

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie



Bc. Eva Kotrčová

Vliv změněné funkce autofagosomů na patofyziologii
Huntingtonovy choroby

Role of modified autophagosomal function in patophysiology
of Huntington's disease

Diplomová práce

Školitel: prof. MVDr. Jan Motlík, DrSc.

Praha 2013

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:

Podpis:

Poděkování:

Touto cestou bych chtěla poděkovat svému školiteli, prof. MVDr. Janu Motlíkovi, DrSc., za poskytnutí možnosti vypracovat tuto práci na Ústavu živočišné fyziologie a genetiky v jeho laboratoři. Další dík patří RNDr. Ritě Hrabákové, PhD., Mgr. Karle Jarkovské, PhD., a celému dalšímu kolektivu laboratoře, za jejich trpělivost a dobré rady. V neposlední řadě patří dík i mé rodině, která mi poskytla zázemí a podporu, bez které bych celé své studium jen stěží absolvovala.

Abstrakt

Huntingtonova choroba, neurodegenerativní autozomálně dominantně děděné onemocnění, působí na buňku hned několika toxickými mechanismy. Jedním z nich je hromadění proteinových agregátů v cytoplazmě buňky, což může být problém zejména pro dlouhožijící buňky, jako jsou neurony.

Autofagie (konkrétně makroautofagie) je důležitou katabolickou drahou, která má zásadní význam pro přežití buňky. Pokud by byla autofagie plně funkční, měla by proteinové agregáty eliminovat a tím snižovat toxický dopad nemoci na buňku. Ze studií této problematiky ovšem vyplývá, že se v autofagické dráze objevují defekty, zřejmě při pohlcování cytoplazmatického obsahu autofagosomem.

V této práci jsem využila transgenní prasečí model Huntingtonovy choroby pro ověření hypotézy chybného fungování autofagické dráhy u jedinců trpících touto chorobou. Na mesenchymálních kmenových buňkách jsem prostřednictvím sledování markerových proteinů LC3 a p62 testovala reakci autofagie na různé způsoby umělé stimulace, přičemž se ošetření buněk chloridem amonným prokázalo jako nejefektivnější. Dále jsem na několika různě starých skupinách prasat sledovala vliv věku na funkci autofagie, zde se však neprojeví žádné signifikantní změny a to ani s ohledem na genotyp testovaných zvířat.

Měla jsem možnost sledovat hladiny proteinů i na tkáních několika částí mozku, konkrétně mozkové kůře, mozečku a striatu. Ačkoli se neprokázaly signifikantní rozdíly, je patrný jistý trend nárůstu proteinu p62 i autofagosomální formy proteinu LC3 v mozečku a zejména striatu u transgenních zvířat, což by mohlo znamenat, že ke změnám dochází, nicméně pouze pomalu a plně se projeví až u starších zvířat.

Klíčová slova: Huntingtonova choroba, makroautofagie, LC3, p62

Abstract

Huntington's disease, an autosomal dominant neurodegenerative disease, affects the cell in several toxic ways. One of them is accumulation of protein aggregates in cytoplasm, which could become a serious problem especially for long-lived cells such as neurons.

Autophagy (macroautophagy) is an important catabolic pathway, crucial for cell survival. If fully functional, it should eliminate protein aggregates and reduce the toxic effect on the cell. However, recent works show that this pathway might be defective, most probably in the cytoplasmic cargo recognition.

In my work I used a transgenic miniature pig model of Huntington's disease to verify the hypothesis of autophagical dysfunction in individuals suffering from Huntington's disease. I studied levels of autophagosomal markers – LC3 and p62 in mesenchymal stem cells after different autophagy stimulation treatments, and ammonium chloride was found the most effective. In addition I evaluated the effect of age of the animals on autophagic function, but no significant changes were identified, even if animal genotype was considered.

Moreover I had an opportunity to study proteins levels in three porcine brain tissues – cortex, cerebellum and striatum. Even though there is no significant difference, we can observe a trend of LC3 II and p62 increase in cerebellum and striatum. This leads us to the idea of changes in autophagosomal pathway occurring only slowly and that they will manifest in older animals.

Keywords: Huntington's disease, macroautophagy, LC3, p62

Obsah

Abstrakt	4
Abstract	5
Obsah.....	6
Seznam zkratek.....	8
1. Úvod	11
2. Literární přehled	13
Huntingtonova choroba	13
Výskyt, struktura a funkce huntingtinu	13
Projevy Huntingtonovy choroby	15
Modely Huntingtonovy choroby	16
Autofagie	22
Typy autofagie.....	22
Vznik autofagosomu.....	25
Makroautofagie a Huntingtonova choroba.....	29
Cíle práce.....	31
3. Materiál a metody	32
Materiál a chemikálie	32
Kultivace buněk.....	32
Příprava vzorků	32
Western blot	32
Experimentální zvířata	33
Metody.....	35
Odběr a kultivace mezenchymálních kmenových buněk	35
Odběr mozkových tkání	36
Příprava vzorků	37

Western blot a vyhodnocení výsledků.....	38
4. Výsledky.....	41
Detekce endogenního a mutovaného huntingtinu u dále využívaných vzorků	41
Experiment založený na mezenchymálních kmenových buňkách	42
Analýza mozkových tkání	46
5. Diskuze	49
6. Závěr.....	54
7. Zdroje	55

Seznam zkratek

3MA	3-methyladenin
AGERA	z angl. agarose gel electrophoresis for resolving aggregates
Alfy	z angl. autophagy-linked FYVE protein
ATG	z angl. autophagy-related
Barkor	z angl. beclin 1- associated ATG key regulator
BDNF	z angl. brain-derived neurotropic factor
CAG	cytosin – adenin – guanin, aminokyselinová sekvence
CNS	centrální nervová soustava
Deptor	z angl. DEP domain-containing mTOR-interacting protein
DRAM	z angl. Damage-regulated autophagy modulator
EDTA	kyselinaethylendiamintetraoctová (z angl. ethylenediaminetetraacetic acid)
ER	endoplazmatické retikulum
ESCRT	z angl. endosomal sorting complex required for transport
FBS	fetální bovinní sérum
FIP200	z angl. 200-kDa focal adhesion kinase family-interacting protein
FISH	fluorescenční in situ hybridizace
GA	Golgiho aparát
HD	Huntingtonova choroba (z angl. Huntington disease)
HEAT	z angl. Huntingtin, Elongator factor 3, the regulatory A subunit of protein phosphatase 2A, and TOR1
Hrs	z angl. hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate
Hsc73	z angl. heat shock cognitive protein, 73 kDa
Htt	huntingtin
IT15	z angl. interesting transcript 15
kDa	kiloDalton
KFERQ	lysin-fenylalanin-kyselina glutamová-arginin-glutamin, aminokyselinová sekvence
LAMP2	z angl. lysosome-associated protein 2

LC3 (MAP1LC3)	z angl. Microtubule-associated protein 1A/1B light chain 3
mLST8	z angl. mammalian lethal with Sec13 protein 8
MR	magnetická rezonance
MSC	mezenchymální kmenové buňky (z angl. mesenchymal stem cells)
mTORC1	z angl. mammalian target of rapamycin komplex 1
mTOR	z angl. mammalian target of rapamycin
NBR1	z angl. neighbor of BRCA1 gene 1
NH ₄ Cl	chlorid amonný
NMDAR	N-methyl D-aspartát receptor
p62	protein 62 kDa
PAS	z angl. pre-autophagosomal structure
PBS	z angl. phosphate buffer saline
PCR	z angl. polymerase chain reaction
PE	z angl. phosphatidylethanolamine
PET	pozitronová emisní tomografie
PI3KC3	z angl. phosphatidylinositol-3-kinase class III
PRAS40	z angl. proline-rich Akt substrate 40 kDa
PVDF	z angl. polyvinylidene difluoride
Raptor	z angl. regulatory-associated protein of mTOR
RE1/NRSE	z angl. repressor element 1/neuron-restrictive silencer element
Rubicon	z angl. RUN domain and cysteine-rich domain containing, Beclin 1-interacting protein
SDS	z angl. sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	z angl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SNARE	z angl. Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors
SQSTM1	Sequestosome 1
TTBS	z angl. Tris- Tween Buffered Saline
ULK1	z angl. unc-51-like kinase-1
ULK2	z angl. unc-51-like kinase-2

UVRAG	z angl. UV irradiation resistance-associated gene
VAMP	z angl. vesicle-associated membrane protein
Vsc	z angl. vacuolar protein sorting complex
WIPI 1/2	z angl. WD-repeat protein Interacting with PhosphoInosides
Wt	z angl. wild-type
YAC	z angl. yeast artificial chromosome

1. Úvod

Huntingtonova choroba (dále HD) je vedle Alzheimerovy choroby a Parkinsonovy nemoci jedním z nejintenzivněji studovaných neurodegenerativních onemocnění. Oproti dalším dvěma zmíněným nemocem je u HD teoreticky větší šance na odhalení možnosti terapie, vzhledem k faktu, že je způsobena mutací v pouze jednom známém genu, který kóduje protein huntingtin. Tento protein se zřejmě účastní mnoha buněčných pochodů a jeho přesná funkce zatím není zcela známa. I přes zmíněné pozitivní předpoklady neexistuje v současnosti žádná vhodná léčba HD, terapie je založena pouze na mírnění projevů onemocnění.

Ve výzkumu vývoje choroby i její možné terapie hrají zcela klíčovou roli modelové organismy. Nejčastěji využívanými jsou hlodavčí modely, především myš a potkan, ale vzhledem k majoritnímu dopadu HD na centrální nervovou soustavu (dále CNS) je patrná snaha využití zvířecích modelů bližších člověku, mezi něž patří makak, ovce a prase. Primáti jsou využíváni zejména mimoevropskými laboratořemi, v Evropě jsou s ohledem na složitou legislativu využívány modely ovčí, případně prasečí.

V rámci své práce jsem se zaměřila na dopad mutovaného huntingtinu na makroautofagii. Ta je dominantní formou autofagie, nezbytnou pro přežití buňky. V nepříznivých podmínkách jsou prostřednictvím této dráhy degradovány buňce vlastní proteiny, které jí zajistí dostatek živin pro její přežití. Za některých patologických stavů, mezi které patří právě Huntingtonova choroba, je stěžejní role této katabolické dráhy v rozkládání částic, které jsou pro buňku toxické – v tomto případě proteinových agregátů. Význam této formy „buněčného úklidu“ navíc roste v buňkách, které se prakticky neobnovují, což jsou právě neurony - buňky nejvíce postižené v průběhu rozvoje HD.

Na transgenním modelu prasete heterozygotního pro lidský mutovaný huntingtin, jsem studovala expresi dvou proteinů významně se podílejících na fungování makroautofagické dráhy a to LC3/MAP1LC3 (z *angl. microtubule-associated protein 1A/1B light chain 3*) a p62/SQSTM1 (protein 62 kDa/Sequestosome 1), celkem ve dvou základních experimentech.

V rámci prvního experimentu jsem na mezenchymálních kmenových buňkách (dále MSC) *in vitro* pozorovala vliv různých typů ošetření, která vedou ke zvýšení intenzity makroautofagie v buňce. Tento experiment měl více cílů, za prvé zhodnotit účinnost jednotlivých ošetření, dále porovnat vliv genotypu na úroveň obou proteinů a v neposlední

řadě posoudit dopad věku zvířat při odběru na funkci autofagické dráhy. Celkem se jednalo o čtrnáct prasat rozdělených do čtyř věkových skupin. Cílem druhého experimentu bylo sledování hladiny těchto proteinů v různých částech mozku šesti zvířat, konkrétně v oblasti striata, mozečku a mozkové kůry. V rámci další práce jsem prokázala přítomnost mutovaného huntingtinu respektive jeho nepřítomnost u transgenních a netransgenních jedinců.

2. Literární přehled

Huntingtonova choroba

Huntingtonova choroba je autozomálně dominantní neurodegenerativní onemocnění, způsobené expanzí CAG tripletů v genu pro huntingtin, nazývaném také IT15. Tento gen se nachází na krátkém raménku chromozomu čtyři v oblasti 16.3 a obsahuje 3142 nukleotidů (http://www.uniprot.org/uniprot/P42858#section_seq), délka se liší v závislosti na počtu CAG repetit. Pokud je počet repetit do 35 včetně, jde o zdravého jedince, při počtu mezi 36 a 39 se choroba projevuje s neúplnou penetrancí – tudíž se nemusí projevit u každého, pokud jde o člověka se čtyřiceti nebo více repeticemi, HD se projeví [1]. Množství tripletů má vliv na nástup choroby, která se běžně projeví mezi 35. a 50. rokem života, při vysokém počtu tripletů (nad 60) se ovšem může rozvinout již v dětství, případně období adolescence, pak je označována jako juvenilní HD [1]. Druhou poměrně vzácnou formou je HD s pozdním počátkem rozvíjející se po 60. roku věku, jde o nejmírnější formu, vzhledem k tomu, že nemoc postupuje relativně pomalu. Doba rozvoje Huntingtonovy choroby je ovšem ovlivněna i environmentálními a jinými genetickými vlivy, a to až z 60% [2, 3].

Nemoc se přenáší z rodičů na potomky, vzácněji dochází k mutacím *de novo*. Touto formou se přenáší nemoc téměř výhradně v paternální linii, z důvodu většího rizika expanze tripletů během spermatogeneze [4]. Nicméně mutační rychlost u tohoto onemocnění je nízká [1].

Výskyt, struktura a funkce huntingtinu

Ačkoli se jedná o intenzivně studované onemocnění, přesná funkce huntingtinu (dále htt) není dosud zcela známa. Důvodem je zřejmě jeho univerzální zapojení do mnoha buněčných procesů. Můžeme jej lokalizovat v oblasti jádra, Golgiho aparátu (dále GA), endoplazmatického retikula (dále ER), mitochondrií, ale hraje roli i v transportu váčků, je asociován s mikrotubulární sítí [5-8]. Pokud se jedná o jednotlivé tkáně je jeho výskyt nejvyšší v neuronech CNS [9].

Struktura huntingtinu

Tento protein obsahuje několik oblastí, které jsou zásadní pro jeho fungování v rámci organismu. První z nich je v N terminální části proteinu prvních 17 aminokyselin. Tato sekvence tvoří doménu interagující s membránami mitochondrií, ale i s ER a GA[10].

Osmnáctou aminokyselinou začíná úsek CAG repetice, neboli polyQ oblast. Její délka je variabilní, na čemž závisí zdravotní stav konkrétního jedince, jak bylo zmíněno výše [1]. Tento úsek je zodpovědný za interakci s mnoha dalšími proteiny, pokud dojde k jeho prodloužení, je narušená jeho přirozená struktura, což vede k abnormálním interakcím [11].

Další významnou součástí huntingtinu jsou HEAT domény (z *angl. Huntingtin, Elongator factor3, the regulatory A subunit of protein phosphatase 2A, and TOR1*), jejichž název vychází ze čtyř významných cytoplazmatických proteinů, jichž jsou součástí. HEAT domény se v proteinu nachází celkem šestnáctkrát. Jsou rozmístěny ve 4 klastrech [12] a jejich role spočívá v umožnění proteinových interakcí.

Dále nalezneme ve struktuře proteinu hned několik štěpných míst spojených se specifickými kaspázami [13, 14], což má velký význam při rozvoji patologického stavu v buňce, viz. dále.

Na C konci se nachází sekvence zajišťující transport z jádra a druhá, se slabší aktivitou, zajišťující transport do jádra. To nasvědčuje tomu, že huntingtin je zapojen v přenosu určitých molekul z jádra do cytoplazmy [15].

Kromě samotné sekvence jsou důležité i posttranslační modifikace. Huntingtin je ubiquitinylován a tím cílen do proteasomu [16], na mnoha místech fosforylován, což jej může stabilizovat v jeho nesestříhané formě [17], ale též sumoylován, což rozhoduje o jeho buněčné lokalizaci [18] a palmytoilován. Tato modifikace zajišťuje jeho správné fungování v rámci regulace transportu váčků [19]. Zajímavou modifikací je i případná acetylace na lysinu 444, která svou přítomností usnadňuje transport huntingtinu do makroautofagosomu [20].

Funkce huntingtinu

Jeho role v embryonálním vývoji je klíčová, což dokládá fakt, že myší embrya s kompletně inaktivovaným huntingtinem umírají ještě před stádiem gastrulace a vývoje CNS [21, 22]. V pozdějších etapách embryogeneze dochází po snížení množství huntingtinu k defektnímu vývoji mozku, další zásadní roli tedy hraje tento protein

v procesu neurogeneze a s ní spojenou kontrolou množství cerebrospinální tekutiny [23, 24]. V průběhu vývinu pravděpodobně není podstatný počet CAG repetice, vzhledem k faktu, že pacienti trpící touto chorobou se až do jejího propuknutí vyvíjí normálně [25].

Dále působí na buňky antiapoptoticky, bráněním aktivace některých kaspáz [26], do značné míry ovlivňuje vezikulární transport [27] a podporuje expresi některých genů, jako je například BDNF (z *angl. brain-derived neurotropic factor*). BDNF je velmi důležitý pro přežití striatálních neuronů a správné fungování synapsí [28, 29].

Vzhledem k širokému spektru jeho působení, není jediným patologickým mechanismem HD vliv mutovaného htt na buňku, ale i snížené množství htt nemutovaného. Tuto hypotézu podporují experimenty s myši, kterým zcela chyběl nemutovaný htt. Mnohé projevy HD u nich byly závažnější, než u jedinců s endogenním htt [30].

Projevy Huntingtonovy choroby

Symptomy nemoci

V raných stádiích nemoci se HD typicky projevuje emocionálními a psychickými změnami jako je agrese případně stavy úzkosti, váhovým úbytkem, změnami v sexuálním chování i narušením spánkového režimu. Za některé z těchto projevů je patrně zodpovědná dysfunkce hypotalamu [31].

S postupující nemocí se zhoršuje schopnost uvažování, zhoršení paměti, dochází k rozvoji demence. Typický pro pozdější stádia je rozvoj chorei – nepravidelných mimovolních pohybů, která přechází do dystonie, přetrvávajících svalových stahů. Pacient postupně ztratí schopnost volných pohybů. Všechny tyto symptomy způsobují nesoběstačnost v pozdějších stádiích choroby [32].

Pomocí neurologických zobrazovacích metod lze odhalit další typický projev HD v rámci CNS, tím je úbytek mozkových neuronů, konkrétně v oblasti striata, v jeho částech putamen a nucleus caudatus [33]. S rozvojem těchto technik lze na základě vyšetření pacienta magnetickou rezonancí posoudit, v jakém stadiu choroby se nachází [34].

Mutovaný huntingtin

Prodloužením oblasti CAG opakování a následnou změnou konformace, ztrácí huntingtin schopnost interagovat s některými svými vazebnými partnery. RE1/NRSE1 (z *angl. repressor element 1/neuron-restrictive silencer element*), který není vyvázan

endogenním htt tlumí expresi genů ovládaných tímto elementem jako je na příklad BDNF [35]. BDNF je navíc ovlivněn i patologickým účinkem, který má mutovaný htt na vezikulární transport, neboť pro své správné fungování musí být BDNF pomocí váčku doručen z mozkové kůry do striata [29].

Za snížení počtu neuronů může být zodpovědná i zvýšená aktivita glutamátových receptorů NMDAR (N-methyl D-aspartát receptor) [36]. Vlivem nich dochází k velkému vstupu vápenatých iontů do buňky a k jejich dalšímu uvolňování ze zásob v ER. Tento patologický stav vyústí v apoptózu buňky [37]. Další toxický vliv na buňku spočívá v přímé interakci mutovaného htt s mitochondriemi. Působí na energetický metabolismus [38] a dochází ke zvyšování oxidativního stresu [39].

Snad nejtypičtějším patologickým vlivem na buňku u HD je tvorba proteinových agregátů. Htt je na specifických místech štěpen pomocí kaspáz a kalpainů, čímž vznikají N-terminální fragmenty, které se vzájemně shlukují [40, 41]. Tyto inkluze jsou patrné jak v jádře, tak v cytoplazmě a jejich množství s postupující nemocí stoupá [42, 43]. Snahu buňky zbavit se agregátů dokládá přítomnost ubiquitinu, chaperonů i podjednotek proteasomu v proteinových inkluzích [44, 45]. Některé práce poukazují na možný pozitivní vliv agregátů na buňku, zejména pak prostřednictvím autofagie, kterou by měla přítomnost inkluzí stimulovat [46, 47].

Modely Huntingtonovy choroby

Pro porozumění mechanismům, jakými choroba na buňku i celý organismus působí, ale i pro vyvíjení terapeutických strategií jsou nezbytné vhodné modely HD. Jejich spektrum je široké, volba vhodného modelu vždy závisí na studované problematice.

V době před objevením genu zodpovědného za rozvoj choroby byly využívány chemické modely – hlodavcům byl do striata injikován neurotoxin, který měl svým působením mimikovat neurodegeneraci typickou pro HD [48]. Od objevení genu pro htt jsou využívány genetické modely. Těmi nejjednoduššími jsou buněčné linie. Na transientních buněčných liniích byla prokázána korelace mezi počtem CAG repetice a množstvím proteinových agregátů [49] a jsou využívány ke studiu regulačních drah [50]. Linie stabilně exprimující htt by se daly rozdělit do dvou skupin, jednou jsou buňky, které exprimují mutovaný htt v normálním množství a druhou buňky, které mutovaný htt overexprimují. Stabilně exprimující linie byly vytvořeny z mnoha typů buněk, jako jsou buňky neuroblastomové [51] nebo feochromocytomové [52]. Jejich nevýhoda však spočívá

v odvození od nádorových linií, což může mnohé regulační procesy v buňce ovlivnit. Ve snaze vyhnout se tomuto problému byla vytvořena například linie ST14A odvozená z buněk striata kryšního embrya [53]. V současnosti je pozornost upřena na možnost využití neurálních indukovaných pluripotentních kmenových buněk, které by byly odvozené z buněk pacientů trpících HD [54].

Mezi mnohobuněčné, nicméně jednodušší, modely patří háďátko obecné (*Caenorhabditis elegans*), nebo octomilka obecná (*Drosophila melanogaster*). Výhoda obou těchto modelů spočívá v nízkých provozních nákladech a zároveň velkém množství potomků, které poskytují. Na modelu háďátka byla prokázána neurodegenerace spjatá s délkou polyglutaminového úseku a věkem jedince [55] a nabízí se i jeho využití pro testování léčiv [56]. Výhodou octomilky je snadné docílení exprese proteinu v konkrétních tkáních, případně v konkrétních fázích vývoje, navíc existuje široké spektrum genetických přístupů, kterými lze s tímto modelovým organismem manipulovat [57]. Dalším vývojově jednodušším modelem je dánío pruhované (*Danio rerio*), jehož výhodou je opět velké množství potomků, levný chov a externí vývoj jedinců [58].

Ačkoli mají tyto jednodušší modelové organismy nesporné výhody, je zřejmé, že jsou člověku velmi evolučně vzdálené. Není možné s jistotou říct, na kolik jsou jejich regulační dráhy tímto faktem poznamenány. To je nejsilnějším argumentem pro snahu o využití modelů, které by byly člověku vývojově co nejbližší.

Myš (rod Mus)

Prvním transgenním myším modelem Huntingtonovy choroby byla linie R6/2 nesoucí 144 CAG tripletů. Vzápětí byla stejnou vědeckou skupinou vygenerována druhá linie R6/1, s délkou repetice o 116 tripletech [59]. Projevují se u nich symptomy typické pro postup HD u lidí, jako je degenerace striata, problémy s učením či přítomnost inkluzí mutovaného huntingtinu v neuronech [60-62]. Vzhledem k velké délce repetitivního úseku, zejména u linie R6/2, je pro ně charakteristický rychlý rozvoj a postup onemocnění, který připomíná spíše juvenilní formu nemoci [63-65]. Z tohoto důvodu se hodí více jako modely pro testování možností terapie, než pro objasňování mechanismů rozvoje HD [66]. Obdobné projevy nemoci byly popsány i na modelu N171 – 82Q, díky nižšímu počtu repetic (82) však manifestuje symptomy později [67].

Dalším krokem v rozvoji myšího modelu bylo připravení kondicionálního modelu, který umožnil pozorovat důsledky vypnutí exprese mutovaného htt. U těchto myší

skutečně docházelo ke zlepšení stavu, pravděpodobně v důsledku vymizení proteinových agregátů v mozkových neuronech [68].

Kromě výše zmíněných modelových linií, které všechny exprimují pouze N-terminální část huntingtinu existují i modely exprimující huntingtin v celé délce, první z nich byl připraven v roce 1998 [69], nebyl však dlouhodobě udržován. Další modelové linie byly připraveny vnesením YAC (z *angl. yeast artificial chromosome*), existuje jich několik, lišících se vzájemně délkou polyQ úseku [70]. O něco později byly připraveny i linie za pomoci vnesení BAC (z *angl. bacterial artificial chromosome*) [71].

Pro minimalizaci možných nepřesností výsledků, které by mohly vzniknout vložením inzertu do některého funkčního genu, byly vygenerovány také knock-in myší linie. Ty jsou utvářeny dvěma různými způsoby. První možností je vložení určitého množství CAG repetice do myšího endogenního genu pro htt, který se nachází na pátém chromozomu [72]. Druhou variantou je pak záměna myšího exonu 1 genu pro htt za lidský, nesoucí patologické množství CAG tripletů [73].

Potkan (Rattus norvegicus)

Výhoda využití potkanů oproti myším spočívá zejména v jejich rozvinutějším a větším mozku, větším spektru dostupných behaviorálních testů i delší délce života, umožňující širší rozvinutí neurodegenerace. Byla ustanovena linie transgenních potkanů, nesoucích 51 CAG opakování. Dochází u nich k procesu neurodegenerace, který odpovídá průběhu HD s počátkem v dospělosti [74].

Makak rhesus (Macaca mulatta)

Pro svou velkou fyziologickou, ale i genetickou podobnost, by měl být primát ideálním modelem pro výzkum HD. Bohužel tomu tak není, zejména kvůli jejich vysoké ceně a velkým chovným nárokům. V neposlední řadě hraje roli i legislativa, která v mnoha zemích práci s těmito zvířaty téměř znemožňuje. Transgenní makak byl připraven v roce 2008 injikací lentivirového vektoru do opičích oocytů. Narození jedinci se vzájemně lišili v délce polyQ oblasti, přičemž zvířata nesoucí více kopií umírala dříve. Z pěti jedinců dva zemřeli první den, třetí zemřel ve věku jednoho měsíce. U zvířat se projevil symptomy typické pro HD u lidí jako je chorea a dystonie, opět v závislosti na počtu tripletů, který nesla. Přítomnost mutovaného htt byla prokázána jak na úrovni DNA, tak na úrovni proteinu [75].

Ovce domácí (Ovis aries L.)

Model transgenní ovce byl vytvořen v Aucklandu, v roce 2007, mikroinjikací kompletního genu pro htt se 73 CAG repeticemi do pronukleu jednobuněčné zygoty [76]. Ovce byla vybrána jako modelový organismus z více důvodů. Jedním z nich je délka života, která může přesahovat deset let, zároveň je vývoj jejich mozku obdobný vývoji mozku lidského, jejich chov je poměrně nenáročný a jejich velikost umožňuje provádění chirurgických zákroků či použití diagnostických metod jako je MR (magnetická rezonance) nebo PET (pozitronová emisní tomografie).

Po injikaci vektorů do zygot se narodilo celkem šest transgenních zvířat, čtyři samci a dvě samice, které založily transgenní linii. Byly odchovány tři generace transgenních ovcí, u nichž se počet glutaminových tripletů nijak výrazně nemění [76]. U tohoto modelu zatím nebyl pozorován HD fenotyp, ale na rozdíl od modelu makaka je stabilní a životaschopný [75].

Liběchovské miniprase (Sus scrofa)

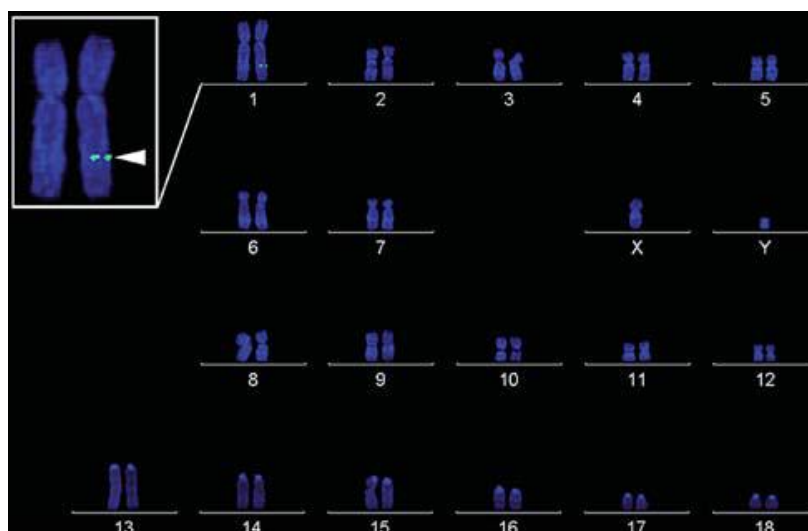
Vlastnosti, které dělají z prasete vhodného kandidáta pro modelování HD, jsou obdobné jako u ovce – je to jeho dostatečná velikost pro využití zobrazovacích metod, délka života umožňující dlouhodobé studie a vysoký stupeň podobnosti mezi lidským a prasečím mozkiem [77]. Navíc mají výhodu ve větším počtu potomků v jednom vrhu, což umožňuje využití příbuzné netransgenní kontroly.

Chov miniprasat byl v Liběchově založen roku 1967 a byla využita na příklad pro výzkum epidermálních kmenových buněk [78]. V roce 2009 byla vytvořena první prasečí embrya, která měla dát vznik zakladatelům linie miniprasat transgenních pro lidský huntingtin. Do prasečích zygot byl injikován vektor HIV1-HD-548aaHTT-145Q nesoucí N-terminální část lidského huntingtinu se 145 CAG/CAA repeticemi. Po dozrání embryí do stadia blastocysty, byla laparoskopicky vložena do vejcovodů náhradních matek. Jedna prasnice z vrhu čítajícího celkem šest selat byla transgenní. Od ní se odvíjí celá linie až po současnou F3 generaci (Obr. 1).



Obr. 1: Vlevo první vrh prasat, která se vyvinula z injikovaných embryí, mezi nimi Adéla, zakládající samice celé linie. Vpravo první vrh F1 generace.

Přítomnost mutovaného htt byla ověřena pomocí PCR (z angl. *Polymerase Chain Reaction*) na vzorcích získaných z kožních štěpů prasat. Všechna transgenní zvířata nesou jednu kopii N-terminální části lidského mutovaného htt. Úsek, který se do prasečího genomu integroval je kratší než původní vektor, má 124 CAG/CAA tripletů. Lokalizace vloženého konstruktu byla objasněna pomocí metody FISH (z angl. *Fluorescence In Situ Hybridization*) (Obr. 2).



Obr. 2: Pomocí metody FISH byl vložený vektor lokalizován na chromozomu 1 v oblasti 1q24-q25 [79].

Expres mutovaného huntingtinu byla prokázána v osmi částech CNS (v motorické části mozkové kůry, hypotalamu, thalamu, mozečku, putamen, nucleus caudatus a v míše). V periferních oblastech těla byla jeho přítomnost potvrzena v tenkém střevě, plicích, játrech, ledvinách, vaječnících a kůži. Malé nebo žádné množství bylo nalezeno ve tkáních žaludku, srdce, sleziny a v kosterním svalu.

V současné době probíhá v laboratoři charakterizace fenotypu tohoto modelu a to jak na buněčné úrovni, tak na úrovni celého organismu. Vývoj i chování F0 – F3 generace jsou srovnatelné s wt sourozenci. U kanců z F1 generace byl pozorován pokles plodnosti od přibližně dvanácti měsíců věku (miniprasata pohlavně dozrávají ve věku zhruba pěti měsíců). Pomocí imunohistochemie, byla prokázána vyšší koncentrace mutovaného htt v šedé hmotě mozkové oproti bílé hmotě. Metody AGERA (z *angl. agarose gel electrophoresis for resolving aggregates*) ani filter radiation ovšem neodhalily v mozcích šestnáctiměsíčních prasat žádné proteinové inkluze [79].

Autofagie

Autofagie je katabolickou buněčnou drahou nutnou pro přežití buňky, její diferenciaci a udržení homeostázy. Má dvě zcela zásadní funkce a to zajistit buňce látky nezbytné pro její přežití a zbavit buňku intracelulárních komponentů, které by mohly představovat potenciální nebezpečí. Na rozdíl od proteasomů, které degradují především proteiny mající v buňce kratší životnost, je autofagie zaměřena spíše na velké proteiny, jejich komplexy a případně i na buněčné organely [80]. Toto rozdělení funkcí je dáno i rozměry proteasomu, jehož možnosti jsou omezeny velikostí vnitřního póru, která nepřesahuje 53 angstromů [81]. Byly popsány tři hlavní formy této dráhy, lišící se mezi sebou způsobem, jakým jsou rozkládané částice určené k degradaci dopraveny do lysosomu. Pokud není specifikováno jinak, obecně se jako autofagie označuje její konkrétní typ – makroautofagie, které je věnována i tato práce. Dalšími typy autofagie jsou autofagie zprostředkovaná chaperony a mikroautofagie (Obr. 3).

Typy autofagie

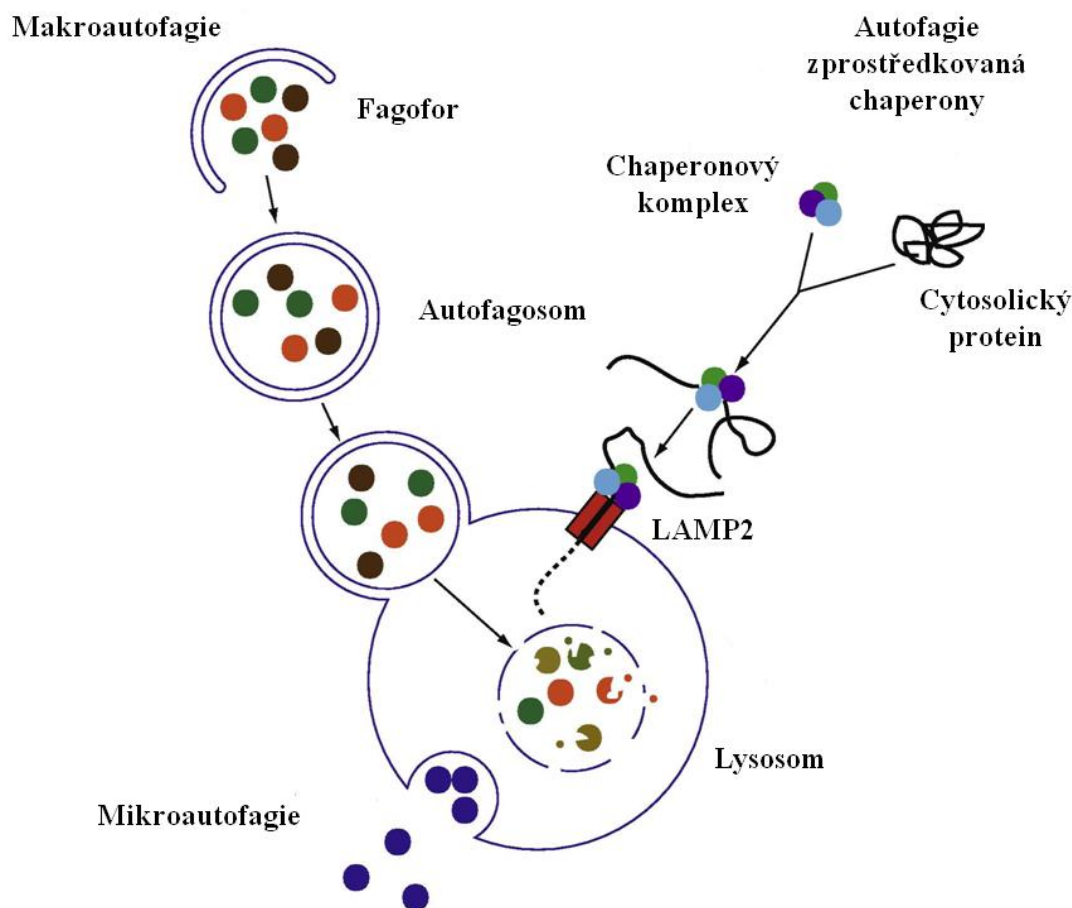
Autofagie zprostředkovaná chaperony

Pro autofagii zprostředkovanou chaperony, je typické, že nevyžaduje tvorbu žádných váčků, specificky degraduje jen proteiny obsahující aminokyselinovou sekvenci KFERQ (lysin – fenylalanin – kyselina glutamová – arginin – glutamin). Ta je rozeznána chaperonovým komplexem obsahujícím Hsc73 (z *angl.heat shock cognate protein*) a za jeho asistence jsou proteiny transportovány přes membránu do lysosomu. Přítomnost chaperonu je důvodem proč se proteiny dostávají do lumen lysosomu v rozbalené formě [82]. Jako receptor na lysosomální membráně slouží protein LAMP2 (z *angl. lysosome-associated protein*) [83].

Stejně jako u makroautofagie je tato dráha maximálně aktivovaná za podmínek pro buňku nepříznivých, jako je například hladovění. Obdobné způsoby regulace jsou důvodem, proč je autofagie zprostředkovaná chaperony do jisté míry schopná kompenzovat makroautofagickou dráhu, v případě její nefunkčnosti, a naopak [84, 85].

Mikroautofagie

Mikroautofagie je podobně jako makroautofagie méně specifická a dalším společným rysem těchto dvou typů je schopnost degradace velkých struktur. Dochází zde k přímému pohlcení části cytoplasmy vchlípením lysosomální membrány [86]. Nicméně o významu mikroautofagie u vyšších eukaryot není mnoho známo.



Obr. 3: Schematické shrnutí jednotlivých typů autofagie. Upraveno podle [87].

Makroautofagie

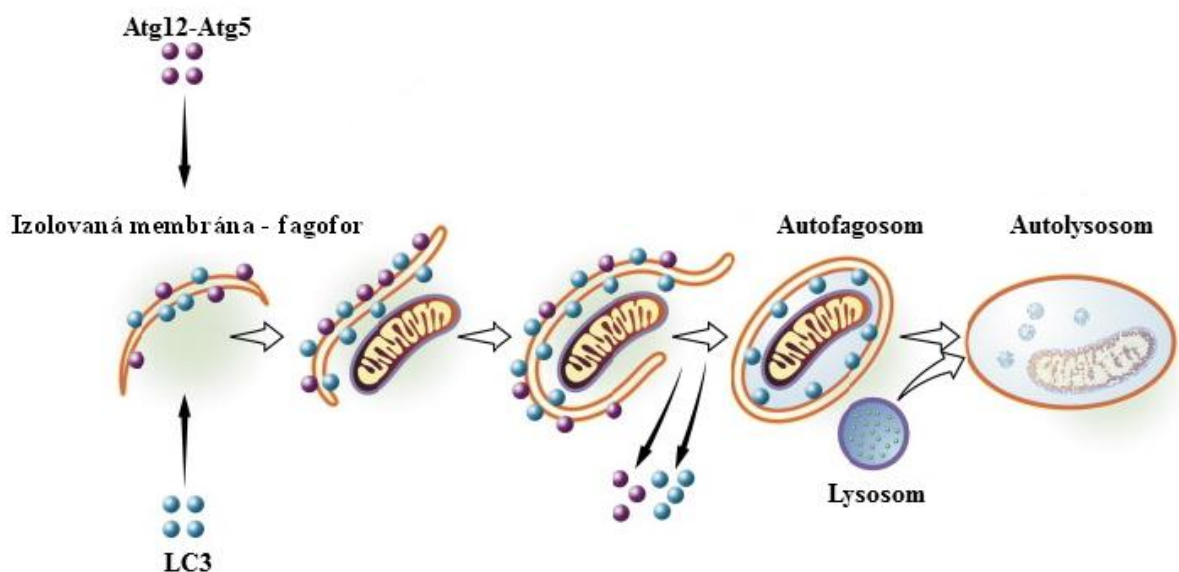
Makroautofagie je posledním a nejrozšířenějším typem, této katabolické dráhy. Specifický je pro ni vznik dvoumembránových váček, autofagosomů, které dopravují obsah určený k degradaci do lysosomu.

Na počátku celého procesu je dvouvrstevná membrána, fagofor. Postupně dochází k prodlužování této membrány, až se uzavře a vytvoří váček, autofagosom, který do svého lumen pohltí okrsek cytoplasmy obsahující organely, proteiny, případně i bakterie či viry. Samotný autofagosom dále splývá s lysosomem za vzniku autolysosomu (Obr. 4). Kyselá

hydrolázy obsažené v lysosomu pak rozloží obsah autofagosomu a jeho vnitřní membránu [88, 89]. Před samotným splnutím autofagosomu s lysosomem může dojít ještě k jednomu mezikroku, pokud autofagosom splyne s endosomem. Tato struktura je označována jako amphisom. Na procesu splývání autofagosomu s lysosomem se významně podílí cytoskelet buňky, konkrétně mikrotubulární síť, která zajišťuje přesun autofagosomu k lysosomu [90, 91]. Detailní popis vzniku autofagosomů, včetně jeho regulace, je obsahem následující kapitoly.

Makroautofagie má hlavní význam především v prvních hodinách stresových podmínek (4-6 hodin), typicky se tato funkce studuje prostřednictvím odnětí séra, čili hladověním buněk. Při prodlužovaném stresu se dostává do popředí autofagie zprostředkovaná chaperony, která dosahuje svého maxima zhruba dvacet hodin po odnětí séra [92].

Ani tato forma není absolutně selektivní, ačkoli se upouští od původního názoru, že by byl obsah autofagosomů zcela náhodný. Jako receptorové proteiny bývají označovány například proteiny p62 (SQSTM1) [93], Alfy [94], nebo NBR1 (z *angl. neighbor of BRCA1 gene 1*) [95].



Obr. 4: Makroautofagická dráha. Důležitou roli při výstavbě fagoforu hraje komplex proteinů Atg12-Atg 5 (z *angl. autophagy-related*) a protein LC3, zajišťují totiž elongaci autofagosomální membrány. Detailně je jejich funkce rozebrána v dalším oddílu. Upraveno podle [96].

Vznik autofagosomu

Vznik autofagosomů, komplexní proces složený z několika dílčích kroků, je shrnut na obrázku 5.

Autofagie je nejhluběji prozkoumána u kvasinek, u kterých bylo identifikováno 18 klíčových Atg genů nezbytných pro tvorbu autofagosomu – k většině z nich existuje i savčí ortolog. Vzhledem k faktu, že je má práce založená na modelu miniaturního prasete budu v jednotlivých krocích uvádět názvy savčích ortologů.

Iniciace tvorby autofagosomu

Na počátku tvorby autofagosomu má zásadní význam komplex 1 složený z proteinů ULK1 a 2, Atg13 a FIP 200. Jedná se o stabilní komplex, jehož dvě kinázy ULK1 a ULK2 interagují s komplexem mTORC1 (z *angl. mammalian target of rapamycin complex 1*), který obsahuje kinázu mTOR (z *angl. mammalian target of rapamycin*). Ta je hlavním inhibitorem autofagie, protože prostřednictvím fosforylace inhibuje obě kinázy ULK1 a ULK2. Pokud je mTOR neaktivní (inhibována je za nepříznivých podmínek), ULK1 a 2 jsou aktivní a fosforylují oba své substráty – Atg13 a FIP 200 [97]. Atg13 je navíc stabilizován prostřednictvím Atg101, který nemá svůj homolog u *Saccharomyces cerevisiae* [98, 99]. U savců není znám konkrétní mechanismus vlivu tohoto komplexu na tvorbu autofagosomu, protože se zde netvoří PAS (z *angl. pre-autophagosomal structure*), jakýsi shluk proteinů dávající základ pro budoucí autofagosom, v němž je angažován u kvasinek. Nicméně v případě narušení tohoto komplexu dochází i k narušení tvorby autofagosomu [100].

Druhým proteinovým komplexem nepostradatelným v této fázi je komplex fosfatidylinositol-3-kinázy III.třídy (PI3KC3). Kromě PI3KC3 obsahuje ještě regulační protein kinázu p150, Beclin 1 a protein Barkor (z *angl. beclin 1-associated ATG key regulator*), který zřejmě zajišťuje lokalizaci proteinu Beclin 1 na autofagofor [101]. Interakce mezi proteiny Beclin1 a PI3KC3 je zajištěna proteinem Ambra1 [102]. Komplex PI3KC3 produkuje fosfatidyinositoltrifosfát (PI3P), který je důležitou součástí autofagosomální membrány a zprostředkovává interakci s proteiny důležitými v následujícím kroku. V současné době vztah obou těchto komplexů zůstává neobjasněn.

Dalšími důležitými proteiny v tomto kroku jsou WIPI 1/2 (z *angl. WD-repeat protein Interacting with PhosphoInositides*), fungující jako lešení pro PI3P [103] a Atg9L1 tvořící platformu pro další proteiny a lipidy.

Elongace autofagosomální membrány

V dalším kroku, kterým je elongace autofagosomální membrány jsou zapojeny dva ubiquitinu-podobné konjugační systémy.

Prvním z nich je komplex Atg12-Atg5-Atg16L. Při jeho tvorbě dochází ke konjugaci proteinů Atg12 a Atg5, poté co je Atg12 aktivován prostřednictvím Atg7, k samotnému propojení dojde prostřednictvím Atg10. Atg7 vystupuje v roli E1 ubiquitin-aktivačního enzymu, zatímco Atg10 má funkci E2 ubiquitin-konjugačního enzymu. Jeho role je zásadní pro lokalizaci a správný průběh konjugačních kroků u proteinu LC3 [104, 105].

Druhý konjugační systém zajišťuje vznik lipidované formy LC3 - LC3 II. Protein LC3 je nejdříve štěpen proteásami z Atg4 rodiny, čímž dochází k odhalení glycinového zbytku na jeho C konci [106]. Na tomto místě je pak připojen k fosfatidylethanolaminu (dále PE), součásti fosfolipidové dvouvrstvy. Připojení opět probíhá v několika dílčích krocích, za účasti více proteinů, Atg7 opět jako E1 ubiquitin-aktivační enzym, Atg3 jako E2 ubiquitin-konjugační enzym a komplex Atg12-Atg5-Atg16L jako E3 ubiquitin-konjugační enzym [107]. LC3 II je hlavním stavebním kamenem autofagosomální membrány, zajišťuje její prodlužování a fúzi [108]. V buňce jsou tedy přítomny dvě formy proteinu LC3 - LC3 I solubilní forma, vyskytující se volně v cytoplasmě a LC3II, forma konjugovaná s autofagosomální membránou.

Po dokončení formace autofosomu komplex Atg12-Atg5-Atg16L opouští membránu, zatímco LC3 II zůstává lokalizován na vnitřní i vnější membráně. To je také důvod, proč je LC3 II využíván jako typický autofagosomální marker.

Vyjma této kanonické dráhy vzniku autofosomů byly prokázány i jiné možnosti jejich tvorby, za účasti Golgiho aparátu a membrán odvozených z endosomů, případně u rakovinných buněk po ošetření resveratrolem [109, 110].

Maturace a degradace autofosomu

V průběhu tohoto posledního kroku se zapojí celá řada regulačních proteinů, ale je závislý i na acidifikaci autofosomálních kompartmentů a mikrotubulární síti.

Důležitými regulátory jsou proteiny Rubicon (z angl. *RUN domain and cysteine-rich domain containing, Beclin 1-interacting protein*) a UVRAG (z angl. *UV irradiation resistance-associated gene*), Rab proteiny, SNARE receptory (z angl. *Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors*), ESCRT (z angl. *endosomal sorting complex required for transport*) komplex, Hrs (z angl. *hepatocyte growth factor-*

regulated tyrosine kinase substrate) protein a protein DRAM-1 (*z angl. Damage-regulated autophagy modulator 1*).

Rubicon a UVRAG ve spolupráci s proteiny PI3KC3 a Beclin 1 zpomalují dozrávání autofagosomu a rychlost endocytózy [111], zatímco Beclin 1 v interakci jen s PI3KC3 a Rubicon naopak tyto procesy urychlují [112].

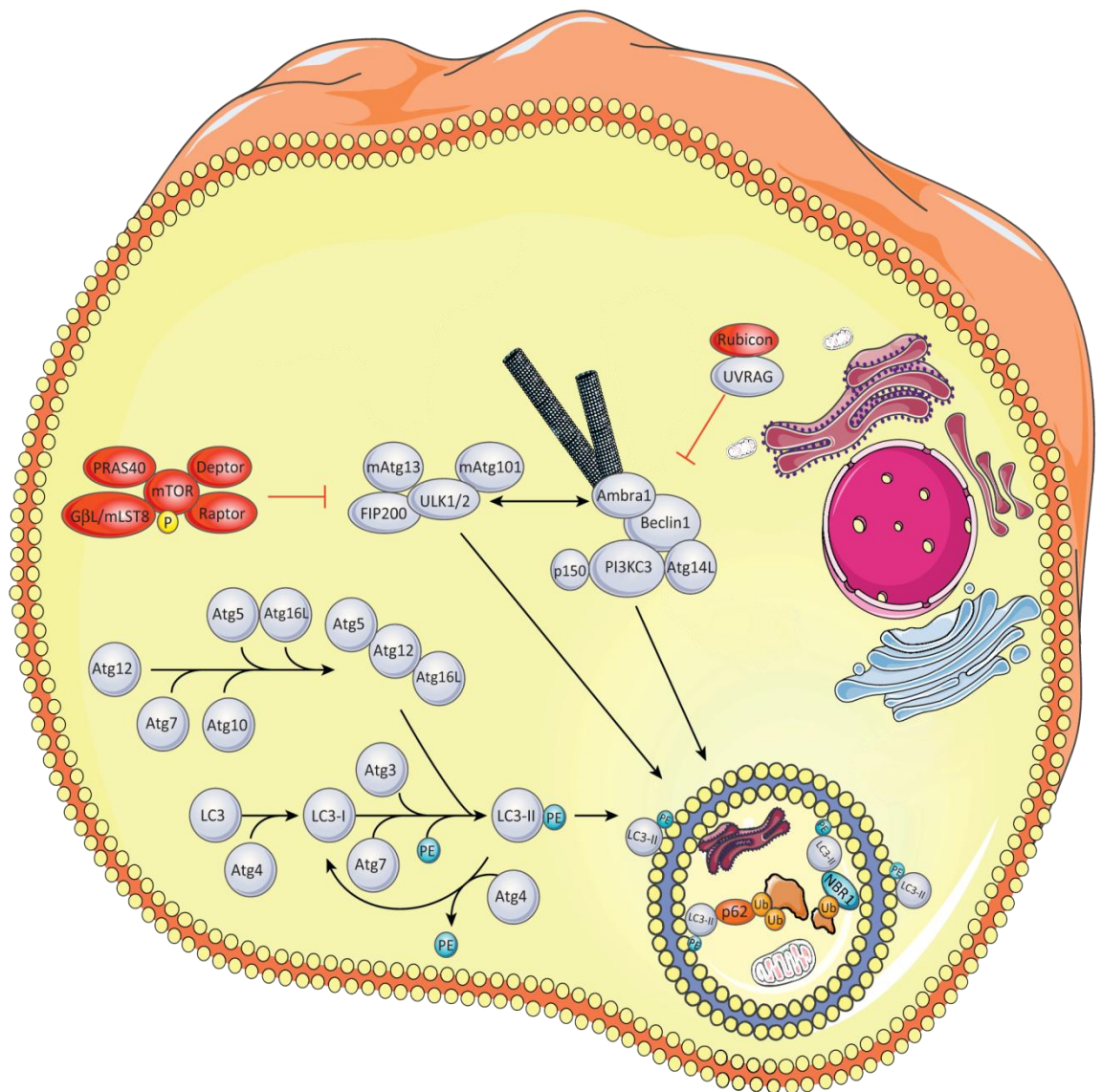
UVRAG interagující s proteinem Rab7 a Vsc (*z angl. vacuolar protein sorting complex*) třídy C, stimuluje fúzi autofagosomu a lysosomu [113]. Fúzi kontrolují také proteiny z rodiny SNARE, konkrétně se jedná o VAMP-3 a VAMP-7 (*z angl. vesicle-associated membrane protein*) [114], a komplex ESCRT III [115].

Hrs protein interaguje s PI3P a usnadňuje maturaci autofagosomů. Protein DRAM-1, který je regulován prostřednictvím p53 a má několik sestřihových variant, má zřejmě vliv na pozdní stádia autofagie, není jasné, jakým konkrétním mechanismem se uplatňuje [116], nicméně autofagii zřejmě ovlivňují konkrétně jeho isoformy 4 a 5 [117].

Za acidifikaci jsou zodpovědné vakuolární ATPasy, které pumpují H⁺ ionty do lumen lysosomu, pH klesá a aktivují se lysosomální enzymy nezbytné pro rozklad jeho obsahu. Pokud jsou zablokovány, k degradaci obsahu nedochází.

Regulace autofagie prostřednictvím mTOR kinázy

Reakce na mnoho signálů, vyvolávajících zvýšenou autofagickou aktivitu, je zprostředkována mTOR kinázou, 289kDa velkým proteinem, zásadním pro proliferaci a růst buněk. Těmito signály může být například hladina glukózy, množství aminokyselin nebo růstových hormonů v buňce [118]. mTOR kinázová dráha zahrnuje dva komplexy mTORC1 a mTORC2, které se mezi sebou liší citlivostí vůči rapamycinu. Komplex mTORC2 je, na rozdíl od mTORC1, rapamycinem zablokovaný až po delším ošetření. U mTORC1 je jeho vliv patrný již po 30 minutách, zatímco u mTORC2 jsou patrné změny po 24 hodinách [119, 120]. Pro autofagickou dráhu je podstatný komplex mTORC1. Obsahuje mTOR kinázu, protein Raptor (*z angl. regulatory-associated protein of mTOR*, PRAS40 (*z angl. proline-rich Akt substrate 40 kDa*), mLST8 (*z angl. mammalian lethal with Sec13 protein 8*) a Deptor (*z angl. DEP domain-containing mTOR-interacting protein*). Autofagie je díky mTORC1 inhibována prostřednictvím fosforylace ULK1 a 2, čímž je zabráněno fungování komplexu 1 [121, 122]. Možnosti umělé stimulace autofagie, mezi něž spadá i ovlivnění mTOR kinázy, jsou uvedeny v tabulce 1.



Obr. 5: Vznik autofagosomu. Za iniciační krok je odpovědný komplex 1 (ULK1 a 2, Atg13, Atg101 a FIP 200) a komplex proteinů okolo PI3KC3, odpovědný za produkci PI3P, součásti autofagosomální membrány. Elongaci autofagosomální membrány zprostředkovává skupiny proteinů Atg a protein LC3, který za pomoci dalších Atg proteinů přechází z volné cytoplazmatické formy do formy konjugované s autofagosomální membránou s připojeným fosfatidylethanolaminem. Na obrázku se nachází i protein p62 a NBR1, jakožto proteiny odpovědné za výběr degradovaných částic. Hlavním regulátorem autofagie je proteinový komplex mTOR, blokující iniciační fázi tvorby autofagosomu, konkrétně pak komplex 1. Upraveno podle [123].

Tab. 1: Způsoby umělé stimulace autofagie

Způsob ošetření	Mechanismus působení	Reference
3-methyladenin (3MA)	působí jako aktivátor pouze za podmínek, kdy má buňka dostatek živin nástup účinku po delší době působení (alespoň 9h) v nedostatku živin naopak autofagii blokuje rozdílné působení vlivem účinku na různé třídy PI3K, které ovlivňují aktivaci mTOR kinázy	[124]
Bafilomycin A ₁	různé účinky s ohledem na délku působení v prvních hodinách zvýšená detekce proteinu LC3 v důsledku nefunkčnosti hydroláz při prodlouženém působení (okolo 12 hodin) blokováno splývání autofagosomů s lysosomy	[125]
Hladovění	největší efekt měl být patrný po 4-6 hodinách výhodou jsou prakticky nulové náklady, buňky jsou inkubovány v médiu bez séra dochází k inhibici mTOR kinázy	[126]
Rapamycin	opět inhibice mTOR kinázy » aktivace autofagie po čtyřech hodinách patrné rozdíly	[46]
Chlorid amonný (NH ₄ Cl)	neutralizace pH lysosomu, snížení aktivity proteáz zvýšení množství autofagosomů po ošetření buněk ukazuje, že v buňkách autofagie běží na bazální úrovni autofagosomy nejsou odstraňovány přes lysosomy	[127]
Thapsigargin	blokáce fúze autofagosomů a lysozomů, čili stejně jako u NH ₄ Cl hromadění autofagosomů, nikoli přímá aktivace tvorby	[128]

Makroautofagie a Huntingtonova choroba

Jak je patrné z předchozích kapitol, má autofagie v Huntingtonově chorobě nezanedbatelnou roli, protože právě jejím prostřednictvím by měly být z buňky odstraňovány proteinové agregáty, které při tomto onemocnění vznikají.

Na striatálních buňkách myšního knock-in HD modelu prokázal kolektiv autorů, že na buněčné úrovni jsou rozdíly mezi wt a knock-in jedinci patrné již velmi brzy, což podporuje fakt, že aktivace autofagické dráhy patří mezi důležité a rané odpovědi buňky [129].

Výzkum provedený na transgenním myším modelu ukázal sníženou hladinu degradace proteinů prostřednictvím makroautofagie, ale zároveň zvýšené množství autofagosomálního markeru, proteinu LC3 II, v buňce. Na základě elektronové mikroskopie a analýzy autofagosomální frakce vytvořili autoři hypotézu, podle které by neměl být u transgenních zvířat problém při tvorbě autofagosomů (hladina LC3 II doložená prostřednictvím western blotů a imunocytochemického barvení je oproti wild-type zvířatům vyšší), ale při samotném plnění autofagosomů, které postrádají typický obsah pozorovatelný u wt jedinců [126].

V tomto případě by mohl hrát velmi důležitou roli protein p62, který je běžně nacházen jako součást proteinových agregátů v buňce, a navíc rozeznává protein LC3 II, součást autofagosomální membrány [130, 131]. Jeho exprese je zvýšená v buňkách, které obsahují polyglutaminové inkluze, měl by mít pro buňku protektivní funkci [132].

Cíle práce

Ve své práci se zabývám autofagií na modelu liběchovského miniprasete, nesoucím N-terminální část lidského mutovaného huntingtinu. Pro ověření fungování této dráhy jsem zvolila analýzu hladiny dvou pro autofagii zásadních proteinů a to LC3 a p62.

Cíle práce jsme stanovili takto:

Porovnat vliv *in vitro* ošetření (rapamycin, NH₄Cl) na autofagickou dráhu.

Srovnat funkci autofagosomální dráhy u wt a tg jedinců

Vyhodnotit souvislost autofagosomální dysfunkce a rozvoje onemocnění

Srovnat hladiny obou proteinů u různých mozkových tkání

3. Materiál a metody

Materiál a chemikálie

Kultivace buněk

KCl, KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , gentamycin, EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová), trypsin, rapamycin, NH_4Cl (vše Sigma Aldrich); FBS (fetální bovinní sérum) (GE Healthcare, Sigma-Aldrich); NaCl (Carl Roth); Heparin forte (Zentiva); Ficoll-Paque PLUS (STEMCELL Technologies); kultivační médium Minimum Essential Medium - Alpha Medium (Gibco)

Příprava vzorků

urea, thiourea, NP-40 (Nonidet P-40), TCEP [tris(2-carboxyethyl)phosphine] (vše Sigma Aldrich); inhibitory proteáz, inhibitory fosfatáz (vše Roche); Pierce 660nm Protein Assay (Thermo Scientific); NuPAGE® LDS Sample Buffer 4×, NuPAGE® Reducing Agent 10× (vše Life Technologies); CHAPS [3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate hydrate] (Carl Roth)

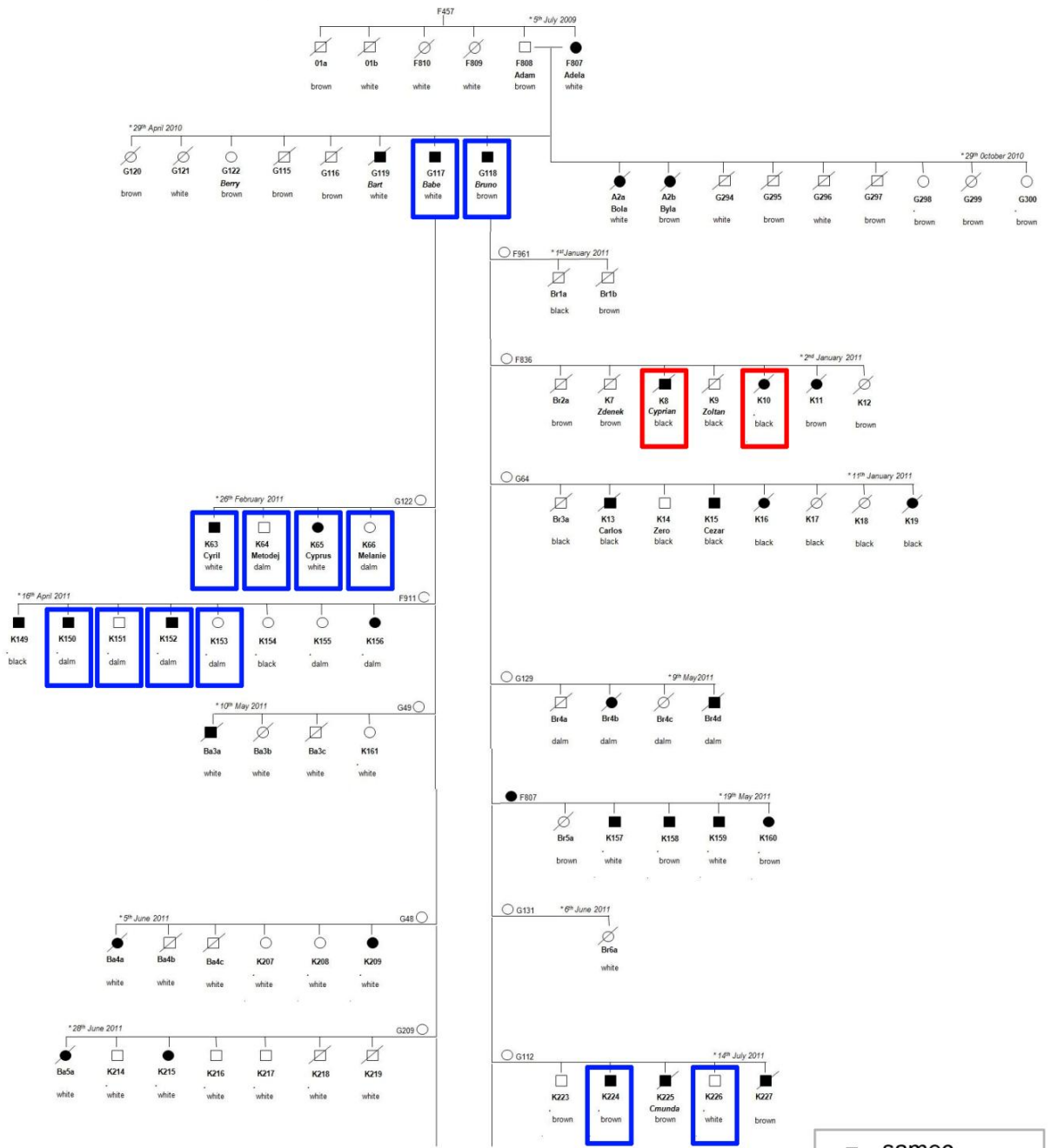
Western blot

3–8% gradientové gely NuPAGE® Novex Tris-Acetate, NuPAGE® Novex 4-12% Bis-Tris Gel, NuPAGE® Tris-Acetate SDS Running Buffer, NuPAGE® MES SDS Running Buffer, NuPAGE® Antioxidant, iBlot® Transfer Stack PVDF, iBlot® Transfer Stack Nitrocellulose (vše Life Technologies); Tris-HCl, glycin (Carl Roth); SDS (dodecylsulfát sodný), NaCl, Tween 20 (polyoxyethylensorbitan monolaurát) (vše Sigma-Aldrich); metanol (Lachner); netučné mléko; primární a sekundární protilátky (tabulky 4 a 5); Luminata Crescendo Western HRP substrate (Merck Millipore); fotografický film CL-Xposure (Thermo Scientific)

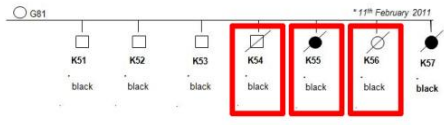
Experimentální zvířata

K veškerým experimentům jsem používala model liběchovského miniprasete. Seznamy prasat použitých pro jednotlivé experimenty, včetně jejich charakterizace jsou uvedeny v tabulkách 2 a 3. U transgenních jedinců byla prokázána přítomnost mutovaného htt (vložený konstrukt s N-terminální částí lidského htt) i htt endogenního (prasečího). Všechna použitá zvířata, mimo nepříbuzných kontrol, jsou vyznačena v následujícím rodokmenu (obr. 6).

A Přírozená plemnitba



B Endoskopický transfer



- samec
- samice
- wild-type
- transgen
- ☒ po smrti
- ▭ MSC
- ▭ mozková tkáň

Obr. 6: Rodokmen s vyznačenými jedinci použitými pro experimenty.

Metody

Odběr a kultivace mezenchymálních kmenových buněk

Odběr byl prováděn u prasete v celkové anestezii z křídla kyčelní kosti pomocí bioptické jehly. Ve sterilním prostředí laminárního boxu byla kostní dřevina nařezána v poměru 1:1 s roztokem 2 % FBS v PBS s heparinem a navrstvena na separační roztok Ficoll-Paque Plus (hustota 1,077 g/ml) v poměru 4:3. Během centrifugace došlo k rozdělení kostní krve na jednotlivé frakce, přičemž pro izolaci MSC byla využita opalescenční vrstva mononukleárních buněk. Celkový počet buněk a jejich viabilita byla stanovena pomocí přístroje Vi-Cell (Beckman Coulter), přičemž z jedné izolace bylo získáno přibližně 60 milionů jaderných buněk a jejich životnost se pohybovala v rozmezí 95 – 98%. Buňky byly kultivovány po dobu přibližně 3 – 4 týdnů v MEM Alpha mediu obohaceném o 10 % FBS (z angl. *Fetal Bovine Serum*) a 50 mg/ml gentamycin při 37°C/5% CO₂ s výměnou kultivačního média jednou za 3 dny. Buňky byly pasážovány po dosažení 80% konfluency pomocí 0,5% roztoku trypsinu s EDTA (5 minut; 37°C).

Po třetí pasáži byly vystaveny různým ošetřením za účelem stimulace autofagie. První populace buněk byla ošetřena 10mM NH₄Cl po dobu 4 hodin, druhá byla ošetřena 100nM rapamycinem po dobu 6 hodin, třetí NH₄Cl 4 hodiny a rapamycinem 6 hodin a čtvrtá, poslední, buněčná populace byla ponechána jako kontrolní, bez ošetření. Následně byly buňky sklizeny, opět pomocí roztoku trypsinu s EDTA, 3x promyty v PBS a suchá peleta byla okamžitě zmrazena při – 80°C [133].

Tab. 2: Experimentální zvířata využitá pro odběr mezenchymálních kmenových buněk.

Generace	Označení zvířete	Stáří při odběru (měsíce)	Genotyp	Pohlaví
F2	K224	15	tg	♂
	K226		wt	♂
	K150	18	tg	♂
	K151		wt	♂
	K152		tg	♂
	K153		wt	♀
	K63	21	tg	♂
	K64		wt	♂
	K65		tg	♀
	K66		wt	♀
F1	G117	30	tg	♂
	G118		tg	♂
nepříbuzná	G142		wt	♀
	G143		wt	♀

Odběr mozkových tkání

V celkové anestezii byla prasatům (tab. 3) provedena transkardiálně celotělová perfúze ledově vychlazeným roztokem PBS. Následně byl z usmrceného zvířete odebrán mozek a vzorky z jednotlivých jeho částí zmrazeny v tekutém dusíku a uchovány při teplotě – 80 °C, případně ponechány pro okamžité zpracování.

Vzorky čerstvých tkání jsem uložila na led a zahájila jsem jejich další zpracování. Pro každého jedince jsem využívala vzorky tkání kůry mozkové, mozečku a striata.

Tab. 3: Experimentální zvířata využitá pro odběr mozkové tkáně

Generace	Označení zvířete	Stáří při odběru (měsíce)	Genotyp	Pohlaví
F2	K8	24	tg	♂
	K10		tg	♀
	K55		tg	♀
	K56		wt	♀
	K54		wt	♂
nepříbuzná	G363		wt	♀

Příprava vzorků

Mezenchymální kmenové buňky

K ještě zmrzlé peletě zamražených MSC jsem přidala lyzační pufr (7M urea, 2M thiourea, 3% CHAPS, 2% NP-40, 5mM TCEP) s inhibitory fosfatáz a proteáz v množství 50 μ l na jeden milion buněk. Po přidání pufru jsem vzorky zvortexovala, aby došlo k uvolnění pelety ze dna, lýza vzorků probíhala ve 4°C za mírné rotace po dobu 30 minut. Následovala sonikace na ledu po dobu 10 minut a centrifugace po dobu 15 minut, při 4°C a 20 000g (centrifuga Allegra X-22R, Beckman Coulter). Výsledný supernatant jsem použila pro měření obsahu proteinů ve vzorku. Veškeré přípravné práce se vzorky probíhaly na ledu za účelem zabránění degradace proteinů.

Mozkové tkáně

Čerstvě izolované tkáně jsem homogenizovala v lyzačním pufru pomocí homogenizátoru dle Douce. Mozkovou kůru a mozeček jsem homogenizovala osmi tahy homogenizátoru, striatum šesti tahy. Počet tahů závisel na množství vzorku v dané tkáni. Další postup byl totožný s přípravou vzorků u MSC.

Měření obsahu proteinu ve vzorcích

Pro zjištění obsahu proteinu v jednotlivých vzorcích jsem využívala kit Pierce 660nm Protein Assay. Množství proteinu jsem měřila pomocí ELISA readeru (Synergy HT

Microplate Reader, BioTek) a programu Gen 5 verze 1.05 (BioTek). Ke vzorkům jsem následně přidala SDS (z *angl. sodium dodecyl sulphate*) redukující pufr (LDS Sample Buffer, NuPAGE® Reducing Agent) a vzorky zahřála na teplotu 95°C na 5 minut, aby došlo k jejich úplné denaturaci. Výsledná koncentrace vzorků byla 2µg/ml, vzorky byly uchovávány na ledu.

Western blot a vyhodnocení výsledků

Elektroforetická separace proteinů

Na separaci proteinů jsem využívala metodu SDS-PAGE (z *angl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*), při níž jsou proteiny rozdělené na základě jejich molekulové hmotnosti. Pro následnou detekci proteinů LC3, p62 a β-tubulinu jsem používala 4-12% gradientové bis-tris gely (NuPAGE® Novex 4-12% Bis-Tris Gel), pro detekci huntingtinu a β-tubulinu 3-8% gradientové tris acetátové gely (NuPAGE® Novex 3-8% Tris-Acetate Gel). Ukázalo se, že již připravené gradientové gely jsou schopné lépe rozlišit proteiny než gel nalévaný (zejména při rozlišování forem proteinu LC3, kde je velmi malý rozdíl v molekulové hmotnosti).

Vzorky jsem nanášela v množství 5-20 µg, v závislosti na použité protilátce. Nanáška byla optimalizována v závislosti na množství tubulinu, který patří mezi tzv. *housekeeping* proteiny a jeho hladina je v buňkách téměř neměnná. Separace proteinů probíhala za konstantního napětí 125V přibližně 100 minut. Používala jsem vychlazený pufr s přísadkou antioxidantu (NuPAGE® Antioxidant), který slouží k zabránění reoxidace proteinů. V případě 3-8% gelů šlo o pufr NuPAGE® Tris-Acetate SDS Running Buffer, na gely s větší hustotou 4-12% jsem používala pufr NuPAGE® MES SDS Running Buffer.

Přenos a detekce proteinů

Po skončení elektroforézy jsem 3-8% gely inkubovala 10 minut v ekvilibračním pufru (25mM Tris-HCl, 125mM glycin, 0,1% SDS, 20% metanol, pH 8,1–8,4), který měl usnadnit přenos velkých proteinů na membránu. Z těchto gelů jsem pomocí aparatury iBlot (iBlot dry blotting system, Life Technologies) přenášela proteiny na nitrocelulózovou membránu, pro 4-12% gely jsem používala PVDF (z *angl. polyvinylidene difluoride*) membránu. Membránu jsem blokovala po dobu jedné hodiny v 5% mléce v TTBS (z *angl. Tris- Tween Buffered Saline*) (136mM NaCl, 0,0005% Tween, 2M Tris-HCl, pH 7,6), abych předešla nespecifickému navázání protilátky

na oblastech membrány, kde se vzorek nevyskytoval. Po blokaci jsem membrány vložila do blokovacího roztoku s přidanou primární protilátkou, v němž byly inkubovány přes noc při 4°C.

Další den jsem membrány vyjmula, promyla 3x10 minut v TTBS, čímž došlo k odmytí nenavázané protilátky a vložila je do roztoku 5% mléka v TTBS s obsahem druhově specifické sekundární protilátky s konjugovanou křenovou peroxidázou. Po hodinové inkubaci při pokojové teplotě jsem membrány opět promyla 3x10 minut, i zde za účelem odmytí přebytečné protilátky. Následně jsem membrány inkubovala 5 minut s chemiluminiscenčním činidlem (Luminata Crescendo, Merck Millipore), které funguje jako substrát pro křenovou peroxidázu. Tím byl vyvolán světelný signál, který jsem zachytila na fotografický film.

Tab. 4: Přehled použitých primárních protilátek. Ředění vždy v 5% ☉ mléka v TTBS.

Cílový protein	Název protilátky	Výrobce	Katalogové číslo	Ředění	Druh
LC3 (forma I a II)	Anti-LC3B antibody	Sigma - Aldrich	L7543	1:10 000	rabbit
p62	Anti- SQSTM1 / p62 antibody	Abcam	ab91526	1:5 000	rabbit
huntingtin (endogenní i transgenní)	AB1	[9]		1: 1 000	rabbit
β - tubulin	anti-β- tubulin	Sigma-Aldrich	T4026	1:50 000	mouse

Tab. 5: Přehled použitých sekundárních protilátek. Ředění vždy v 5% \odot mléka v TTBS.

Cílový protein	Název protilátky	Výrobce	Katalogové číslo	Ředění	Druh
rabbit IgG	Peroxidase AffiniPure	Jackson ImmunoResearch Inc.	711-035-152	1:10 000	donkey
mouse IgG	Peroxidase AffiniPure	Jackson ImmunoResearch Inc.	715-035-151	1:10 000	donkey

Vyhodnocení výsledků

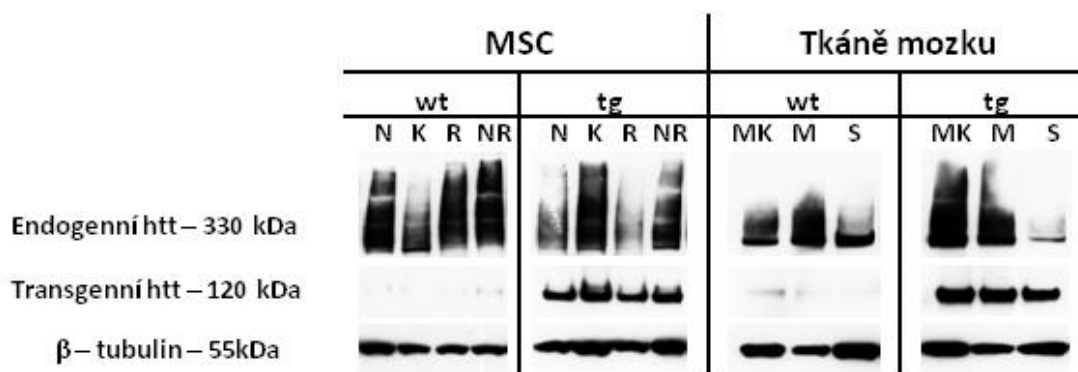
Vyvolané filmy jsem naskenovala na kalibrovaném denzitometru GS-800 (Bio-Rad) a hladiny jednotlivých proteinů jsem stanovovala proměřením optické denzity v softwaru Quantity One 4.6.5. (BioRad). Statistické vyhodnocení proběhlo na základě dvou technických replik, přičemž pro experiment založený na MSC jsem měla k dispozici v rámci každé skupiny dvě biologické repliky daného genotypu. Výjimku tvoří skupina patnáctiměsíčních prasat, kde byla k dispozici jen jedna biologická replika každého genotypu. Pro tkáň mozku jsem měla k dispozici data od tří biologických replik s velmi podobným biologickým pozadím. Až na výjimky se jedná o zvířata ze stejných vrhů, tedy o sourozence, nebo z vrhů velmi blízkých. Navíc by měl být minimalizován vliv prostředí, vzhledem k faktu, že všechna prasata jsou chována za stejných podmínek.

Pro statistické testování jsem využívala software GraphPad Prism. Normalitu dat jsem testovala pomocí Shapiro – Wilkova testu normality, vzhledem k malému objemu dat se jí ale nepodařilo prokázat. Na základě literatury a konzultace se statistikem jsem dál předpokládala normální rozložení dat. K dalšímu testování jsem používala dvouvýběrový studentův t-test a test two-way anova pro testování dvojného třídění. V grafech jsou zobrazeny aritmetické průměry se střední chybou průměru.

4. Výsledky

Detekce endogenního a mutovaného huntingtinu u dále využívaných vzorků

U vzorků MSC i mozkových tkání, které jsem využívala pro další experimenty, jsem ověřila přítomnost respektive nepřítomnost N-terminální části lidského mutovaného huntingtinu. Kromě mutovaného htt u tg jedinců jsem detekovala i přítomnost htt endogenního, a to jak u tg tak i u wt jedinců. Obtížná detekce endogenní formy huntingtinu je pravděpodobně způsobená jeho velkou molekulární hmotností, která může komplikovat jak separaci proteinů v gelu, tak i jejich přenos z gelu na membránu. Reprezentativní ukázkou western blotů wt a tg jedince je obrázek 7.



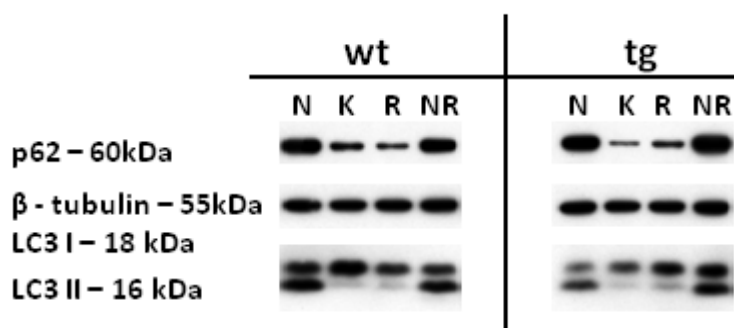
Obr. 7: Reprezentativní obrázek detekce obou forem huntingtinu ve vzorcích MSC a mozkové tkáni. Na přítomnost htt byly testovány všechny dále použité vzorky, zobrazeny jsou vždy vzorky z jednoho tg a jednoho wt jedince pro každý typ vzorku. (MK – mozková kůra, M – mozeček, S – striatum; N – buňky ošetřené chloridem amonným; K – kontrolní, neošetřené buňky; R – buňky ošetřené rapamycinem; NR – buňky ošetřené NH₄Cl i rapamycinem; wt – wild-type jedinci; tg – transgenní jedinci)

Experiment založený na mezenchymálních kmenových buňkách

V rámci tohoto experimentu jsem sledovala hladinu proteinu LC3, který je obecně uznávaný jako autofagosomální marker [134]. Druhým sledovaným proteinem byl p62, který se také používá pro sledování úrovně autofagie, nicméně v našem případě jsme ho vybrali zejména proto, že je označován jako receptor zodpovědný za výběr obsahu autofagosomů [95]. Vzhledem k tomu, že jsme chtěli ověřit hypotézu stanovenou v práci, ze které jsme vycházeli [126], že množství autofagosomů je u populace buněk s HD vyšší, avšak autofagosomy se neplní příslušným obsahem, byla volba sledování receptoru logická.

Mezenchymální kmenové buňky jsme vybrali zejména s ohledem na jejich dostupnost. Získávají se z kostní dřeně, což je zásah do organismu, který nevyžaduje usmrcení zvířete. Experiment byl naplánován pro skupinu čtrnácti zvířat ve věku 15 – 30 měsíců. Ke každému tg jedinci byla k dispozici wt kontrola pro možnost odhalení případného fenotypu. Vzorek každého zvířete jsem zpracovávala ve třech různých ošetřeních (+ kontrolní, neošetřené buňky), která měla zvýraznit případné rozdíly - celkem čtyři vzorky z jednoho jedince.

Sledované proteiny jsem detekovala pomocí western blotu (Obr. 8). Protein LC3 jsem detekovala dle očekávání ve dvou formách ve spodní části gelu - formu LC3 I v oblasti 18kDa, zatímco formu LC3 II v oblasti 16kDa. Forma konjugovaná s autofagosomy LC3 II má sice po připojení PE větší molekulovou hmotnost, nicméně díky své hydrofobicitě putuje gelem rychleji. Protein p62 jsem detekovala v oblasti odpovídající 60 kDa, β -tubulin sloužící jako kontrola množství naneseného proteinu v oblasti 55kDa.



Obr. 8: Reprezentativní obrázek detekce sledovaných proteinů v MSC buňkách. (K – kontrolní, neošetřené buňky; R – buňky ošetřené rapamycinem; N – buňky

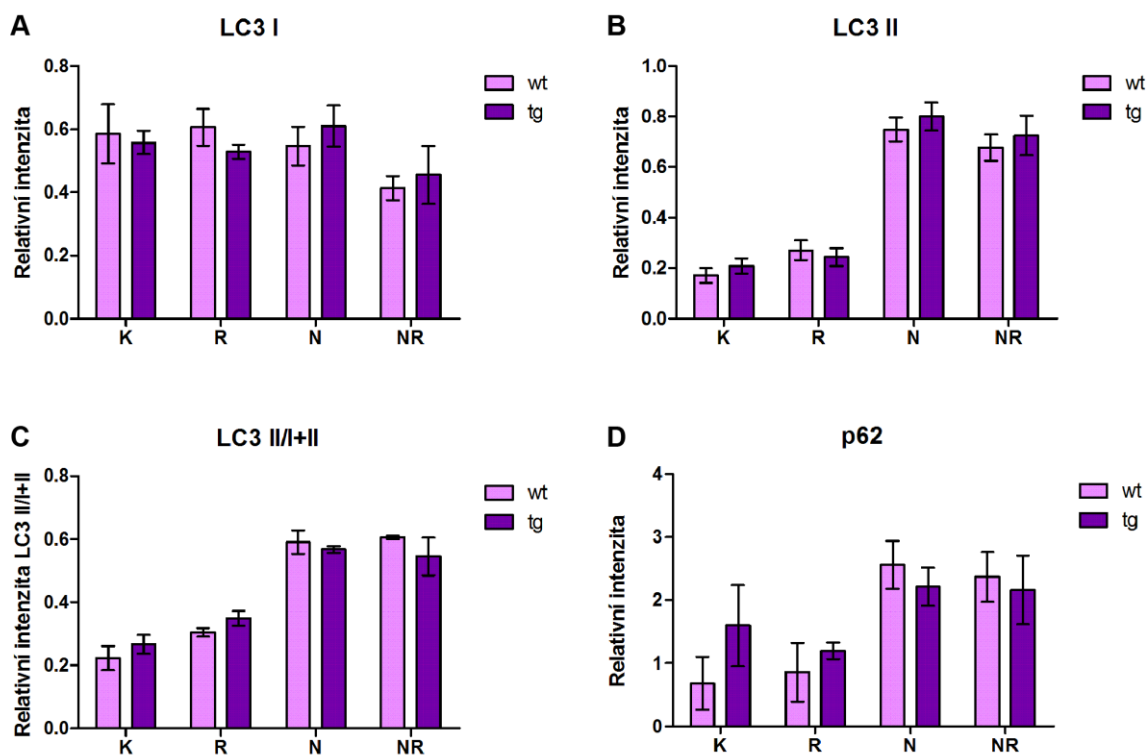
ošetřené chloridem amonným; NR – buňky ošetřené NH₄Cl i rapamycinem; wt – wild-type jedinci; tg – transgenní jedinci)

Nejdříve jsem analyzovala vliv jednotlivých typů ošetření na autofagickou dráhu nezávisle na věku zvířat (Obr. 9). Z grafu A je patrné, že na cytoplazmatickou formu proteinu LC3 I nemá ošetření prakticky žádný vliv – statistické testy neprokázaly vliv ošetření na změnu hladiny proteinu, ani fakt, že se hladina proteinu liší mezi transgenními a wild-type jedinci.

U formy autofagosomální (graf B) jsem na hladině významnosti $P < 0,001$ potvrdila vliv ošetření chloridu amonného i jeho kombinace s rapamycinem oproti kontrolním buňkám, mechanismus vlivu těchto látek na buňku je shrnut v tabulce 1. Samotné ošetření rapamycinem má na buňku vliv minimální, statisticky nevýznamný. Rozdíl mezi transgenními a wild-type zvířaty není statisticky významný.

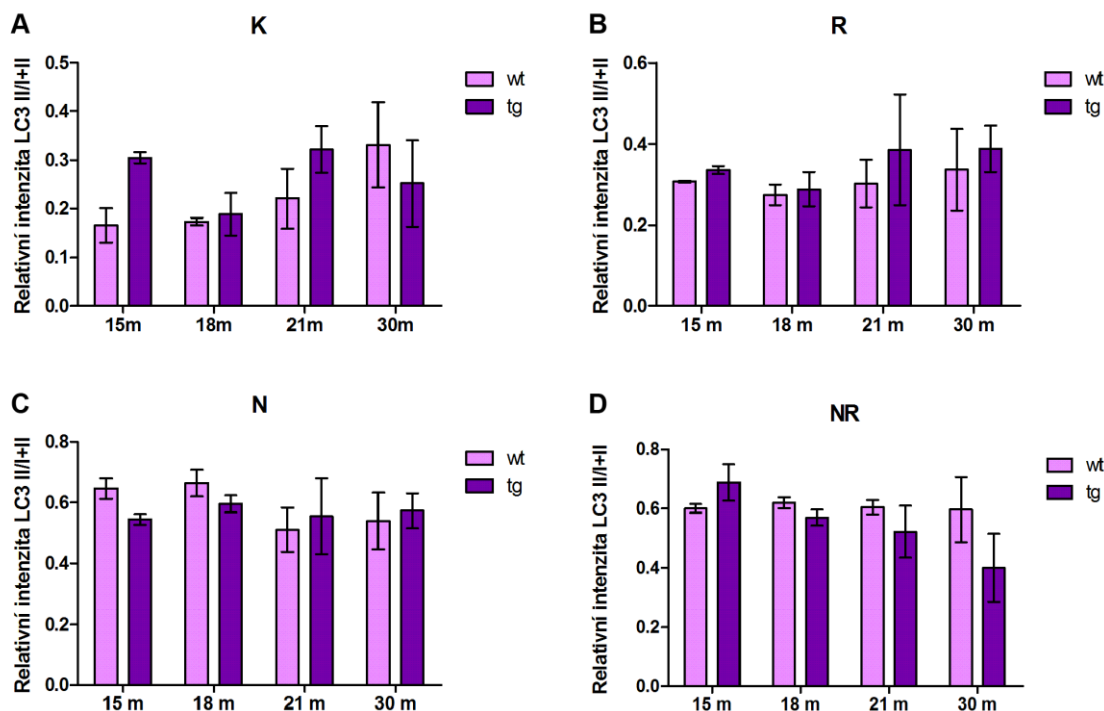
Třetí graf (C) ukazuje vliv ošetření na poměr autofagosomální formy proteinu k celkovému množství proteinu LC3 v buňkách, tedy procentuální zastoupení formy II v buňce. I zde se potvrzuje závěr, který jsem vyvodila z předchozího grafu opět na hladině významnosti $P < 0,001$ jsem prokázala, že ošetření chloridem amonným, případně v kombinaci s rapamycinem má na MSC vliv a to bez ohledu na genotyp, kde se opět neprokázal významný rozdíl.

Statistické hodnocení hladiny proteinu p62 v buňce (graf D) prokázalo statisticky významný vliv ošetření NH₄Cl a NH₄Cl v kombinaci s rapamycinem (hladina významnosti $P < 0,001$) u vzorků wt jedinců, nikoli však u transgenních zvířat. Pro transgenní prasata se vliv žádného ošetření oproti kontrole nejeví statisticky významný. Mezi transgenními a wild-type zvířaty je statisticky významný rozdíl pouze mezi kontrolními populacemi buněk na hladině významnosti $P < 0,05$.



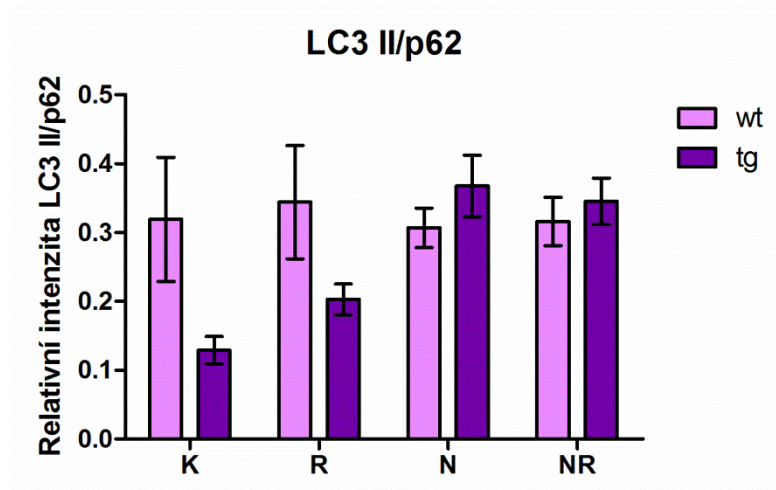
Obr. 9: Vliv ošetření na hladinu proteinů v buňkách nezávisle na věku zvířat: A - hladina proteinu LC3 I, B - hladina proteinu LC3 II, C - poměrná část proteinu LC3 II k celkovému množství LC3 v buňce, D - hladina proteinu p62. (K – kontrolní, neošetřené buňky; R – buňky ošetřené rapamycinem; N – buňky ošetřené chloridem amonným; NR – buňky ošetřené NH₄Cl i rapamycinem; wt – wild-type jedinci; tg – transgenní jedinci)

Následující série grafů (Obr. 10) znázorňuje rozdíl v poměru množství proteinu LC3 II, k celkovému množství proteinu v buňce u wild-type a transgenních jedinců v rámci jednotlivých věkových skupin, opět pro všechna ošetření. Ani u jednoho ošetření jsem nezaznamenala signifikantní změnu v závislosti na věku a genotypu experimentálních zvířat.



Obr. 10: Srovnání poměru formy LC3 II/celkovému množství LC3 v buňce u jednotlivých věkových skupin: A - zvířata ve věku 15 měsíců, B - zvířata ve věku 18 měsíců, C - zvířata ve věku 21 měsíců, D - zvířata ve věku 30 měsíců. (K – kontrolní, neošetřené buňky; R – buňky ošetřené rapamycinem; N – buňky ošetřené chloridem amonným; NR – buňky ošetřené NH₄Cl i rapamycinem; wt – wild-type jedinci; tg – transgenní jedinci)

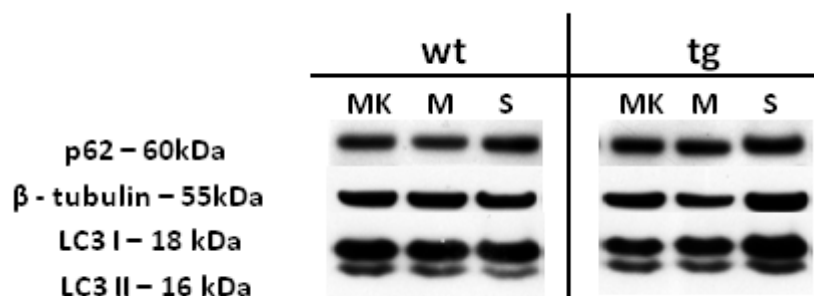
Graf s poměrem LC3 II/p62 (Obr. 11) vypovídá o změnách v hladinách obou proteinů v závislosti na genotypu a ošetření. Zatímco u wt poměr nekolísá, u tg dochází k nárůstu hodnoty po ošetření NH₄Cl a NH₄Cl v kombinaci s rapamycinem oproti kontrole, což jsem prokázala na hladině významnosti $P < 0.01$. Mezi hladinami wt a tg zvířat je signifikantní rozdíl pouze mezi kontrolními buňkami na hladině významnosti $P < 0.05$.



Obr. 11: Poměr množství LC3 II/p62. (K – kontrolní, neošetřené buňky; R – buňky ošetřené rapamycinem; N – buňky ošetřené chloridem amonným; NR – buňky ošetřené NH₄Cl i rapamycinem; wt – wild-type jedinci; tg – transgenní jedinci)

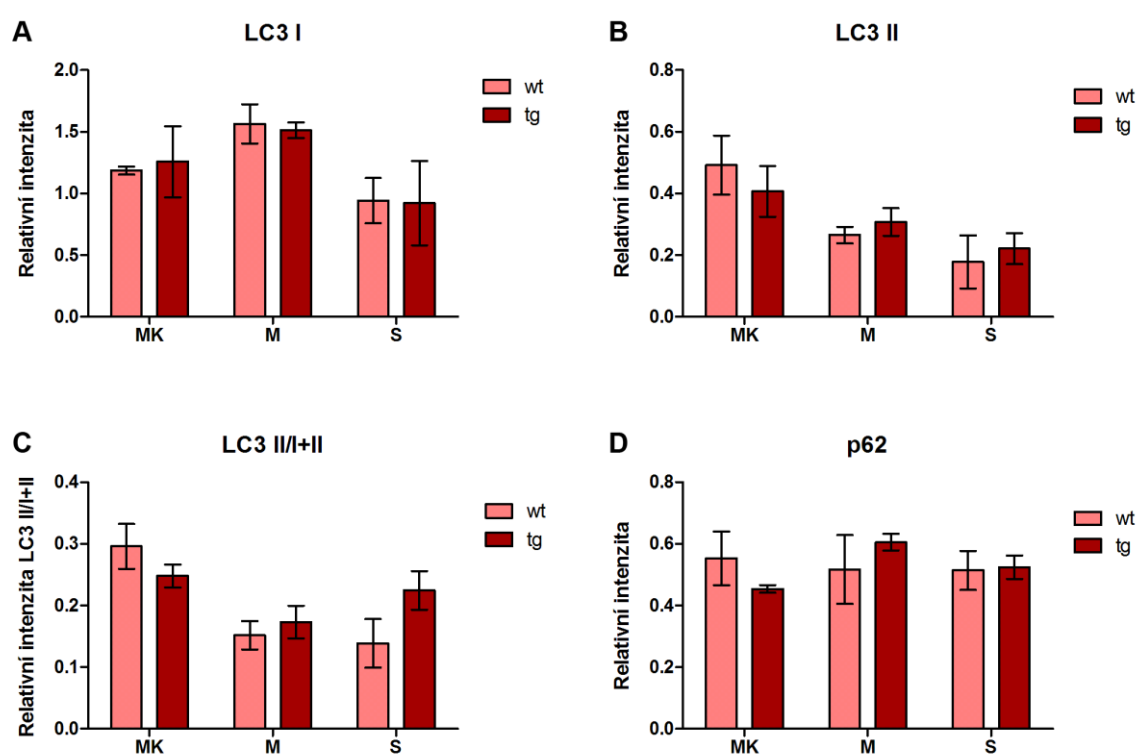
Analýza mozkových tkání

Vzhledem k neurodegenerativnímu charakteru Huntingtonovy choroby, by měl být její dopad patrný zejména v mozkové tkáni. Pro následující experiment jsme měla k dispozici skupinu šesti prasat (tři transgenní a tři wild-type jedinci), kterým byly odebrány vzorky z mozkové kůry, mozečku a striata. Opět jsem sledovala hladiny proteinů LC3 a p62, ve dvou technických replikách. Proteinová nanáška byla u všech vzorků kontrolována pomocí β -tubulinu (Obr. 12).



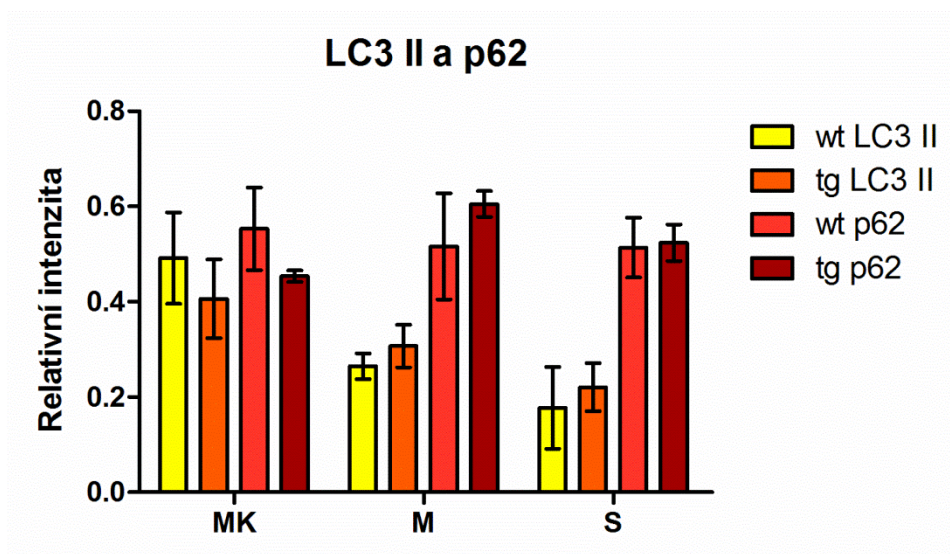
Obr. 12: Reprezentativní obrázek detekce sledovaných proteinů v mozkových tkáních. (MK – mozková kůra, M – mozeček, S – striatum; wt – wild-type jedinci, tg – transgenní jedinci)

Hladina cytoplazmatické formy LC3 I se s ohledem na tkáň, ani na genotyp nemění. Signifikantní změnu jsem neprokázala ani u autofagosomální formy proteinu LC3 II, kde však je pozorovatelný trend nárůstu hladiny v mozečku a striatu, zatímco v mozkové kůře je pozorovatelný trend poklesu u transgenních jedinců. Poměr formy II k celkovému množství proteinu v buňce, pak tento trend ještě zvyrazňuje. Analýza hladiny proteinu p62 neodhalila žádné signifikantní změny, nicméně u mozkové kůry a mozečku hladiny kopírují trend hladin LC3 II (Obr. 13).



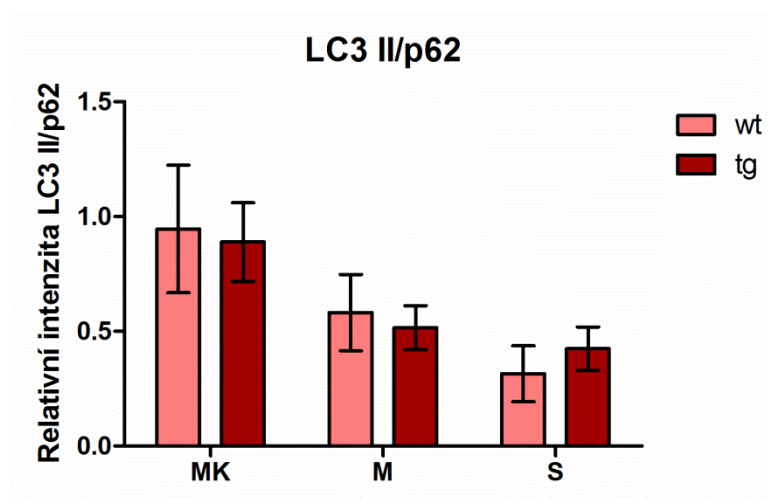
Obr. 13: Hladina proteinů v mozkových tkáních: A - hladina proteinu LC3 I, B - hladina proteinu LC3 II, C - poměrná část proteinu LC3 II k celkovému množství LC3 v buňce, D - hladina proteinu p62 (MK – mozková kůra, M – mozeček, S – striatum; wt – wild-type jedinci, tg – transgenní jedinci)

Srovnání proteinů p62 a LC3 II ukazuje podobné kolísání v hladinách obou proteinů (Obr. 14). Trend nárůstu hladiny v mozečku a striatu oproti mozkové kůře je tedy patrný i u proteinu p62. Statistický test neodhalil žádný signifikantní rozdíl mezi wt a tg vzorky u LC3 II ani u p62.



Obr. 14: Hladiny proteinů LC3 II a p62 v mozkových tkáních. ((MK – mozková kůra, M – mozeček, S – striatum; wt – wild-type jedinci, tg – transgenní jedinci)

Podobně jako u experimentu s MSC jsem hodnotila i relativní poměr proteinů LC3 II a p62 (Obr. 15). Statistický test poměru proteinů LC3 II/p62 v mozkových tkáních neprokázal signifikantní rozdíl mezi wt a tg prasaty, avšak u vzorků striata je patrný mírný trend nárůstu, čili většího množství LC3 II vůči p62 oproti zbylým dvěma mozgovým tkáním.



Obr. 15: Poměr množství LC3 II/p62. ((MK – mozková kůra, M – mozeček, S – striatum; wt – wild-type jedinci, tg – transgenní jedinci)

5. Diskuze

Neurodegenerativní onemocnění jsou středem zájmu mnoha vědeckých skupin po celém světě. Mezi nimi je Huntingtonova choroba jedinečná tím, že její podstata je odhalena již dvacet let [1], ale stále není známo dost o jejích molekulárních principech na to, aby byla vytvořena adekvátní léčba. V současné době je možné pacientům podávat pouze látky na zmírnění projevů nemoci.

S narůstajícím množstvím poznatků o mechanismech, kterými nemoc na buňku působí, narůstá i potřeba vhodného modelu, na kterém by bylo možné testovat případná léčiva. Pozornost je upřena zejména k velkým modelovým organismům, které by umožnily využití diagnostických metod i chirurgických přístupů včetně *in vivo* zobrazovacích technik, použitelných díky komplexitě mozku u větších zvířat, například ovcí a prasat.

V Laboratoři buněčné regenerace a plasticity na Ústavu živočišné fyziologie a genetiky v Liběchově byl vytvořen světově unikátní model miniaturního prasete transgenního pro N-terminální část lidského mutovaného huntingtinu [79]. Nejedná se o první pokus o vytvoření transgenního prasečího modelu Huntingtonovy choroby, ale předchozí snaha čínské skupiny se nesetkala s úspěchem, neboť jejich model se ukázal jako nestabilní a prasata rychle umírala [135]. Na rozdíl od tohoto pokusu je liběchovský model stabilní a u vloženého konstruktu nedochází k detekovatelným změnám již po tři generace. Než by mohl být tento model využitý pro klinické účely, je nezbytná co nejdokonalejší charakterizace. Ta se provádí na mnoha úrovních, někteří jedinci jsou monitorováni pomocí MRI, pozornost je věnována plodnosti kanců, poškození DNA, mitochondriálním dysfunkcím, β -kateninové dráze, ale i autofagii. V neposlední řadě jsou prováděny i behaviorální testy a očekává se projev fyzických příznaků onemocnění.

Autofagie (konkrétněji makroautofagie), je vedle degradace zprostředkované proteasomem druhou zásadní cestou degradace buněčného obsahu. V buňce je kontinuálně aktivní a za nepříznivých podmínek, jako je na příklad nedostatek některých aminokyselin, svou aktivitu ještě navyšuje. V organismu postiženém Huntingtonovou chorobou by autofagie měla mít značně protektivní účinky, měla by totiž předcházet hromadění toxických proteinových agregátů v buňce. Tento předpoklad je ovšem platný pouze v případě, že tato buněčná dráha samotná není chorobou nijak poznamenána. V rámci své práce jsem se snažila zjistit, zda autofagie funguje stejně u transgenních i wild-type jedinců, jestli jsou patrné nějaké rozdíly u různých věkových skupin (čili souvislost

s průběhem rozvoje onemocnění v preklinické fázi), jaké ošetření zvolit, budeme-li chtít autofagii uměle stimulovat u odebraných buněk v kultuře, případně zda jsou nějaké změny patrné na mozkových tkáních prasat ve věku dvou let. Základní idea experimentů vycházela z tvrzení skupiny A. M. Cuevro, že v buňkách myši nesoucích mutovaný huntingtin je vyšší množství autofagosomů oproti myším s wild-type fenotypem. Tyto autofagosomy by ovšem měly postrádat svůj obsah [126]. Pro studování této problematiky jsme zvolili metodu western blot, která by měla objektivně ukázat hladiny sledovaných proteinů, konkrétně LC3 a p62.

V prvním experimentu jsem se věnovala studiu autofagie *in vitro* na mezenchymálních kmenových buňkách, které byly izolované z kostní dřeně odebrané skupině čtrnácti prasat v celkem čtyřech různých věkových skupinách, přičemž buňky každého z nich byly ošetřeny třemi různými způsoby a jeden vzorek byl vždy ponechán jako kontrolní, bez ošetření. Celkem se tedy jednalo o 56 vzorků. První možností ošetření byl rapamycin, jehož účinkem by měla být inhibice mTOR kinázy, negativního regulátoru autofagie [46]. Druhou alternativou bylo ošetření chloridem amonným, který blokuje rozklad autofagosomů v lysosomu, čímž dochází k jejich hromadění v buňce [127]. Třetí možností pak bylo ošetření oběma výše zmíněnými látkami.

Hladina cytoplazmatické formy proteinu LC3 – LC3 I se po ošetření nijak statisticky významně nezměnila, zatímco u autofagosomální formy došlo ke značnému nárůstu po ošetření NH_4Cl , případně NH_4Cl a rapamycinem, což potvrzuje princip působení chloridu amonného - zabránění degradace autofagosomů a jejich akumulaci v buňce. Pro lepší představu o dopadech ošetření na obě formy proteinu jsem zpoměřovala hladinu formy LC3 II vůči celkovému množství proteinu LC3 v buňce. I zde byl patrný nárůst hodnoty, čili poměrného zastoupení formy LC3 II po ošetření NH_4Cl a NH_4Cl s rapamycinem (Obr. 9). Ošetření NH_4Cl se tedy ukázalo jako nejefektivnější, zatímco ošetření samotným rapamycinem nemělo prakticky žádný vliv. Slabý projev účinku mohl být způsoben příliš slabou koncentrací nebo dobou inkubace (100nM, 6 hodin). Vzhledem k tomu, že nikdo z laboratoře neměl se stimulací autofagie zkušenosti nastavovali jsme podmínky experimentu na základě údajů z literatury, kde se mnou zvolená koncentrace rapamycinu běžně používá [120]. Dalším relevantním faktorem by mohl být i původ buněk.

U proteinu p62 jsem s ohledem na ošetření prokázala u wt zvířat prakticky stejné výsledky jako u LC3 II. Tg kontrola ovšem vykazuje vyšší hodnoty (rozdíl oproti wt je

signifikantní), takže ani po ošetření chloridem amonným nedošlo k tak velkým změnám, aby je bylo možné považovat za statisticky významné. Rozdíl mezi wt a tg se po ošetřeních nezměnil, naopak ztratil statistickou významnost. Z toho by se dalo usuzovat, že tg populace buněk nedokázala odpovědět na zvýšenou potřebu p62 jako wt buňka. Tento fakt je ještě více zvýrazněn, pokud je dána do poměru hladina proteinu LC3 II k hladině p62 (Obr. 11). U wt zvířat tento poměr téměř nekolísá, zatímco u tg jsem zaznamenala signifikantní nárůst po ošetření NH_4Cl a NH_4Cl s rapamycinem. To může znamenat, že v buňkách klesá množství p62, nebo se hladina udržuje zhruba na stejné úrovni a narůstá množství LC3 II. Z předchozích grafů usuzuji, že se jedná spíše o druhý případ, tedy nárůst autofagosomální formy při stávajícím množství autofagosomálního receptoru. To by podporovalo hypotézu většího výskytu prázdných autofagosomů [126]. U kontrolních populací buněk jsem prokázala statisticky významný rozdíl, který zřejmě pramení z vysokých hodnot p62 naměřených u kontrolních buněk. S přihlédnutím k datům je ovšem nutné připustit možnost jisté statistické chyby vzhledem k poměrně velkému rozptylu dat u kontrolní skupiny.

Vzorky odebrané z těchto čtrnácti prasat použité pro předchozí analýzy jsem dále rozdělila do skupin podle stáří, v jakém jim byly vzorky kostní dřeně odebírány. Vznikly tak čtyři skupiny: a) prasata stará 15 měsíců, zde se bohužel jednalo pouze o dva jedince, protože u dalších stejně starých zvířat se v danou dobu odběry neprováděly; b) prasata stará 18 měsíců, celkem čtyři zvířata; c) prasata stará 21 měsíců, čtyři zvířata a d) prasata stará 30 měsíců, opět čtyři zvířata. V rámci každé skupiny byli vždy rovným dílem zastoupeni wild-type a transgenní jedinci. Malý počet jedinců je kompenzován tím, že jsou prasata chována ve stejném prostředí a podmínkách, což by mělo minimalizovat variabilitu způsobenou vnějšími vlivy. Genetické vlivy jsou minimalizovány vysokou mírou příbuznosti mezi jednotlivými experimentálními zvířaty.

Statistické vyhodnocení neprokázalo žádný významný rozdíl v hladinách proteinů v závislosti na věku a to ani u transgenních, ani u wild-type prasat u žádného ošetření (Obr. 10). Vzhledem ke složení skupin mají nejvyšší vypovídací hodnotu skupiny o stáří 18 a 21 měsíců – nejen, že jsou tyto skupiny složené pouze se sourozenci, navíc má všech osm prasat stejného otce. Hodnoty u patnáctiměsíční skupiny vykazují velké střední chyby, což může být způsobeno menším množstvím jedinců. Ve skupině 30 měsíců starých prasat jsou jako kontroly použita nepříbuzná prasata, protože k těmto téměř nejstarším zvířatům je pouze jeden žijící sourozenec G122 Berry (Obr. 6). Tato prasnice byla ovšem v době

odběrů po jiném chirurgickém zákroku a nebylo tedy možné získat její vzorky jako kontrolní. Důvodem proč se mezi věkovými skupinami neprojevil žádný rozdíl, může být i relativně nízký věk experimentálních zvířat. HD se u lidí projevuje mezi třicátým a padesátým rokem života, prasata sice nesou inert s množstvím repetit, které by u lidí odpovídalo juvenilní chorobě, ovšem nelze předvídat, jak na něj zareaguje prasečí organismus. Navíc by se mohl vyskytnout i jistý protektivní účinek dvou kopií prasečího endogenního htt, což je významný rozdíl oproti lidským pacientům, kteří mají jednu kopii mutovaného a jednu kopii normálního htt [26, 136, 137].

Ve druhém experimentu jsem se zaměřila na studium hladin proteinů *in vivo*, na vzorcích mozkové tkáně. K dispozici jsem měla skupinu šesti prasat, 3 wild-type a tři transgenní zvířata. Od každého z nich jsem zpracovala vzorky z kůry mozkové, mozečku a striata, tedy oblasti, kde by se měla HD projevovat nejmarkantněji. Mezi wt a tg zvířaty není pozorovatelný signifikantní rozdíl v hladině LC3 I, LC3 II, ani p62 (Obr. 13). U hladiny autofagosomální formy LC3 je ovšem patrný trend nárůstu hladiny proteinu u tg prasat v mozečku a striatu. Pokud je v poměru autofagosomální forma vůči celkovému obsahu LC3 v buňce, je tento trend ještě výraznější – u transgenních zvířat je tedy větší procento proteinu ve formě konjugované s autofagosomální membránou. To nasvědčuje narůstajícímu množství autofagosomů, což lze vysvětlit jako intenzivnější aktivitu makroautofagické dráhy u zvířat nesoucích N-terminální část lidského mutovaného htt. Vložení hodnot hladiny LC3 II a p62 do jednoho grafu ukazuje, že kolísání v hladinách obou proteinů má stejný průběh (Obr. 14). Poměr LC3 II/p62 opět neodhalil žádné signifikantní rozdíly, ale i zde je ve striatu patrný nárůst hodnoty u transgenních jedinců oproti wt (Obr. 15). I zde se, obdobně jako v experimentu založeném na mezenchymálních kmenových buňkách, přikláním k názoru, že nárůst hladiny ve striatu je způsoben zvýšením hladiny LC3 II a tím i počtu autofagosomů, zatímco p62 nekolísá. Absence signifikantních rozdílů je patrně způsobena nedostatečným rozvinutím choroby u studovaných zvířat, která se zatím nachází v preklinickém stadiu onemocnění. Tomu odpovídá i nedávné zjištění, že u myši dochází k velkému nárůstu hladiny proteinu p62 v oblasti striata ve stádiu plně rozvinuté nemoci, zatímco v jejích raných stádiích může docházet i k poklesu [138].

Výsledky analýz proteinů na vzorcích mozků, zejména pak striata, vypadají jako slibná cesta pro sledování počínajících změn v autofagické dráze. Jejich nespornou nevýhodou oproti prvnímu experimentu však je nutnost usmrcení zvířete pro získání

takovýchto vzorků. Vzhledem k tomu, že se Huntingtonova choroba projevuje až v pokročilejším věku, je snaha uchovat co největší množství zvířat a nechat je dosáhnout vyššího věku a tím i klinických projevů onemocnění. Zároveň se zde ukazuje nevýhoda velkých modelových organismů a to limitace počtu zvířat a tím i biologických replik, které je možné zahrnout do experimentu. Z tohoto hlediska je možnost využití mezenchymálních kmenových buněk preferovanou volbou, především díky možnosti opakovaných odběrů u stejných jedinců, což by mohlo vést k mnohem efektivnější tvorbě časové řady s minimalizací biologické variability. Adekvátní výběr ošetření by pak mohl hledaný fenotyp ještě zvýraznit a ulehčit tak jeho identifikaci.

Výhledově bych chtěla v rámci charakterizace patologie autofagosomální dráhy pokračovat ve studování těchto dvou klíčových proteinů, zejména pak na vzorcích mozkové tkáně, v momentě kdy budou další k dispozici. Další využívání MSC bych považovala za velmi efektivní v okamžiku odhalení signifikantních změn na mozkové tkáni, u které předpokládám dřívější projev patologie vzhledem k tomu, že v rámci HD je nejvíce postiženou částí těla. V úvahu připadá i objasňování interakcí mezi studovanými proteiny na příklad pomocí koimunoprecipitace. Charakterizace tohoto modelu je velmi obsáhlou prací, v rámci které jsou podstatné nejen projekty již probíhající (zmíněné v úvodu diskuze), ale i projekty plánované. Velkou měrou by do objasnění postupu choroby mohly přispět také již probíhající behaviorální studie a to především po spojení s jinými experimentálními daty.

6. Závěr

Huntingtonova choroba je závažným neurodegenerativním onemocněním s autozomálně dominantní dědičností. Vzhledem k jejímu projevu mezi třicátým a padesátým rokem života, tedy mnohdy po reprodukčním období, se stále udržuje v populaci a navíc ji stále nedokážeme efektivně léčit, přestože je její podstata známa již dvacet let.

V objasňování vlivů choroby na buňku i následné testování možných léčiv hraje zásadní roli existence vhodného modelu. Ve své práci jsem se zabývala patologií autofagosomální dráhy na modelu miniaturního prasete transgenního pro N-terminální část lidského mutovaného huntingtinu, které bylo vytvořeno na Ústavu živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd v Liběchově.

Sledovala jsem hladinu dvou proteinů, které měly vypovídat o množství autofagosomů a jejich receptorů zodpovědných za výběr nákladu, který bude prostřednictvím autofagosomů degradován. Práce byla rozdělena do dvou stěžejních experimentů, z nichž první byl založen na mezenchymálních kmenových buňkách a druhý na mozkových tkáních miniaturních prasat. Na základě hladin proteinů u MSC jsem jako nejúčinnější látku pro stimulaci autofagie stanovila ošetření chloridem amonným, případně jeho kombinaci s rapamycinem, který ovšem sám o sobě nemá téměř žádný účinek. Vliv věku se u mnou zpracovávaných vzorků nijak signifikantně neprojevil, což může být dáno více faktory včetně biologické variability. Tkáně mozku vykazují zajímavé výsledky, zejména pak ve striatu, kde je patrný jistý trend nárůstu autofagosomální formy proteinu LC3, což prokazuje nárůst počtu autofagosomů a tím i vyšší aktivitu této buněčné dráhy, přičemž hladina receptorového proteinu p62 zůstává nezměněna.

Tato práce je jedním z mnoha projektů, které všechny dohromady usilují o co nejpodrobnější charakterizaci zmíněného modelu. Přestože nebude autofagie hlavním předmětem mého dalšího studia, chtěla bych se tomuto tématu i nadále věnovat.

Porovnání vzorků od stejných jedinců odebraných v různém věku, tedy v různém stadiu rozvoje HD, by bylo tím nejobektivnějším přístupem, který lze zvolit v případě MSC. V případě mozkové tkáně se pak nabízí srovnání s experimentálními zvířaty většího stáří. Na základě takových výsledků bychom mohli potvrdit/vyvrátit domněnku vyplývající z dat použitých v této práci.

7. Zdroje

1. *A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group.* Cell, 1993. **72**(6): p. 971-83.
2. Wexler, N.S., et al., *Venezuelan kindreds reveal that genetic and environmental factors modulate Huntington's disease age of onset.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(10): p. 3498-503.
3. Farrer, L.A., et al., *The normal Huntington disease (HD) allele, or a closely linked gene, influences age at onset of HD.* Am J Hum Genet, 1993. **53**(1): p. 125-30.
4. Pearson, C.E., *Slipping while sleeping? Trinucleotide repeat expansions in germ cells.* Trends Mol Med, 2003. **9**(11): p. 490-5.
5. Hilditch-Maguire, P., et al., *Huntingtin: an iron-regulated protein essential for normal nuclear and perinuclear organelles.* Hum Mol Genet, 2000. **9**(19): p. 2789-97.
6. Hoffner, G., P. Kahlem, and P. Djian, *Perinuclear localization of huntingtin as a consequence of its binding to microtubules through an interaction with beta-tubulin: relevance to Huntington's disease.* J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 5): p. 941-8.
7. Panov, A.V., et al., *Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines.* Nat Neurosci, 2002. **5**(8): p. 731-6.
8. Strehlow, A.N., J.Z. Li, and R.M. Myers, *Wild-type huntingtin participates in protein trafficking between the Golgi and the extracellular space.* Hum Mol Genet, 2007. **16**(4): p. 391-409.
9. DiFiglia, M., et al., *Huntingtin is a cytoplasmic protein associated with vesicles in human and rat brain neurons.* Neuron, 1995. **14**(5): p. 1075-81.
10. Rockabrand, E., et al., *The first 17 amino acids of Huntingtin modulate its sub-cellular localization, aggregation and effects on calcium homeostasis.* Hum Mol Genet, 2007. **16**(1): p. 61-77.

11. Kim, M.W., et al., *Secondary structure of Huntingtin amino-terminal region*. Structure, 2009. **17**(9): p. 1205-12.
12. Tartari, M., et al., *Phylogenetic comparison of huntingtin homologues reveals the appearance of a primitive polyQ in sea urchin*. Mol Biol Evol, 2008. **25**(2): p. 330-8.
13. Wellington, C.L., et al., *Caspase cleavage of mutant huntingtin precedes neurodegeneration in Huntington's disease*. J Neurosci, 2002. **22**(18): p. 7862-72.
14. Wellington, C.L., et al., *Caspase cleavage of gene products associated with triplet expansion disorders generates truncated fragments containing the polyglutamine tract*. J Biol Chem, 1998. **273**(15): p. 9158-67.
15. Xia, J., et al., *Huntingtin contains a highly conserved nuclear export signal*. Hum Mol Genet, 2003. **12**(12): p. 1393-403.
16. Kalchman, M.A., et al., *Huntingtin is ubiquitinated and interacts with a specific ubiquitin-conjugating enzyme*. J Biol Chem, 1996. **271**(32): p. 19385-94.
17. Luo, S., et al., *Cdk5 phosphorylation of huntingtin reduces its cleavage by caspases: implications for mutant huntingtin toxicity*. J Cell Biol, 2005. **169**(4): p. 647-56.
18. Steffan, J.S., et al., *SUMO modification of Huntingtin and Huntington's disease pathology*. Science, 2004. **304**(5667): p. 100-4.
19. Yanai, A., et al., *Palmitoylation of huntingtin by HIP14 is essential for its trafficking and function*. Nat Neurosci, 2006. **9**(6): p. 824-31.
20. Jeong, H., et al., *Acetylation targets mutant huntingtin to autophagosomes for degradation*. Cell, 2009. **137**(1): p. 60-72.
21. Duyao, M.P., et al., *Inactivation of the mouse Huntington's disease gene homolog Hdh*. Science, 1995. **269**(5222): p. 407-10.

22. Nasir, J., et al., *Targeted disruption of the Huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes*. Cell, 1995. **81**(5): p. 811-23.
23. White, J.K., et al., *Huntingtin is required for neurogenesis and is not impaired by the Huntington's disease CAG expansion*. Nat Genet, 1997. **17**(4): p. 404-10.
24. Dietrich, P., et al., *Congenital hydrocephalus associated with abnormal subcommissural organ in mice lacking huntingtin in Wnt1 cell lineages*. Hum Mol Genet, 2009. **18**(1): p. 142-50.
25. Leavitt, B.R., et al., *Wild-type huntingtin reduces the cellular toxicity of mutant huntingtin in vivo*. Am J Hum Genet, 2001. **68**(2): p. 313-24.
26. Rigamonti, D., et al., *Wild-type huntingtin protects from apoptosis upstream of caspase-3*. J Neurosci, 2000. **20**(10): p. 3705-13.
27. Velier, J., et al., *Wild-type and mutant huntingtins function in vesicle trafficking in the secretory and endocytic pathways*. Exp Neurol, 1998. **152**(1): p. 34-40.
28. Zuccato, C., et al., *Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease*. Science, 2001. **293**(5529): p. 493-8.
29. Gauthier, L.R., et al., *Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules*. Cell, 2004. **118**(1): p. 127-38.
30. Van Raamsdonk, J.M., et al., *Loss of wild-type huntingtin influences motor dysfunction and survival in the YAC128 mouse model of Huntington disease*. Hum Mol Genet, 2005. **14**(10): p. 1379-92.
31. Politis, M., et al., *Hypothalamic involvement in Huntington's disease: an in vivo PET study*. Brain, 2008. **131**(Pt 11): p. 2860-9.
32. Conneally, P.M., *Huntington disease: genetics and epidemiology*. Am J Hum Genet, 1984. **36**(3): p. 506-26.

33. Reiner, A., et al., *Differential loss of striatal projection neurons in Huntington disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(15): p. 5733-7.
34. Bohanna, I., et al., *Magnetic resonance imaging as an approach towards identifying neuropathological biomarkers for Huntington's disease*. Brain Res Rev, 2008. **58**(1): p. 209-25.
35. Zuccato, C., et al., *Widespread disruption of repressor element-1 silencing transcription factor/neuron-restrictive silencer factor occupancy at its target genes in Huntington's disease*. J Neurosci, 2007. **27**(26): p. 6972-83.
36. Fan, M.M. and L.A. Raymond, *N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor function and excitotoxicity in Huntington's disease*. Prog Neurobiol, 2007. **81**(5-6): p. 272-93.
37. Tang, T.S., et al., *Disturbed Ca²⁺ signaling and apoptosis of medium spiny neurons in Huntington's disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(7): p. 2602-7.
38. Jenkins, B.G., et al., *Evidence for impairment of energy metabolism in vivo in Huntington's disease using localized 1H NMR spectroscopy*. Neurology, 1993. **43**(12): p. 2689-95.
39. Butterfield, D.A., B.J. Howard, and M.A. LaFontaine, *Brain oxidative stress in animal models of accelerated aging and the age-related neurodegenerative disorders, Alzheimer's disease and Huntington's disease*. Curr Med Chem, 2001. **8**(7): p. 815-28.
40. Gafni, J., et al., *Inhibition of calpain cleavage of huntingtin reduces toxicity: accumulation of calpain/caspase fragments in the nucleus*. J Biol Chem, 2004. **279**(19): p. 20211-20.
41. Graham, R.K., et al., *Cleavage at the caspase-6 site is required for neuronal dysfunction and degeneration due to mutant huntingtin*. Cell, 2006. **125**(6): p. 1179-91.

42. Li, H., et al., *Huntingtin aggregate-associated axonal degeneration is an early pathological event in Huntington's disease mice*. J Neurosci, 2001. **21**(21): p. 8473-81.
43. Yang, W., et al., *Aggregated polyglutamine peptides delivered to nuclei are toxic to mammalian cells*. Hum Mol Genet, 2002. **11**(23): p. 2905-17.
44. Sakahira, H., et al., *Molecular chaperones as modulators of polyglutamine protein aggregation and toxicity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99 Suppl 4**: p. 16412-8.
45. Waelter, S., et al., *Accumulation of mutant huntingtin fragments in aggresome-like inclusion bodies as a result of insufficient protein degradation*. Mol Biol Cell, 2001. **12**(5): p. 1393-407.
46. Ravikumar, B., et al., *Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease*. Nat Genet, 2004. **36**(6): p. 585-95.
47. Ravikumar, B., R. Duden, and D.C. Rubinsztein, *Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy*. Hum Mol Genet, 2002. **11**(9): p. 1107-17.
48. Beal, M.F., et al., *Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid*. Nature, 1986. **321**(6066): p. 168-71.
49. Martindale, D., et al., *Length of huntingtin and its polyglutamine tract influences localization and frequency of intracellular aggregates*. Nat Genet, 1998. **18**(2): p. 150-4.
50. Liu, Y.F., D. Dorow, and J. Marshall, *Activation of MLK2-mediated signaling cascades by polyglutamine-expanded huntingtin*. J Biol Chem, 2000. **275**(25): p. 19035-40.
51. Lunkes, A. and J.L. Mandel, *A cellular model that recapitulates major pathogenic steps of Huntington's disease*. Hum Mol Genet, 1998. **7**(9): p. 1355-61.

52. Li, S.H., et al., *Cellular defects and altered gene expression in PC12 cells stably expressing mutant huntingtin*. J Neurosci, 1999. **19**(13): p. 5159-72.
53. Cattaneo, E., et al., *A short term analysis of the behaviour of conditionally immortalized neuronal progenitors and primary neuroepithelial cells implanted into the fetal rat brain*. Brain Res Dev Brain Res, 1994. **83**(2): p. 197-208.
54. Park, I.H., et al., *Disease-specific induced pluripotent stem cells*. Cell, 2008. **134**(5): p. 877-86.
55. Faber, P.W., et al., *Polyglutamine-mediated dysfunction and apoptotic death of a Caenorhabditis elegans sensory neuron*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(1): p. 179-84.
56. Voisine, C., et al., *Identification of potential therapeutic drugs for huntington's disease using Caenorhabditis elegans*. PLoS One, 2007. **2**(6): p. e504.
57. Marsh, J.L. and L.M. Thompson, *Drosophila in the study of neurodegenerative disease*. Neuron, 2006. **52**(1): p. 169-78.
58. Littleton, R.M. and J.R. Hove, *Zebrafish: a nontraditional model of traditional medicine*. J Ethnopharmacol, 2013. **145**(3): p. 677-85.
59. Mangiarini, L., et al., *Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice*. Cell, 1996. **87**(3): p. 493-506.
60. Morton, A.J., et al., *Progressive formation of inclusions in the striatum and hippocampus of mice transgenic for the human Huntington's disease mutation*. J Neurocytol, 2000. **29**(9): p. 679-702.
61. Davies, S.W., et al., *Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation*. Cell, 1997. **90**(3): p. 537-48.

62. Lione, L.A., et al., *Selective discrimination learning impairments in mice expressing the human Huntington's disease mutation*. J Neurosci, 1999. **19**(23): p. 10428-37.
63. Carter, R.J., et al., *Characterization of progressive motor deficits in mice transgenic for the human Huntington's disease mutation*. J Neurosci, 1999. **19**(8): p. 3248-57.
64. Stack, E.C., et al., *Chronology of behavioral symptoms and neuropathological sequela in R6/2 Huntington's disease transgenic mice*. J Comp Neurol, 2005. **490**(4): p. 354-70.
65. Cha, J.H., et al., *Altered neurotransmitter receptor expression in transgenic mouse models of Huntington's disease*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1999. **354**(1386): p. 981-9.
66. Gil, J.M. and A.C. Rego, *The R6 lines of transgenic mice: a model for screening new therapies for Huntington's disease*. Brain Res Rev, 2009. **59**(2): p. 410-31.
67. Schilling, G., et al., *Intranuclear inclusions and neuritic aggregates in transgenic mice expressing a mutant N-terminal fragment of huntingtin*. Hum Mol Genet, 1999. **8**(3): p. 397-407.
68. Yamamoto, A., J.J. Lucas, and R. Hen, *Reversal of neuropathology and motor dysfunction in a conditional model of Huntington's disease*. Cell, 2000. **101**(1): p. 57-66.
69. Reddy, P.H., et al., *Behavioural abnormalities and selective neuronal loss in HD transgenic mice expressing mutated full-length HD cDNA*. Nat Genet, 1998. **20**(2): p. 198-202.
70. Hodgson, J.G., et al., *A YAC mouse model for Huntington's disease with full-length mutant huntingtin, cytoplasmic toxicity, and selective striatal neurodegeneration*. Neuron, 1999. **23**(1): p. 181-92.

71. Gray, M., et al., *Full-length human mutant huntingtin with a stable polyglutamine repeat can elicit progressive and selective neuropathogenesis in BACHD mice.* J Neurosci, 2008. **28**(24): p. 6182-95.
72. Lin, C.H., et al., *Neurological abnormalities in a knock-in mouse model of Huntington's disease.* Hum Mol Genet, 2001. **10**(2): p. 137-44.
73. Menalled, L.B., et al., *Time course of early motor and neuropathological anomalies in a knock-in mouse model of Huntington's disease with 140 CAG repeats.* J Comp Neurol, 2003. **465**(1): p. 11-26.
74. von Horsten, S., et al., *Transgenic rat model of Huntington's disease.* Hum Mol Genet, 2003. **12**(6): p. 617-24.
75. Yang, S.H., et al., *Towards a transgenic model of Huntington's disease in a non-human primate.* Nature, 2008. **453**(7197): p. 921-4.
76. Jacobsen, J.C., et al., *An ovine transgenic Huntington's disease model.* Hum Mol Genet, 2010. **19**(10): p. 1873-82.
77. Swindle, M.M., et al., *Swine as models in biomedical research and toxicology testing.* Vet Pathol, 2012. **49**(2): p. 344-56.
78. Motlik, J., et al., *Porcine epidermal stem cells as a biomedical model for wound healing and normal/malignant epithelial cell propagation.* Theriogenology, 2007. **67**(1): p. 105-11.
79. Baxa, M., et al., *A Transgenic Minipig Model of Huntington's Disease.* Journal of Huntington's Disease, 2013. **2**(1): p. 47-68.
80. Cuervo, A.M., *Autophagy: in sickness and in health.* Trends Cell Biol, 2004. **14**(2): p. 70-7.
81. Nandi, D., et al., *The ubiquitin-proteasome system.* J Biosci, 2006. **31**(1): p. 137-55.
82. Salvador, N., et al., *Import of a cytosolic protein into lysosomes by chaperone-mediated autophagy depends on its folding state.* J Biol Chem, 2000. **275**(35): p. 27447-56.

83. Cuervo, A.M. and J.F. Dice, *A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes*. Science, 1996. **273**(5274): p. 501-3.
84. Kaushik, S., et al., *Constitutive activation of chaperone-mediated autophagy in cells with impaired macroautophagy*. Mol Biol Cell, 2008. **19**(5): p. 2179-92.
85. Massey, A.C., et al., *Consequences of the selective blockage of chaperone-mediated autophagy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(15): p. 5805-10.
86. Kunz, J.B., H. Schwarz, and A. Mayer, *Determination of four sequential stages during microautophagy in vitro*. J Biol Chem, 2004. **279**(11): p. 9987-96.
87. Lynch-Day, M.A. and D.J. Klionsky, *The Cvt pathway as a model for selective autophagy*. FEBS Lett, 2010. **584**(7): p. 1359-66.
88. Mijaljica, D., M. Prescott, and R.J. Devenish, *The intriguing life of autophagosomes*. Int J Mol Sci, 2012. **13**(3): p. 3618-35.
89. Jing, K. and K. Lim, *Why is autophagy important in human diseases?* Exp Mol Med, 2012. **44**(2): p. 69-72.
90. Kochl, R., et al., *Microtubules facilitate autophagosome formation and fusion of autophagosomes with endosomes*. Traffic, 2006. **7**(2): p. 129-45.
91. Kimura, S., T. Noda, and T. Yoshimori, *Dynein-dependent movement of autophagosomes mediates efficient encounters with lysosomes*. Cell Struct Funct, 2008. **33**(1): p. 109-22.
92. Fuertes, G., et al., *Changes in the proteolytic activities of proteasomes and lysosomes in human fibroblasts produced by serum withdrawal, amino-acid deprivation and confluent conditions*. Biochem J, 2003. **375**(Pt 1): p. 75-86.
93. Pankiv, S., et al., *p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy*. J Biol Chem, 2007. **282**(33): p. 24131-45.

94. Simonsen, A., et al., *Alfy, a novel FYVE-domain-containing protein associated with protein granules and autophagic membranes*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 18): p. 4239-51.
95. Lamark, T., et al., *NBR1 and p62 as cargo receptors for selective autophagy of ubiquitinated targets*. Cell Cycle, 2009. **8**(13): p. 1986-90.
96. Pattingre, S., et al., *Regulation of macroautophagy by mTOR and Beclin 1 complexes*. Biochimie, 2008. **90**(2): p. 313-23.
97. Mehrpour, M., et al., *Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells*. Cell Res, 2010. **20**(7): p. 748-62.
98. Hosokawa, N., et al., *Atg101, a novel mammalian autophagy protein interacting with Atg13*. Autophagy, 2009. **5**(7): p. 973-9.
99. Mercer, C.A., A. Kaliappan, and P.B. Dennis, *A novel, human Atg13 binding protein, Atg101, interacts with ULK1 and is essential for macroautophagy*. Autophagy, 2009. **5**(5): p. 649-62.
100. Hosokawa, N., et al., *Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy*. Mol Biol Cell, 2009. **20**(7): p. 1981-91.
101. Sun, Q., et al., *Identification of Barkor as a mammalian autophagy-specific factor for Beclin 1 and class III phosphatidylinositol 3-kinase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(49): p. 19211-6.
102. Fimia, G.M., et al., *Ambra1 at the crossroad between autophagy and cell death*. Oncogene, 2013. **32**(28): p. 3311-8.
103. Proikas-Cezanne, T., et al., *WIPI-1alpha (WIPI49), a member of the novel 7-bladed WIPI protein family, is aberrantly expressed in human cancer and is linked to starvation-induced autophagy*. Oncogene, 2004. **23**(58): p. 9314-25.
104. Mizushima, N., et al., *Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells*. J Cell Biol, 2001. **152**(4): p. 657-68.

105. Fujita, N., et al., *The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy*. Mol Biol Cell, 2008. **19**(5): p. 2092-100.
106. Tanida, I., T. Ueno, and E. Kominami, *Human light chain 3/MAP1LC3B is cleaved at its carboxyl-terminal Met121 to expose Gly120 for lipidation and targeting to autophagosomal membranes*. J Biol Chem, 2004. **279**(46): p. 47704-10.
107. Tanida, I., T. Ueno, and E. Kominami, *LC3 conjugation system in mammalian autophagy*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(12): p. 2503-18.
108. Nakatogawa, H., Y. Ichimura, and Y. Ohsumi, *Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion*. Cell, 2007. **130**(1): p. 165-78.
109. Scarlatti, F., et al., *Role of non-canonical Beclin 1-independent autophagy in cell death induced by resveratrol in human breast cancer cells*. Cell Death Differ, 2008. **15**(8): p. 1318-29.
110. Nishida, Y., et al., *Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy*. Nature, 2009. **461**(7264): p. 654-8.
111. Liang, C., et al., *Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(7): p. 688-99.
112. Zhong, Y., et al., *Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol-3-kinase complex*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(4): p. 468-76.
113. Liang, C., et al., *Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(7): p. 776-87.
114. Fader, C.M., et al., *TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1793**(12): p. 1901-16.

115. Lee, J.A., et al., *ESCRT-III dysfunction causes autophagosome accumulation and neurodegeneration*. *Curr Biol*, 2007. **17**(18): p. 1561-7.
116. Crichton, D., et al., *DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis*. *Cell*, 2006. **126**(1): p. 121-34.
117. Mah, L.Y., et al., *DRAM-1 encodes multiple isoforms that regulate autophagy*. *Autophagy*, 2012. **8**(1): p. 18-28.
118. Chong, Z.Z., et al., *Mammalian target of rapamycin: hitting the bull's-eye for neurological disorders*. *Oxid Med Cell Longev*, 2010. **3**(6): p. 374-91.
119. Sarbassov, D.D., et al., *Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB*. *Mol Cell*, 2006. **22**(2): p. 159-68.
120. Loewith, R., et al., *Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control*. *Mol Cell*, 2002. **10**(3): p. 457-68.
121. Maiese, K., et al., *mTOR: on target for novel therapeutic strategies in the nervous system*. *Trends Mol Med*, 2013. **19**(1): p. 51-60.
122. Wirth, M., J. Joachim, and S.A. Tooze, *Autophagosome formation-The role of ULK1 and Beclin1-PI3KC3 complexes in setting the stage*. *Semin Cancer Biol*, 2013.
123. Maes, H., et al., *Autophagy: shaping the tumor microenvironment and therapeutic response*. *Trends Mol Med*, 2013. **19**(7): p. 428-46.
124. Wu, Y.T., et al., *Dual role of 3-methyladenine in modulation of autophagy via different temporal patterns of inhibition on class I and III phosphoinositide 3-kinase*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(14): p. 10850-61.
125. Klionsky, D.J., et al., *Does bafilomycin A1 block the fusion of autophagosomes with lysosomes?* *Autophagy*, 2008. **4**(7): p. 849-950.
126. Martinez-Vicente, M., et al., *Cargo recognition failure is responsible for inefficient autophagy in Huntington's disease*. *Nat Neurosci*, 2010. **13**(5): p. 567-76.

127. Qiao, L. and J. Zhang, *Inhibition of lysosomal functions reduces proteasomal activity*. *Neurosci Lett*, 2009. **456**(1): p. 15-9.
128. Ganley, I.G., et al., *Distinct autophagosomal-lysosomal fusion mechanism revealed by thapsigargin-induced autophagy arrest*. *Mol Cell*, 2011. **42**(6): p. 731-43.
129. Heng, M.Y., et al., *Early autophagic response in a novel knock-in model of Huntington disease*. *Hum Mol Genet*, 2010. **19**(19): p. 3702-20.
130. Bjorkoy, G., et al., *p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death*. *J Cell Biol*, 2005. **171**(4): p. 603-14.
131. Ichimura, Y., et al., *Structural basis for sorting mechanism of p62 in selective autophagy*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(33): p. 22847-57.
132. Nagaoka, U., et al., *Increased expression of p62 in expanded polyglutamine-expressing cells and its association with polyglutamine inclusions*. *J Neurochem*, 2004. **91**(1): p. 57-68.
133. Necas, A., et al., *Quality of newly formed cartilaginous tissue in defects of articular surface after transplantation of mesenchymal stem cells in a composite scaffold based on collagen I with chitosan micro- and nanofibres*. *Physiol Res*, 2010. **59**(4): p. 605-14.
134. Klionsky, D.J., et al., *Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy*. *Autophagy*, 2012. **8**(4): p. 445-544.
135. Yang, D., et al., *Expression of Huntington's disease protein results in apoptotic neurons in the brains of cloned transgenic pigs*. *Hum Mol Genet*, 2010. **19**(20): p. 3983-94.
136. Rigamonti, D., et al., *Huntingtin's neuroprotective activity occurs via inhibition of procaspase-9 processing*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(18): p. 14545-8.

137. Ho, L.W., et al., *Wild type Huntingtin reduces the cellular toxicity of mutant Huntingtin in mammalian cell models of Huntington's disease*. J Med Genet, 2001. **38**(7): p. 450-2.
138. Rue, L., et al., *Brain region- and age-dependent dysregulation of p62 and NBR1 in a mouse model of Huntington's disease*. Neurobiol Dis, 2013. **52**: p. 219-28.

Internetové zdroje

http://www.uniprot.org/uniprot/P42858#section_seq