byla nalezena naopak výrazně zvýšená hladina IL-8 (Valekova et al., 2016). Zvýšená koncentrace tohoto cytokinu

byla nalezena v sekretomu mikroglíí získaných ze vzorků mozků odebraných *post-mortem* HD pacientů (Silvestroni et al., 2009). Stejný nárůst koncentrace IL-8 byl detekován v CSF a plasmě HD pacientů (Björkqvist et al., 2008).

Koncentrace IFN α naměřená v sekretomu monocytů neodpovídala významně snížené koncentraci detekované v CSF u 9 - 36 měsíčních transgenních miniprasat. Nízká koncentrace tohoto cytokinu v CSF může souviset se změnami vrozené imunitní odpovědi a podílet se na progresi onemocnění (Valekova et al., 2016). V monocytech získaných od 48 - 56 měsíčních prasat byla koncentrace IFN α u transgenních jedinců mírně zvýšená. Výraznější nárůst koncentrace tohoto cytokinu byl po stimulaci také nalezen u TG makrofágů diferencovaných z monocytů. U vzorků makrofágů izolovaných z břišní dutiny nebyl detekován téměř žádný rozdíl v produkci tohoto anti-virového cytokinu mezi WT a TG.

Koncentrace pro-zánětlivého IL-1 β byla po stimulaci v monocytech a makrofázích signifikantně zvýšená u vzorků z transgenních zvířat oproti kontrolám. U vzorků makrofágů stimulovaných vyšší koncentrací LPS (100 ng/ml) byl nárůst hladiny IL-1 β ještě patrnější. Přičemž v sekretomu mikroglíí od transgenních miniprasat bylo toto zvýšení výrazné u nestimulovaných buněk, nicméně mezi stimulovanými buňkami nebyly rozdíly signifikantní (Valekova et al., 2016). Zvýšená hladina IL-1 β byla rovněž detekována u monocytů získaných myšičí kmene *HdhQ150* (Träger et al., 2015). Zvýšená koncentrace tohoto cytokinu byla nalezena také v sekretomu monocytů získaných od pacientů s HD, a to dokonce již v pre-manifestačním stádiu onemocnění (Politis et al., 2015).

V reakci na infekci dochází ke spuštění vrozené imunitní odpovědi. Aktivované makrofágy a mikroglie začnou sekretovat zánětlivé molekuly včetně TNF α . Pokud nedojde k regeneraci poškození, pokračující produkce zánětlivých mediátorů spouští chronický zánět, který pravděpodobně přispívá k progresi onemocnění. Při měření koncentrace TNF α v sekretomu monocytů 48 - 56 měsíčních miniprasat nebyl nalezen žádný rozdíl mezi WT a TG vzorky. Nicméně u makrofágů diferencovaných z monocytů byla po stimulaci patrná vyšší koncentrace zánětlivého TNF α u transgenních vzorků. Makrofágy získané z břišní dutiny nevykazovaly ani po stimulaci žádné rozdíly mezi WT a TG vzorky. U pacientů s HD dochází k postupnému zvyšování hladiny TNF α , přičemž progresi onemocnění pozitivně koreluje s produkcí tohoto cytokinu (Björkqvist et al., 2008). Zvýšená hladina TNF α byla detekována také v sekretomu monocytů z *R6/2* myši (Träger et al., 2015).

V séru a sekretomech získaných od stimulovaných monocytů či makrofágů z miniprasat ve věku 48 - 56 měsíců byly pomocí kvantitativní metody Luminex detekovány rozdíly mezi WT a TG jedinci. Koncentrace zkoumaných cytokinů byly po stimulaci LPS a $IFN\gamma$ zvýšené u obou skupin - TG i WT. V sekretomech monocytů miniprasat ve věku 36 měsíců nebyly zjištěny žádné signifikantní rozdíly mezi WT a TG zvířaty. Jediným významným nálezem v periférii byla signifikantně zvýšená koncentrace IL-8 v krevním séru TgHD miniprasat ve věku 36 měsíců (Valekova et al., 2016).

Při výzkumu myeloidních buněk je rovněž důležitý jejich původ, neboť u CD11+ myeloidních buněk získaných z kostní dřeně a u makrofágů diferencovaných *in vitro* z myeloidních buněk kostní dřeně HD myši nebyly nalezeny žádné významné změny v produkci pro-zánětlivých cytokinů po stimulaci LPS. Stejně tak u CD11+ buněk izolovaných z kostní dřeně myši nebyly objeveny rozdíly oproti kontrolám. Přičemž u CD11+ myeloidních buněk získaných z krve R6/2 myši byla detekována zvýšená koncentrace IL-6 a $TNF\alpha$ oproti kontrolám. Stejně tak u CD11+ buněk získaných ze sleziny, kde byla detekována zvýšená koncentrace IL-1 β (Träger et al., 2015).

Principy působení mHtt v imunitních buňkách nejsou ještě zcela objasněny. Nicméně je známo zapojení $NF\kappa B$ signální dráhy do patologie HD. Tato dráha má významnou roli při zánětu a imunitní odpovědi - podílí se na regulaci produkce cytokinů, například IL-8, IL-1 β a $TNF\alpha$. Exprese mHtt způsobuje zvýšení aktivity jaderného faktoru κB v buňkách striata R6/2 myši (Khoshnan et al., 2004), dysfunkce této signální dráhy byla prokázána rovněž u monocytů a makrofágů získaných od pacientů s HD. Expandovaná repetice mHtt umožňuje přímou vazbu na $IKK\gamma$, čímž dojde k degradaci inhibitoru ($I\kappa B$) a následné translokaci jaderného faktoru κB ($NF\kappa B$) do jádra, což může způsobit změny v produkci IL-6, $TNF\alpha$, IL-8 a IL-1 β . Nesprávná funkce této vnitřní signální dráhy je jednou z možných příčin zvýšení produkce zánětlivých cytokinů (Träger et al., 2014). Rovněž působení JAK/STAT signální dráhy se zdá být do určité míry zapojené do dysregulace IS během HD. Aktivace této dráhy probíhá přes cytokinový receptor a ovlivňuje transkripci genů pro cytokiny. U pacientů s HD byla zjištěna signifikantně vyšší hladina signální molekuly STAT5, jež je spojována s produkcí IL-6, nicméně ostatní zkoumané molekuly neprokázaly žádné rozdíly oproti kontrolní skupině (Träger et al., 2013).

Jako součást patogeneze HD je považováno rovněž poškození imunitního systému mimo CNS. V periferním systému 48 - 56 měsíčních TgHD miniprasat bylo nalezeno několik

významných změn v produkci cytokinů oproti WT a to zejména v sekretomu CD14+ monocytů (IL-1 β , IL-10, IFN α , IL-8) a z nich diferencovaných makrofágů (IL-1 β , IL-10, IFN α , TNF α , IL-4). V séru byla nalezena signifikantně snížená koncentrace IFN α a zvýšená koncentrace IL-8 u TG zvířat. Sekretomy makrofágů izolovaných metodou peritoneální laváže neprokázaly žádné změny mezi WT a TG miniprasaty, pravděpodobně kvůli malé skupině zkoumaných zvířat (2 TG a 2 WT). Změny exprese těchto cytokinů by mohly v budoucnu směřovat k detekci nových biomarkerů nástupu a progresu onemocnění, ty se mohou pomocí dalších potvrzení stát novými potencionálními znaky HD.

ZÁVĚR

Na patogenezi HD se z velké části podílí zánět v nervové soustavě. Vzhledem k obtížné izolaci mozkové tkáně je předmětem výzkumu zjistit, zda zánětlivé změny odehrávající se v periférii odpovídají tomu, co probíhá v CNS. Rovněž imunitní systém se podílí na patogenezi HD. Dochází k paralelní aktivaci přirozené imunity v centrální nervové soustavě, kde klíčovou roli hrají mikroglie, a v periférii, kde se nachází mimo jiné i monocyty a makrofágy. Na imunitní aktivaci se tedy podílí jak centrální nervový systém, tak periferie. Imunitní buňky jsou hyper-responsivní na externí stimuly a dochází u nich ke změnám v produkci cytokinů (Björkqvist et al., 2008; Möller, 2010).

Diplomová práce byla zaměřena na charakterizaci dysfunkcí v periferním imunitním systému TgHD miniprasat. Vrozený imunitní systém miniprasat je zapojen do patogeneze HD, nicméně byla detekována i nedostatečná odpověď adaptivního imunitního systému.

V periferním imunitním systému TgHD miniprasat bylo nalezeno několik cytokinů, které by mohly sloužit jako biomarkery nástupu a progresu nemoci. V sekretomu monocytů byl jako nejslibnější cytokin detekován IL-1 β , v sekretomu makrofágů pak IL-1 β , TNF α , IL-4, IFN α a v krevním séru IFN α . Zajímavé výsledky ukázala rovněž změněná koncentrace chemokinu IL-8 v séru a sekretomu monocytů mezi WT a TG. Tyto cytokiny by tedy mohly sloužit jako slibné biomarkery nástupu HD u miniprasat. Specifická inhibice nebo aktivace těchto biomarkerů by mohla přispět k vývoji případných léčiv. Vhodný výběr cytokinů, případných biomarkerů HD, může sloužit pro sledování účinnosti terapeutických strategií v preklinickém stádiu. Cytokiny tedy mohou pomoci při hledání nových terapeutických cílů.

Ačkoliv změny v periférii nejsou tak markantní jako v CNS, výhodou výzkumu periferních oblastí stále zůstává méně invazivní odběr tělních tekutin a tkání, neboť získání mozkové tkáně od lidských pacientů je téměř nemožné. Je tedy potřebné sledování dalších změn fungování imunitního systému TgHD miniprasat a snaha o jejich případné směřování k novým terapeutickým strategiím.

CITACE

Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006). Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* 124, 783–801.

Auffray, C., Sieweke, M.H., and Geissmann, F. (2009). Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 669–692.

Baggiolini, M., and Clark-Icwisb, I. (1992). Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory. *Fed. Eur. Biochem. Soc.* 307, 97–101.

Baquet, Z.C., Gorski, J.A., and Jones, K.R. (2004). Early Striatal Dendrite Deficits followed by Neuron Loss with Advanced Age in the Absence of Anterograde Cortical Brain- Derived Neurotrophic Factor. 24, 4250–4258.

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

Becher, M.W., Kotzuc, J.A., Sharp, A.H., Davies, S.W., Bates, G.P., Price, D.L., and Ross, C.A. (1998). Intranuclear Neuronal Inclusions in Huntington's Disease and Dentatorubral and Pallidoluysian Atrophy: Correlation between the Density of Inclusions and IT15 CAG Triplet Repeat Length. 397, 387–397.

Beinke, S., and Ley, S.C. (2004). Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology. *Biochem. J.* 382, 393–409.

Bettini, M., and A. Vignali, D.A. (2010). Regulatory T cells and inhibitory cytokines in autoimmunity. 21, 612–618.

Bhide, P.G., Day, M., Sapp, E., Schwarz, C., Sheth, A., Kim, J., Young, A.B., Penney, J., Golden, J., Aronin, N., et al. (1996). Expression of Normal and Mutant Huntingtin in the Developing Brain. 16, 5523–5535.

Bibb, J.A., Yan, Z., Svenningsson, P., Snyder, G.L., Pieribone, V.A., Horiuchi, A., Nairn, A.C., Messer, A., and Greengard, P. (2000). Severe deficiencies in dopamine signaling in presymptomatic Huntington's disease mice. 97, 6809–6814.

Björkqvist, M., Wild, E.J., Thiele, J., Silvestroni, A., Andre, R., Lahiri, N., Raibon, E., Lee, R. V, Benn, C.L., Soulet, D., et al. (2008). A novel pathogenic pathway of immune activation detectable before clinical onset in Huntington's disease. *J. Exp. Med.* 205, 1869–1877.

Bonneh-barkay, D., Bissel, S.J., Wang, G., Fish, K.N., Nicholl, G.C.B., Darko, S.W., Medina-flores, R., Murphey-corb, M., Rajakumar, P.A., Nyaundi, J., et al. (2008). YKL-40, a Marker of Simian Immunodeficiency Virus Encephalitis, Modulates the Biological Activity of Basic Fibroblast Growth Factor. 173, 130–143.

Bouchard, J., Truong, J., Bouchard, K., Dunkelberger, D., Desrayaud, S., Moussaoui, S.,

- Tabrizi, S.J., Stella, N., and Muchowski, P.J. (2012). Cannabinoid Receptor 2 Signaling in Peripheral Immune Cells Modulates Disease Onset and Severity in Mouse Models of Huntington ' s Disease. *32*, 18259–18268.
- Browne, S.E. (2008). Mitochondria and Huntington ' s Disease Pathogenesis Insight from Genetic and Chemical Models. *382*, 358–382.
- Bullido, R., Marina, A., Lunney, J., Alonso, F., and Ezquerra, A. (2000). A porcine cell surface receptor identified by monoclonal antibodies to SWC3 is a member of the signal regulatory protein family and associates with protein-tyrosine phosphatase SHP-1. *55*, 342–351.
- van der Burg, J.M.M., Björkqvist, M., and Brundin, P. (2009). Beyond the brain: widespread pathology in Huntington ' s disease. *Lancet. Neurol.* *8*, 765–774.
- Cattaneo, E., Rigamonti, D., Goffredo, D., Zuccato, C., Sipione, S., and Cattaneo, E. (2001). Loss of normal huntingtin function : new developments in Huntington ' s disease research. *24*, 182–188.
- Clarkson, S.B., and Ory, P.A. (1988). Developmentally Regulated IgG Fc Receptors On Cultured Human Monocytes Receptors for the Fc portion of IgG (FcRs)' play a role in mediating both normal and pathologic immunophagocytosis . One FcR on human cells termed CD16 by the International Worksho. *167*.
- Crotti, A., Glass, C.K., Hensley, K., Aguzzi, A., al., et, Samii, A., al., et, Schellenberg, G.D., Montine, T.J., Silvestroni, A., et al. (2015). The choreography of neuroinflammation in Huntington ' s disease. *Trends Immunol.* *36*, 364–373.
- Davies, S.W., Turmaine, M., Cozens, B.A., Difiglia, M., Sharp, A.H., Ross, C.A., Scherzinger, E., Wanker, E.E., Mangiarini, L., and Bates, G.P. (1997). Formation of Neuronal Intranuclear Inclusions Underlies the Neurological Dysfunction in Mice Transgenic for the HD Mutation. *90*, 537–548.
- Dawe, H.R., Minamide, L.S., Bamburg, J.R., and Cramer, L.P. (2003). ADF / Cofilin Controls Cell Polarity during Fibroblast Migration. *13*, 252–257.
- Dietrich, P., Shanmugasundaram, R., Shuyu, E., and Dragatsis, I. (2009). Congenital hydrocephalus associated with abnormal subcommissural organ in mice lacking huntingtin in Wnt1 cell lineages. *Hum. Mol. Genet.* *18*, 142–150.
- Difiglia, M., Sapp, E., Chase, K., Schwarz, C., Meloni, A., Young, C., Martin, E., Vonsattel, J., Carraway, R., Reeves, S.A., et al. (1995). Huntingtin Is a Cytoplasmic Protein Associated with Vesicles in Human and Rat Brain Neurons. *14*, 1075–1081.
- Duyano, M.P., Auerbach, A.B., Ryan, A., Persichetti, F., Barnes, G.T., McNeil, S.M., Ge, P., Vonsattel, J.-P., Gusella, J.F., Joyner, A.L., et al. (1995). Inactivation of the mouse Huntington ' s disease gene homolog Hdh. *Science* *269*, 407–410.
- Fabrick, B.O., Dijkstra, C.D., and van den Berg, T.K. (2005). The macrophage scavenger

receptor CD163. *Immunobiology* 210, 153–160.

Gafni, J., and Ellerby, L.M. (2002). Calpain Activation in Huntington ' s Disease. 22, 4842–4849.

Gauthier, L.R., Charrin, C., Dompierre, J.P., Borrell-page, M., Cordelie, F.P., Mey, J. De, Macdonald, M.E., Leßmann, V., Humbert, S., and Gutenbergs-universita, J. (2004). and Survival of Neurons by Enhancing BDNF Vesicular Transport along Microtubules. *Cell* 118, 127–138.

Geiss-Friedlander, R., and Melchior, F. (2007). Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 947–956.

Gill, J.S., Jamwal, S., Kumar, P., and Deshmukh, R. (2017). Sertraline and venlafaxine improves motor performance and neurobehavioral deficit in quinolinic acid induced Huntington's like symptoms in rats: Possible neurotransmitters modulation. *Pharmacol. Reports* 69, 306–313.

Goldberg, Y.P., Nicholson, D.W., Rasper, D., Kalchman, M.A., Koide, H., Graham, R.K., Bromm, M., Kazemi-Esfarjani, P., Thornberry, N.A., Vaillancourt, J.P., et al. (1996). Cleavage of huntingtin by apopain, a proapoptotic cysteine protease, is modulated by the polyglutamine tract. *Nat. Genet.* 13, 442–449.

Gray, M., Shirasaki, D.I., Cepeda, C., Andre, V.M., Lu, X., Tao, J., Yamazaki, I., Li, S., Yi, E., Li, X., et al. (2009). Full Length Human Mutant Huntingtin with a Stable Polyglutamine Repeat Can Elicit Progressive and Selective Neuropathogenesis in BACHD Mice. 28, 6182–6195.

Harjes, P., and Wanker, E.E. (2003). The hunt for huntingtin function: interaction partners tell many different stories. *Trends Biochem. Sci.* 28, 425–433.

Harry, G.J., and Kraft, A.D. (2009). Neuroinflammation and Microglia: Considerations and approaches for neurotoxicity assessment. 4, 1265–1277.

Hayden, M.S., Ghosh, S., Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2012). NF-k B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. 26, 203–234.

Hermel, E., Gafni, J., Propp, S.S., Leavitt, B.R., Wellington, C.L., Young, J.E., Hackam, a S., Logvinova, a V, Peel, a L., Chen, S.F., et al. (2004). Specific caspase interactions and amplification are involved in selective neuronal vulnerability in Huntington's disease. *Cell Death Differ.* 11, 424–438.

Heyes, M.P., Saito, K., and Markey, S.P. (1992). Human macrophages convert L-tryptophan into the neurotoxin. *Biochem. J* 283, 0.

Hilditch-Maguire, P., Trettel, F., Passani, L.A., Auerbach, A., Persichetti, F., and Macdonald, M.E. (2000). Huntingtin: an iron-regulated protein essential for normal nuclear and perinuclear organelles. 9, 2789–2798.

- Ho, L.W., Brown, R., Maxwell, M., and Wytenbach, A. (2001). Wild type huntingtin reduces the cellular toxicity of mutant huntingtin in mammalian cell models of Huntington's disease. 450–452.
- Hodgson, J.G., Agopyan, N., Gutekunst, C., Leavitt, B.R., Lepiane, F., Singaraja, R., Smith, D.J., Bissada, N., Mccutcheon, K., Nasir, J., et al. (1999). A YAC Mouse Model for Huntington's Disease with Full-Length Mutant Huntingtin, Cytoplasmic Toxicity, and Selective Striatal Neurodegeneration. *23*, 181–192.
- Hofman, M.A. (1985). Size and shape of the cerebral cortex in mammals. I. The cortical surface. *Brain. Behav. Evol.* *27*, 28–40.
- Hoth, K.F., Paulsen, J.S., Moser, D.J., Tranel, D., Clark, L.A., and Bechara, A. (2007). Patients with Huntington's disease have impaired awareness of cognitive, emotional, and functional abilities. *J. Clin. Exp. Neuropsychol.* *29*, 365–376.
- Huntington, G. (2003). On Chorea. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* *26*, 109–112.
- Chamorro, S., Revilla, C., Álvarez, B., Alonso, F., Ezquerro, Á., and Domínguez, J. (2005). Phenotypic and functional heterogeneity of porcine blood monocytes and its relation with maturation. *Immunology* *114*, 63–71.
- Chang, K.-H., Wu, Y.-R., Chen, Y.-C., and Chen, C.-M. (2015). Plasma inflammatory biomarkers for Huntington's disease patients and mouse model. *Brain. Behav. Immun.* *44*, 121–127.
- Jeong, H., Then, F., Jr, T.J.M., Mazzulli, J.R., Savas, J.N., Voisine, C., Paganetti, P., Tanese, N., Anne, C., Yamamoto, A., et al. (2010). Acetylation Targets Mutant Huntingtin to Autophagosomes for Degradation. *137*, 60–72.
- Kaňovský, P. (2003). Diferenciální diagnostika neurodegenerativních chorob doprovázených demencí.
- Kapetanovic, R., and Fairbairn, L. (2009). Macrophages Isolation in Pig (Monocyte, Peritoneal, Alveolar and Bone-Marrow).
- Kassubek, J., Juengling, F.D., Kioschies, T., Henkel, K., Karitzky, J., Kramer, B., Ecker, D., Andrich, J., Saft, C., Kraus, P., et al. (2004). Topography of cerebral atrophy in early Huntington's disease: a voxel based morphometric MRI study. *7*, 213–220.
- Kawai, T., and Akira, S. (2007). Signaling to NF- κ B by Toll-like receptors. *Trends Mol. Med.* *13*, 460–469.
- Khoshnan, A., Ko, J., Watkin, E.E., Paige, L.A., Reinhart, P.H., Patterson, P.H., and Carolina, N. (2004). Activation of the I κ B Kinase Complex and Nuclear Factor- κ B Contributes to Mutant Huntingtin Neurotoxicity. *J. Neurosci.* *24*, 7999–8008.
- Khurana Hershey, G., Friedrich, M.F., Esswein, L.A., Thomas, M.L., and Chatila, T.A. (1997). The Association of Atopy with a Gain-of-Function Mutation in the α Subunit of the

- Interleukin-4 Receptor. *N. Engl. J. Med.* *337*, 1720–1725.
- Kim, S.U., and de Vellis, J. (2005). Microglia in health and disease. *J. Neurosci. Res.* *81*, 302–313.
- Kremer, B., Almqvist, E., Theilmann, J., Spence, N., Telenius, H., Goldberg, Y.P., and Hayden, M.R. (1995). Sex-dependent mechanisms for expansions and contractions of the CAG repeat on affected Huntington disease chromosomes. *Am. J. Hum. Genet.* *57*, 343–350.
- Kurihara, T., Warr, G., Loy, J., and Bravo, R. (1997). Defects in macrophage recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor. *J. Exp. Med.* *186*, 1757–1762.
- Kwan, W., Magnusson, A., Chou, A., Adame, A., Carson, M.J., Kohsaka, S., Masliah, E., Möller, T., Ransohoff, R., Tabrizi, S.J., et al. (2012a). Bone Marrow Transplantation Confers Modest Benefits in Mouse Models of Huntington’s Disease. *Neurosci* *32*, 133–142.
- Kwan, W., Träger, U., Davalos, D., Chou, A., Bouchard, J., Andre, R., Miller, A., Weiss, A., Giorgini, F., Cheah, C., et al. (2012b). Mutant huntingtin impairs immune cell migration in Huntington disease. *J Clin Invest.* *122*, 4737–4747.
- Leegwater-Kim, J., and Cha, J.J. (2004). The Paradigm of Huntington ’ s Disease : Therapeutic Opportunities in Neurodegeneration. *1*, 128–138.
- Li, S.-H., Schilling, G., Young, W.S., Li, X.-., Margolis, R.L., Stine, O.C., Wagster, M.V., Abbott, M.H., Franz, M.L., Ranen, N.G., et al. (1993). Huntington’s disease gene (IT15) is widely expressed in human and rat tissues. *Neuron* *11*, 985–993.
- Li, X., Mai, J., Virtue, A., Yin, Y., Gong, R., Sha, X., Gutchigian, S., Frisch, A., Hodge, I., Jiang, X., et al. (2012). IL-35 Is a Novel Responsive Anti-inflammatory Cytokine - A New System of Categorizing Anti-inflammatory Cytokines. *PLoS One* *7*, e33628.
- Li, Z., Karlovich, C.A., Fish, M.P., Scott, M.P., and Myers, R.M. (1999). A putative *Drosophila* homolog of the Huntington ’ s disease gene. *8*, 1807–1815.
- Lind, N.M., Moustgaard, A., Jelsing, J., Vajta, G., Cumming, P., and Hansen, A.K. (2007). The use of pigs in neuroscience: modeling brain disorders. *Neurosci. Biobehav. Rev.* *31*, 728–751.
- Lobsiger, C.S., and Cleveland, D.W. (2007). Glial cells as intrinsic components of non-cell autonomous neurodegenerative disease. *Nat. Neurosci.* *10*, 1355–1360.
- Macakova, M., Bohuslavova, B., Vochozkova, P., Pavlok, A., Sedlackova, M., Vidinska, D., Vochyhanova, K., Liskova, I., Valekova, I., Baxa, M., et al. (2016). Mutated huntingtin causes testicular pathology in transgenic minipig boars. *Neurodegener. Dis.* *16*, 245–259.
- Matsuyama, N., Hadano, S., Onoe, K., Osuga, H., Showguchi-Miyata, J., Gondo, Y., and Ikeda, J.E. (2000). Identification and characterization of the miniature pig Huntington’s disease gene homolog: evidence for conservation and polymorphism in the CAG triplet

repeat. *Genomics* 69, 72–85.

Mccullough, K.C., Schaffner, R., Natale, V., Kim, Y.B., and Summerfield, A. (1997). Phenotype of porcine monocytic cells: modulation of surface molecule expression upon monocyte differentiation into macrophages. *58*, 265–275.

Meuret, G., Bammert, J., and Hoffmann, G. (1974). Kinetics of Human Monocytopoiesis. *Blood* 44, 801–816.

Miller, J., Shaby, B.A., Mitra, S., Masliah, E., and Finkbeiner, S. (2010). Quantitative Relationships between Huntingtin Levels, Polyglutamine Length, Inclusion Body Formation, and Neuronal Death Provide Novel Insight into Huntington's Disease Molecular Pathogenesis. *30*, 10541–10550.

Mitra, S., Schweitzer, E.S., Segal, M.R., and Finkbeiner, S. (2004). Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature* 431, 805–810.

Möller, T. (2010). Neuroinflammation in Huntington's disease. *J. Neural Transm.* 117, 1001–1008.

Mosser, D.M., and Zhang, X. (2009). Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev.* 2008 2, 205–218.

Myers, R.H. (2004). Huntington's disease genetics. *NeuroRx* 1, 255–262.

Olszewski, M.B., Groot, A.J., Dastych, J., and Knol, E.F. (2007). TNF Trafficking to Human Mast Cell Granules: Mature Chain-Dependent Endocytosis. *J. Immunol.* 178, 5701–5709.

Ouyang, W., Rutz, S., Crellin, N.K., Valdez, P.A., and Hymowitz, S.G. (2011). Regulation and Functions of the IL-10 Family of Cytokines in Inflammation and Disease. *Annu. Rev. Immunol.* 29, 71–109.

Palidwor, G. a, Shcherbinin, S., Huska, M.R., Rasko, T., Stelzl, U., Arumughan, A., Foulle, R., Porras, P., Sanchez-Pulido, L., Wanker, E.E., et al. (2009). Detection of alpha-rod protein repeats using a neural network and application to huntingtin. *PLoS Comput. Biol.* 5, e1000304.

Pavese, N.M., Gerhard, A.M., Tai, Y.F.M., Ho, A.K.P., Turkheimer, F.P., Barker, R.A.P., Brooks, D J. MD, Ds., and Piccini, P MD, P. (2006). Microglial activation correlates with severity in Huntington disease: A clinical and PET study. *Neurology* 66, 1638–1643.

Pearce, M.M.P., Spartz, E.J., Hong, W., Luo, L., and Kopito, R.R. (2015). Prion-like transmission of neuronal huntingtin aggregates to phagocytic glia in the *Drosophila* brain. *Nat Commun* 6.

Piriou-Guzylack, L., and Salmon, H. (2008). Membrane markers of the immune cells in swine : an update. *Vet. Res. BioMed Cent.* 39.

Poirier, M.A., Jiang, H., and Ross, C.A. (2005). A structure-based analysis of huntingtin mutant polyglutamine aggregation and toxicity: evidence for a compact beta-sheet structure.

Hum. Mol. Genet. *14*, 765–774.

Politis, M., Pavese, N., Tai, Y.F., Tabrizi, S.J., Barker, R. a, and Piccini, P. (2008). Hypothalamic involvement in Huntington’s disease: an in vivo PET study. *Brain* *131*, 2860–2869.

Politis, M., Lahiri, N., Niccolini, F., Su, P., Wu, K., Giannetti, P., Scahill, R.I., Turkheimer, F.E., Tabrizi, S.J., and Piccini, P. (2015). Increased central microglial activation associated with peripheral cytokine levels in premanifest Huntington’s disease gene carriers. *Neurobiol. Dis.* *83*, 115–121.

Prospero, N.A. Di, and Fischbeck, K.H. (2005). Therapeutics development for triplet repeat expansion diseases. *6*, 756–765.

Qi, L., Zhang, X., Wu, J., Lin, F., Wang, J., Difiglia, M., and Qin, Z. (2012). The Role of Chaperone-Mediated Autophagy in Huntingtin Degradation. *7*, 1–16.

Qin, Z., Wang, Y., Kegel, K.B., Kazantsev, A., Apostol, B.L., Thompson, L.M., Yoder, J., Aronin, N., and Difiglia, M. (2003). Autophagy regulates the processing of amino terminal huntingtin fragments. *12*, 3231–3244.

Ranen, N.G., Stine, O.C., Abbott, M.H., Sherr, M., Codori, a M., Franz, M.L., Chao, N.I., Chung, a S., Pleasant, N., and Callahan, C. (1995). Anticipation and instability of IT-15 (CAG)_n repeats in parent-offspring pairs with Huntington disease. *Am. J. Hum. Genet.* *57*, 593–602.

Rausova, P., Vochozkova, P., Vidinska, D., Hrciarova, E., Bohuslavova, B., Macakova, M., Valekova, I., Juhas, S., Ardan, T., Rausova, P., et al. (2016). Porcine Model of Huntington’s Disease. *INTECH* 1–20.

Reiner, A., Albin, R.L., Anderson, K.D., D’Amato, C.J., Penney, J.B., and Young, a B. (1988). Differential loss of striatal projection neurons in Huntington disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *85*, 5733–5737.

Rockabrand, E., Slepko, N., Pantalone, A., Nukala, V.N., Kazantsev, A., Marsh, J.L., Sullivan, P.G., Steffan, J.S., Sensi, S.L., and Thompson, L.M. (2007). The first 17 amino acids of Huntingtin modulate its sub-cellular localization, aggregation and effects on calcium homeostasis. *Hum. Mol. Genet.* *16*, 61–77.

Rodrigues, F.B., Byrne, L.M., Mccolgan, P., Robertson, N., Tabrizi, S.J., Zetterberg, H., and Wild, E.J. (2016). Cerebrospinal Fluid Inflammatory Biomarkers Reflect Clinical Severity in Huntington’s Disease. *J. Huntingtons. Dis.* *19*, 1–10.

Rocha, N.P., Ribeiro, F.M., Furr-stimming, E., and Teixeira, A.L. (2016). Neuroimmunology of Huntington’s Disease : Revisiting Evidence from Human Studies. *2016*, 1–10.

Rosenblatt, A. (2007). Neuropsychiatry of Huntington’s disease. *Dialogues Clin. Neurosci.* *9*, 191–197.

- Ross, C.A., and Tabrizi, S.J. (2011). Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment. *Lancet Neurol.* *10*, 83–98.
- van Rossum, D., and Hanisch, U.-K. (2004). Microglia. *Metab. Brain Dis.* *19*, 393–411.
- Sahl, S.J., Weiss, L.E., Duim, W.C., Frydman, J., and Moerner, W.E. (2012). Cellular inclusion bodies of mutant huntingtin exon 1 obscure small fibrillar aggregate species. *Sci. Rep.* *2*, 895.
- Sahl, S.J., Lau, L., Vonk, W.I.M., Weiss, L.E., Frydman, J., and Moerner, W.E. (2015). Delayed emergence of subdiffraction-sized mutant huntingtin fibrils following inclusion body formation. *Q. Rev. Biophys.* 1–13.
- Sapp, E., Kegel, K.B., Aronin, N., Hashikawa, T., Uchiyama, Y., Tohyama, K., Bhide, P.G., Vonsattel, J.P., and Figlia, M.D.I. (2001). Early and Progressive Accumulation of Reactive Microglia in the Huntington Disease Brain. *60*.
- Sathasivam, K., Hobbs, C., Turmaine, M., Mangiarini, L., Mahal, A., Bertaux, F., Wanker, E.E., Doherty, P., Davies, S.W., and Bates, G.P. (1999). Formation of polyglutamine inclusions in non-CNS tissue. *8*.
- Sathe, P., Metcalf, D., Vremec, D., Naik, S.H., Langdon, W.Y., Huntington, N.D., Wu, L., and Shortman, K. (2014). Lymphoid Tissue and Plasmacytoid Dendritic Cells and Macrophages Do Not Share a Common Macrophage-Dendritic Cell-Restricted Progenitor. *Immunity* *41*, 104–115.
- Semaka, a, Collins, J. a, and Hayden, M.R. (2010). Unstable familial transmissions of Huntington disease alleles with 27-35 CAG repeats (intermediate alleles). *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.* *153B*, 314–320.
- Sieradzan, K.A., Mehan, A.O., Jones, L., Wanker, E.E., Nukina, N., and Mann, D.M.A. (1999). Huntington's Disease Intranuclear Inclusions Contain Truncated, Ubiquitinated Huntingtin Protein. *Exp. Neurol.* *99*, 92–99.
- Silvestroni, A., Faull, R.L.M., Strand, A.D., and Mo, T. (2009). Distinct neuroinflammatory profile in post-mortem human Huntington's disease. *1097–1103*.
- Skrzeczyńska-Moncznik, J., Bzowska, M., Loseke, S., Grage-Griebenow, E., Zembala, M., and Pryjma, J. (2008). Peripheral blood CD14^{high} CD16⁺ monocytes are main producers of IL-10. *Scand. J. Immunol.* *67*, 152–159.
- Slow, E.J. (2003). Selective striatal neuronal loss in a YAC128 mouse model of Huntington disease. *Hum. Mol. Genet.* *12*, 1555–1567.
- Soulet, D., and Cicchetti, F. (2011). The role of immunity in Huntington's disease. *Mol. Psychiatry* *16*, 889–902.
- Steffan, J.S., Agrawal, N., Pallos, J., Rockabrand, E., Trotman, L.C., Slepko, N., Illes, K.,

- Lukacsovich, T., Zhu, Y., Cattaneo, E., et al. (2004). SUMO Modification of Huntingtin and Huntington's Disease Pathology. *Science* (80-). *304*, 100–104.
- Swindle, M.M., Makin, A., Herron, A.J., Clubb, F.J., and Frazier, K.S. (2012). Swine as models in biomedical research and toxicology testing. *Vet. Pathol.* *49*, 344–356.
- Tai, Y.F., Pavese, N., Gerhard, A., Tabrizi, S.J., Barker, R.A., Brooks, D.J., and Piccini, P. (2007). Imaging microglial activation in Huntington's disease. *72*, 148–151.
- Tartari, M., Gissi, C., Lo Sardo, V., Zuccato, C., Picardi, E., Pesole, G., and Cattaneo, E. (2008). Phylogenetic comparison of huntingtin homologues reveals the appearance of a primitive polyQ in sea urchin. *Mol. Biol. Evol.* *25*, 330–338.
- The Huntington's Disease Collaborative Research Group (1993). A Novel Gene Containing a Trinucleotide That Is Expanded and Unstable on Huntington's Disease Chromosomes. *Cell* *72*, 971–983.
- Thompson, L.M., Aiken, C.T., Kaltenbach, L.S., Agrawal, N., Illes, K., Khoshnan, A., Martinez-vincente, M., Rourke, J.G.O., Khashwji, H., Lukacsovich, T., et al. (2009). IKK phosphorylates Huntingtin and targets it for degradation by the proteasome and lysosome. *187*, 1083–1099.
- Träger, U., Magnusson, A., Lahiri, N., Edward, S., Janet, W., and Mark, N. (2013). JAK / STAT Signalling in Huntington's Disease Immune Cells. *PLoS Curr.* 1–8.
- Träger, U., Andre, R., Lahiri, N., Magnusson-Lind, A., Weiss, A., Grueninger, S., McKinnon, C., Sirinathsinghji, E., Kahlon, S., Pfister, E.L., et al. (2014). HTT-lowering reverses Huntington's disease immune dysfunction caused by NFκB pathway dysregulation. *Brain* *137*, 819–833.
- Träger, U., Andre, R., Magnusson-Lind, A., Miller, J.R.C., Connolly, C., Weiss, A., Grueninger, S., Silajdžić, E., Smith, D.L., Leavitt, B.R., et al. (2015). Characterisation of immune cell function in fragment and full-length Huntington's disease mouse models. *Neurobiol. Dis.* *73*, 388–398.
- Tsai, Y.C., Fishman, P.S., Thakor, N. V, and Oyler, G. a (2003). Parkin facilitates the elimination of expanded polyglutamine proteins and leads to preservation of proteasome function. *J. Biol. Chem.* *278*, 22044–22055.
- Valekova, I., Kupcova Skalnikova, H., Jarkovska, K., Motlik, J., and Kovarova, H. (2014). Multiplex Immunoassays for Quantification of Cytokines, Growth Factors, and Other Proteins in Stem Cell Communication. *Methods Mol. Biol.* *1212*.
- Valekova, I., Jarkovska, K., Kotrcova, E., Bucci, J., Ellederova, Z., Juhas, S., Motlik, J., Gadher, S.J., and Kovarova, H. (2016). Revelation of the IFNα, IL-10, IL-8 and IL-1β as promising biomarkers reflecting immuno-pathological mechanisms in porcine Huntington's disease model. *J. Neuroimmunol.* *293*, 71–81.
- Velier, J., Kim, M., Schwarz, C., Kim, T.W., Sapp, E., Chase, K., Aronin, N., and Difiglia, M.

- (1998). Wild-Type and Mutant Huntingtins Function in Vesicle Trafficking in the Secretory and Endocytic Pathways. *40*, 34–40.
- Vinther-Jensen, T., Budtz-Jørgensen, E., Simonsen, A.H., Nielsen, J.E., and Hjermand, L.E. (2014). YKL-40 in cerebrospinal fluid in Huntington's disease: A role in pathology or a nonspecific response to inflammation? *Park. Relat. Disord. J.* *20*, 1301–1303.
- Vodicka, P., Smetana, K., Dvoránková, B., Emerick, T., Xu, Y.Z., Ourednik, J., Ourednik, V., and Motlík, J. (2005). The miniature pig as an animal model in biomedical research. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1049*, 161–171.
- Vonsattel, J.P., Myers, R.H., Stevens, T.J., Ferrante, R.J., Bird, E.D., and Richardson, E.P. (1985). Neuropathological classification of Huntington's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *44*, 559–577.
- Walaas, S.I., and Greengard, P. (1984). A Dopamine - and Adenosine Enriched in Dopamine-innervated Regions in the Rat Brain. *J. Neurosci.* *4*, 84–98.
- Wanker, E.E., Rovira, C., Scherzinger, E., Hasenbank, R., Walter, S., Tait, D., Colicelli, J., and Lehrach, H. (1997). HIP-I: A huntingtin interacting protein isolated by the yeast two-hybrid system. *6*.
- Xia, J., Lee, D.H., Taylor, J., Vandelft, M., and Truant, R. (2003). Huntingtin contains a highly conserved nuclear export signal. *Hum. Mol. Genet.* *12*, 1393–1403.
- Yoon, S., Dubeau, L., Young, M. De, Wexler, N.S., and Arnheim, N. (2003). Huntington disease expansion mutations in humans can occur before meiosis is completed. *100*, 8834–8838.
- Zhang, S., Feany, M.B., Saraswati, S., Littleton, J.T., and Perrimon, N. (2009). Inactivation of Drosophila Huntingtin affects long-term adult functioning and the pathogenesis of a Huntington's disease model. *Dis. Model. Mech.* *2*, 247–266.
- Ziegler-heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Derek, N., Leenen, P.J.M., Liu, Y., Macpherson, G., Randolph, G.J., et al. (2010). Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *116*, 5–7.
- Zuccato, C., Liber, D., Ramos, C., Tarditi, A., Rigamonti, D., Tartari, M., Valenza, M., and Cattaneo, E. (2005). Progressive loss of BDNF in a mouse model of Huntington's disease and rescue by BDNF delivery. *52*, 133–139.
- Zuccato, C., Valenza, M., and Cattaneo, E. (2010). Molecular Mechanisms and Potential Therapeutical Targets in Huntington's Disease. *Physiol. Rev.* *90*, 905–981.
- Zwilling, D., Huang, S., Sathyaikumar, K. V, Francesca, M., Guidetti, P., Wu, H., Lee, J., Truong, J., Andrews, Y., Hsieh, E.W., et al. (2012). Kynurenine 3-monooxygenase inhibition in blood ameliorates neurodegeneration. *145*, 863–874.