

Transgenní miniprasata pro Huntingtonovu nemoc

J. HODANOVÁ,¹ J. JUHÁSOVÁ,² I. VALEKOVÁ,² P. RAUSOVÁ,² M. JOZEFOVIČOVÁ,^{3,4} Š. JUHÁS²

¹Gymnázium Jana Palacha, Mělník

²Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v. v. i., Liběchov

³Pracoviště radiodiagnostiky a intervenční radiologie, IKEM, Praha

⁴Oddelenie NMR a hmotnostnej spektrometrie, FCHPT, STU, Bratislava, Slovenská republika

SOUHRN

Hodanová J., Juhášová J., Valeková I., Rausová P., Jozefovičová M., Juhás Š. **Transgenní miniprasata pro Huntingtonovu nemoc.** Veterinářství 2015;65:198-205.

Huntingtonova nemoc představuje jedno z méně známých, avšak smrtelných neurodegenerativních onemocnění, u které je jasná příčina – mutovaný protein huntingtin. V současné době s pokrokem v oblasti genového inženýrství je mnohem snadnější a levnější vytvořit vhodné zvířecí modely pro simulaci mnohých závažných geneticky podmíněných lidských nemocí a testování jejich léčby. Hlodavci a velká zvířata jsou po genetické stránce a velikosti orgánových soustav podobní lidem a patří mezi hlavní modelové systémy Huntingtonovy choroby. Miniaturní prasata mimo jiné splňují etické i ekonomické předpoklady stát se ideálním preklinickým testovacím systémem pro toto prozatím nevyléčitelné dědičné onemocnění.

SUMMARY

Hodanová J., Juhášová J., Valeková I., Rausová P., Jozefovičová M., Juhás Š. **Transgenic minipigs for Huntington's disease.** Veterinářství 2015;65:198-205.

Huntington's disease represents one of the not well-known but fatal neurodegenerative diseases in which the cause is clear – mutated huntingtin protein. Nowadays in context of gene engineering progress is more easily and cheaper to create appropriate animal models for simulation of many serious human disorders with genetic background and its cure testing. Rodents and large animals are genetically as well as organ systems capacity similar to humans and belong to major model systems of Huntington's disease. In addition minipigs fulfill ethical and economic conditions to become an ideal preclinical test system for this incurable hereditary disease.

Úvod

Huntingtonova nemoc (HN) je autozomálně dominantně dědičné neurodegenerativní onemocnění známé již od středověku, poprvé popsáno Georgem Huntingtinem v roce 1872 podle kterého má své jméno. Příčinou této nemoci je zmnožení CAG repeticí v genu označeném IT-15, který kóduje protein s názvem huntingtin (Htt). Následkem této mutace je masivní mozková neurodegenerace charakterizovaná převážně ztrátou eferentních středně trnitých neuronů striáta primárně zodpovědných za typické symptomy. U většiny nositelů mutace dochází k nástupu nemoci v produktivním věku, mezi 35.–45. rokem života, ovšem

u malého procenta, přibližně 10 % případů, nastupuje jako juvenilní forma před dosažením 20 let. V časném stadiu nemoci dochází u pacientů k progresivním emocionálním, psychiatrickým a kognitivním poruchám, které mohou být vysvětleny dysfunkcí hypotalamu. Později se u pacientů začínou objevovat motorické příznaky nemoci spojené s mimovolnými pohyby končetin a obličeje označované jako chorea nebo tanec svatého Víta, dystonie, progresivní ztráta tělesné hmotnosti a následně demence, dysfagie a kachexie. Pacienti většinou umírají do 15 let od projevení se prvních příznaků.

Mutovaný huntingtin, který je příčinou nemoci, je přítomný ve všech lidských buňkách a jeho

původní nemutovaná forma je nezbytná pro správnou činnost buňky jako takové. Huntingtin se podílí na časně embryogenezí, vývoji mozku, krvetvorbě a jeho plné vyřazení vede k časně embryonální mortalitě. Přestože byla mutace genu IT-15 identifikována vědeckým týmem pod vedením Dr. Guselly již v roce 1993, dosud nebyla nalezena účinná terapie.¹ Mimo jiné, v důsledku mutace huntingtinu dochází k redukci nemutovaného huntingtinu, který chrání striatální neurony, což následně přispívá k patogenezi Huntingtonovy nemoci a ztěžuje nalezení vhodné léčebné strategie. Proto v současné době probíhá její intenzivní výzkum pomocí nejnovějších molekulárně-genetických technik a postupů s využitím buněčných kultur a zvířecích modelů. Předmětem klinického studia Huntingtonovy choroby je také nalezení neinvazivních markerů nástupu tohoto onemocnění. Výzkum na zvířecích modelech, či už bezobratlých (kvasinky, octomilka, nebo háďátka) nebo obratlovců (zebrčka, myš, potkan, ovce, prase a nehumánní primáti) přinesl a přináší mnoho nových poznatků v patogenezi nemoci, což přispívá nejen k nalezení účinné terapie HN, ale i dalších vzácných onemocnění způsobených zmnožením polyglutaminů, jako jsou bulbospinální svalová atrofie (Kennedyho nemoc, SMA), několik druhů spinocerebelárních ataxií (SCAs) a dentatorubropalidolysická atrofie (DRPLA) aj.^{2,3}

Hlodavci jako modely Huntingtonovy nemoci

Hlodavci nesporně představují hlavní modelové systémy neurodegenerativních chorob včetně Huntingtonovy nemoci. Disponují mnohými přednostmi, jako jsou rychlý nástup onemocnění, schopnost simulace a rekapitulace klinických příznaků, genetické manipulace a screening potenciálních léčiv. Počet myších genetických modelů HN dominuje nad modely HN u potkanů. Nejpoužívanějším myším modelem zlatým standardem pro studium HN je R6/2 myš, přičemž tento transgenní model byl vytvořen již v roce 1996 a má náhodně zabudován exon 1, promóter a část prvního intronu lidského huntingtinu nesoucího 144 CAG repetice. R6/2 linie myší je charakterizována časným nástupem nemoci přibližně okolo čtyř týdnů, motorickým deficitem, ztrátou hmotnosti, metabolickou dysfunkcí, přítomností agregátů v CNS a krátkou dobou přežívání asi tři měsíce.⁴ Bohužel R6/2 model není ideální pro dlouhodobé studie a za vhodnější model pro studium presymptomatického stadia HN a behaviorálních fenotypů se považuje R6/1 linie myší. Tato linie je charakterizována mírnějšími příznaky, které nastupují mnohem později než u R6/2, a to v průběhu sedmi měsíců. Mimo jiné pomocí R6/1 linie transgenních myší byla nedávno popsána dopaminergní dysfunkce a depresivní chování vázané na pohlaví,^{5,6} rovněž byl detekován pozitivní vliv cvičení na kognitivní neuropatologii⁷ nebo potvrzen pozitivní

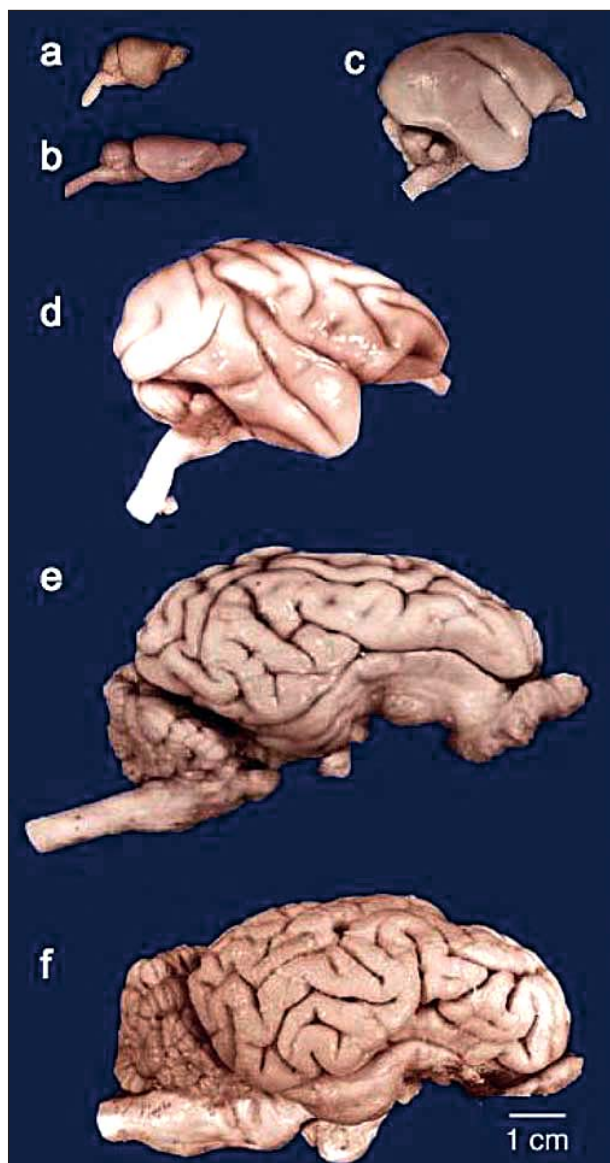
vliv mikroinfuze striatálního gliálního kondicionovaného média z myších fétů do striátu.⁸ Na vytvoření myšího transgenního modelu exprimujícího plnou délku (full-length) mutovaného proteinu pracovalo mnoho vědeckých týmů.⁹⁻¹² Transgenní myši exprimující plnou délku huntingtinu jsou totiž v některých případech lepší než modely exprimující NH₂-terminální fragment huntingtinu, zejména pokud jde o ztráty neuronů a schopnost přesněji shrnout sled událostí vedoucí k propuknutí HN. Jedním z těchto modelů je YAC128 (YAC – Yeast Artificial Chromosome), u kterého se zdá, že má více specifický a pomalu se rozvíjející fenotyp v porovnání s R6/2. Ve striátu těchto myší byla detekována přítomnost inkluzí, ztráta buněk a atrofie doprovázena behaviorálním fenotypem včetně motorického deficitu.¹²⁻¹⁴ U této transgenní linie myší podobně jako u R6/2 a HdhQ150 knock-in linie byla nedávno charakterizována narušená funkce imunitních buněk (zvýšená odpověď myeloidních buněk s produkcí cytokinů po stimulaci) podobná pacientům s HN.¹⁵ Zajímavé a pro studium HN přínosné se zdá být zkřížení YAC128 transgenní myši s Rgs9-EGFP myši, jež má selektivní expresi EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) genu v středně trnitých neuronech striátu, což umožnilo měřit plochu striátu a intenzitu EGFP v koronálních řezech. Tito kříženci mohou také přispět k testování nových neuroprotektivních látek.¹⁶ V roce 2008 byly v laboratoři Williama Yanga vytvořeny myši nesoucí bakteriální umělý chromozom (BAC) s plnou délkou lidského genu nesoucího 97 CAG repetice. Tyto myši vykazují progresivní motorický deficit a selektivní neuropatologii v mozkové kůře a striátu s pozdním počátkem nástupu, což představuje nový a vhodnější in vivo model pro patogenezi HN a terapeutické studie.^{9,17} Mimo jiné na této linii myší bylo demonstrováno propojení mezi expresí mutovaného huntingtinu v hypotalamu a vývojem metabolických a psychiatrických změn, před nástupem motorického deficitu, narušením hypotalamických okruhů bez zapojení SF1 (steroidogenic factor 1) neuronů ventromediálního hypotalamu.¹⁸ Knock-in modely myší vytvořené homologní rekombinací, podobně jako některé transgenní modely, exprimují plnou délku mutovaného huntingtinu, ale na rozdíl od transgenních modelů, cílenou inzerací expandovaného CAG řetězce do myšího homologu genu pro huntingtin, čímž by měly geneticky mnohem přesněji napodobovat stav při HN u lidí (předpokládá se, že myší forma huntingtinu má podobné funkce a vlastnosti jako lidský huntingtin). Knock-in myší modely, které demonstrují symptomatologii HN, mají poměrně dlouhé CAG (polyQ) řetězce zabudované do genomu, z důvodů slabé patologie u knock-in modelů s kratšími polyQ.¹⁹ Nejčastěji využívaným knock-in modelem pro studium HN je HdhQ150 myš (~150 CAG repetice) vytvořena v laboratoři Petera Detloffa na Univerzitě v Alabamě v Birminghamu. Tato linie vykazuje agregáty mutovaného huntingtinu přibližně v devíti měsících věku, úbytek na váze, sníženou aktivitu, abnor-

mální výkon na rotarodě, stejně tak i neurologický deficit ve věku dvou let.²⁰ Mimo jiné u tohoto knock-in modelu byly v presymptomatické fázi detekovány intranukleární inkluze v mozku, extranukleární agregáty v hipokampu, snížení exprese DARPP32 (dopamine- and cAMP-regulated neuronal phosphoprotein, marker středně trnitých neuronů) proteinu a zvýšení gliálních markerů spojených se zánětem, který ale překvapivě nekoreloval s výskytem agregátů mutovaného huntingtinu.²¹ Podobné symptomy byly popsány i u HdhQ140 myši. Rané behaviorální abnormality v široké škále motorických a nemotorických funkcí u této linie začínají ve věku 1–4 měsíců a jsou následovány přítomností agregátů v jádrech a neuropile buněk striáta, postupnou gliózou (12 měsíců) a ztrátou neuronů striáta ve věku dvou let.^{22,23} U tohoto knock-in modelu, zkříženého s myší exprimující žlutý fluorescenční protein (YFP-H) v některých subpopulacích neuronů, se nedávno zjistily také abnormality axonů. Jednalo se o edém nejprve striatálních zakončení axonů a následně o edém kortikostriatálních axonů, který byl závislý na věku myši.²⁴ Celkem nedávno byl vytvořen a popsán nový knock-in model myši s 250 polyglutaminy (HdhQ250), který byl vytvořen selektivním šlechtěním z Hdh150 myši. HdhQ250 vykazuje progresivní motorický deficit, ztrátu objemu striáta a mozkové kůry, akumulaci agregátů mutovaného huntingtinu, snížené koncentrace DARPP32 a BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) a dysbalanci metabolitů striáta, přičemž byla zjištěna narušená myelinizace mozku už ve 14. dni po narození.²⁵ Potkani jako model pro HN mají oproti myším několik výhod a to, že mají větší mozek vhodný pro in vivo zobrazovací studie a transplantaci buněk. Také je u potkanů možné využít většího spektra behaviorálních a zobrazovacích testů. V roce 2003 byl vytvořen první transgenický model potkana nesoucí 1962-bp cDNA fragment potkaního huntingtinu s 51 CAG repeticemi pod kontrolou endogenního potkaního promotoru huntingtinu.^{17,26} Tento model vykazuje ztrátu buněk v striátu, inkluzní patologii, deficity motorických a kognitivních funkcí včetně psychomotorické výkonnosti, narušenou expresi hypotalamických proteinů a elektrofyziologické změny.^{26–31} V roce 2012 byla publikována práce, která představila nový potkaní transgenický model HN na bázi bakteriálního umělého chromozomu (BAC – *Bacterial Artificial Chromosome*). Tento chromozom nese plnou délku huntingtinu s 97 CAG/CAA repeticemi a všemi regulatorními elementy. Tyto potkani mají robustní a progresivní fenotyp podobný HN s časným nástupem včetně motorického deficitu a úzkostných symptomů. Distribuce agregátů v neuropile a jaderná akumulace N-terminálního mutovaného huntingtinu u těchto potkanů byla podobná pacientům s HN.³² Tyto BACHD transgenické potkani také vykazovali hluboký deficit asociální paměti a možná i deficit reverzního učení detekovaný v labyrintovém testu, přičemž časový průběh intenzity těchto symptomů (ještě před nástupem motorického defi-

citu) byl podobný s časovým průběhem u pacientů s HN.^{33,34}

Velké zvířecí modely pro Huntingtonovu nemoc

Mnohé neurodegenerativní choroby včetně HN jsou jedinečnou lidskou záležitostí a u zvířat nebyly dosud pozorovány. Proto bychom neměli předpokládat, že některý geneticky modifikovaný organismus použitý pro jejich simulaci bude schopen v celé šíři napodobit patofyziologii a progresi onemocnění tak, jak ho



Obr. 1 – Porovnání velikostí mozku živočišných druhů používaných pro modelování neurodegenerativních onemocnění. Savci s hladkou mozkovou kůrou: myš domácí (*Mus musculus*; a), potkan hnědý (*Rattus norvegicus*; b) a marmoset (*Callithrix jacchus*; c). Savci s gyrifikovanou mozkovou kůrou: makak rhesus (*Macaca mulatta*; d), prase domácí (*Sus scrofula domestica*; e) ovce domácí (*Ovis aries domestica*; f). Obrázek z kolekce anatomického srovnání savčích mozků – univerzity ze státu ve Wisconsinu a Michiganu



Obr. 2 – Transgenní opice modelu HN – rHD-1 (vlevo) a rHD-2 (vpravo). Obrázek při přirozeném světle (a) a fluorescenční obraz při ultrafialovém záření vykazující expresi GFP (b)

(Yang a kol., 2008)

známe u lidí.³⁵ Modely hlodavců mají, díky své omezené životnosti a velikosti mozku, řadu nevýhod (obr. 1). Nejčastěji používaná myš linie R6/2 se vyznačuje časným nástupem příznaků a rychlým průběhem nemoci, což odpovídá spíše juvenilní formě HN. Navíc i fenotypové projevy navozené nemoci se velmi odlišují od příznaků u člověka.³⁶ Proto vznikla potřeba vytvoření velkých genetických zvířecích modelů, které by svou velikostí, dlouhověkostí, orgánovou kapacitou a fyziologií hodnověrněji simulovaly HN lidí. Huntingtonova nemoc je způsobena jednoduchou genetickou mutací, proto v minulých letech bylo vyvinuto úsilí směrem k terapeutickým postupům, jako jsou silencing jedné mRNA nebo proteinu mutovaného huntingtinu. Také se vynakládá úsilí v oblasti genových terapií, regulujících trofické faktory, které by měly zpomalit neurodegeneraci přítomnou u HN. BDNF a/nebo použití antisense oligonucleotides, se zdají být velmi nadějnou možností léčby, a jejich efektivní dodání do potřebných oblastí mozku a potenciální terapeutický účinek budou muset být testovány na velkých zvířecích modelech.³⁵

Primáti

Primáti představují velkou naději pro studium neurologických onemocnění, pro něž jsou v současné době dostupné experimentální modely zatím nedokonalé. (Zuccato a kol., 2010). Vědeckému týmu Anthony W. S. Chana na Univerzitě v Emory se podařilo vytvořit první transgenní opičí model pro HN vnesením pozměněné formy HTT genu do perivitellinního prostoru oocytů makaka (*Macaca mulatta*). K transgenезi byl použit lentivirový vektor exprimující exon 1 genu pro lidský huntingtin s 84 CAG repeticemi (HTT-84Q) a gen pro zelený fluorescenční protein (GFP) pod kontrolou lidského polyubiquitin C promotoru. Z původních 130 nainjovaných oocytů, jež byly následně oplozeny intracytoplazmatickou injekcí spermií bylo získáno 30 embryí, které byly přeneseny do osmi

náhradních matek, a výsledkem bylo pět novorozených transgenních opic (rHD-1 – rHD-5) nesoucích oba geny jak pro lidský huntingtin, tak i pro GFP (obr. 2). Mláďata se lišila počtem opakování CAG repeticí, v rozsahu od 28–88. Dvě mláďata (rHD-4 a rHD-5), která uhynula do 24 hodin, vykazovala ihned po narození výrazné respirační problémy a hlavně změněné motorické funkce. Vzhledem k jejich velmi časnému úhynu nebylo možné určit, zda příčinou výše zmíněných těžkostí byla právě přítomnost mutovaného lidského huntingtinu. Mládě rHD-3, jež přeživalo čtyři týdny, trpělo od dvou dnů po narození typickými projevy HN, dystonií, choreou a poruchami polykání.³⁷ Jedinec rHD-2 s 83 CAG repeticemi, který týden po narození vykazoval sporadicky velmi mírné mimovolní pohyby, zemřel v 11 měsících a zůstal pouze poslední samec rHD-1 s 29 CAG repeticemi, což spadá do rozmezí opakování CAG tripletů vyskytujícího se u zdravých lidí. Z transgenních makaků byly vytvořeny embryonální kmenové buňky (rHD-ESCs) a indukované pluripotentní buňky (rHD-iPSCs), které představují vhodný buněčný model HN, jelikož exprese mutovaného huntingtinu u neurálních prekurzorů odvozených z těchto buněčných linií zapříčiňuje zvýšenou apoptózu, tvorbu intranukleárních inkluzí a agregátů, jejichž přítomnost v neuronech je charakteristickým znakem HN [38-40]. Tento typický buněčný fenotyp HN u GABAergních neuronů vydifferentovaných z rHD-iPSCs se podařilo v podmínkách in vitro zvrátit pomocí nové genové a farmakologické léčby.⁴¹ Dvouletá studie u nejdéle přežívajícího transgenního makaka (rHD-1) odhalila progresivní kognitivní deficit a morfometrické změny ve striátu a hipokampu.⁴¹ Předmětem další studie tohoto týmu vědců bylo vytvoření transgenních opic s použitím ubiquitinového promotoru pod vlivem exonu 1 s mutovaným huntingtinem nesoucím 147Q. Vzhledem k odumření plodů již během prenatálního vývoje, je zřejmé, že tak dlouhé polyQ je pro primáty toxické.^{35,43} U transgenních makaků byla stejně jako u pacientů, transgenních

HN myši a u in vitro experimentálních modelů prokázána dysfunkce miRNA, zejména miR-128a, která hraje klíčovou roli v patogenezi této nemoci a mohla by být v budoucnu vhodným terapeutikem či biomarkem.⁴⁴

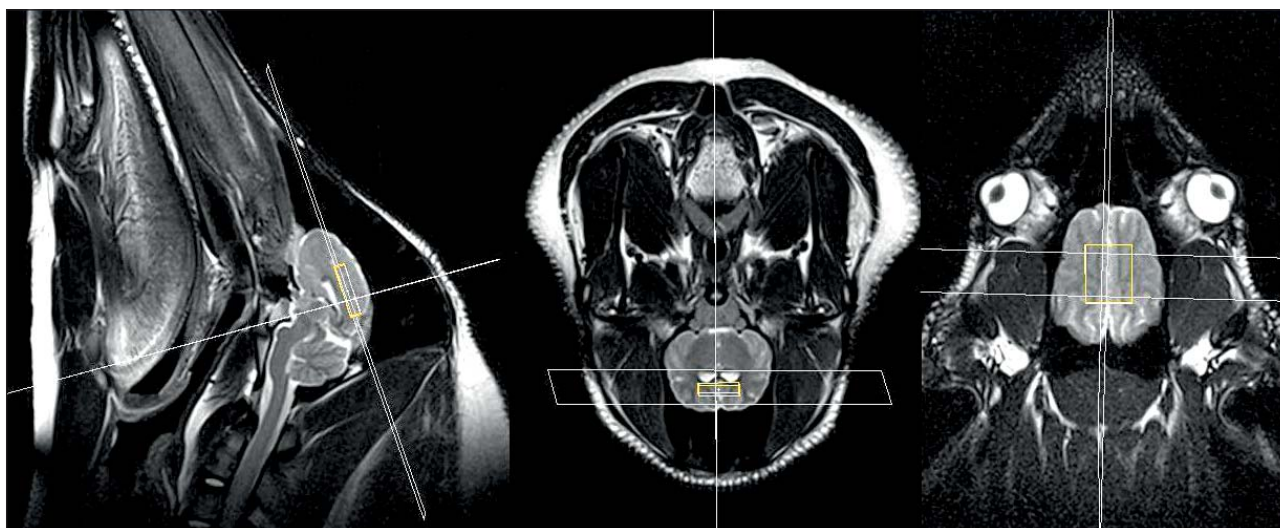
Ovce

Russell Snell na Univerzitě v Aucklandu (ve spolupráci s jižním australským výzkumným a vývojovým ústavem Massachusetts General Hospital) vytvořil první ovčí model HN exprimující plnou délku lidského genu pro huntingtin se 73 CAG repeticemi.⁴⁵ Ovce, *Ovis aries*, byly jako model vybrány pro podobnost jejich bazálních ganglií a mozkové kůry (míst primárně postižených při HN) obdobným oblastem lidského mozku. Další výhodou ovcí byla pro australské vědce jejich dostupnost a chovatelská nenáročnost – mohou být chovány pastevním způsobem v přirozeném prostředí a mají submisivní chování vůči člověku. Důležité ale je, že žijí déle než deset let, což umožňuje studium klasické formy nemoci s pozdějším nástupem neurodegenerativních změn a umožňuje sledovat chronické účinky mutovaného genu. Kromě toho se očekává, že ovce může být dobrým modelem pro farmakologické testy, protože jejich mozek má přední mozek (prosencephalon) srovnatelný s lidským. To umožňuje využít chirurgické metody pro testování možných buněčných náhrad nebo aplikaci genové terapie, což není možné provádět u lidí. Metodou mikroinjekce DNA do prvojádra jednobuněčných zygot bylo vytvořeno šest transgenních ovcí – čtyři berani, dvě ovce, kteří sloužili jako zakladatelé chovu transgenních jedinců.^{17,45} Tato linie transgenních ovcí (OVT73) spolehlivě exprimuje mutovaný huntingtin ve středních, ale jasně detekovatelných množstvích v mozku včetně striata a kortexu. Přenos transgenu se jasně potvrdil ve třech generacích po sobě. U šestiměsíčních transgenních zvířat (n = 7) byla detekována snížená imunoreaktivita GABAA₁ receptoru a globus pallidus leu-enkefalinu.



Obr. 3 – Transgenní miniprase Adélka, zakladatelka linie exprimující N-terminální fragment lidského mutovaného huntingtinu

Dvě ze tří 18měsíčních transgenních ovcí měly kortikální neuropilní agregáty, přičemž u 36měsíčního zvířete se mimo jiné detekovaly ještě intranukleární inkluze v piriformním kortexu.⁴⁶ U tohoto ovčího modelu HN intenzivně probíhají různé behaviorální testy. Zajímavé je, že u tohoto modelu se nejenom zjistila schopnost diskriminačního a reverzního učení, ale také schopnost změny z intradimenzionálních (ID) na extradimenzionální (ED) úlohy, což jsou senzitivní testy kognitivních dysfunkcí u lidí. Protože ovce jsou schopny výkonných kognitivních úloh, které patří mezi důležité schopnosti primátů, mají obrovský potenciál nejenom jako model HN, ale také pro studium kognitivních funkcí a vývoje komplexního chování u zdravých zvířat.⁴⁷ Mimo jiné byly u OVT73 detekovány poruchy v cirkadiálních rytmech, a to u mladých ovcí, které se u nich zhoršovaly s věkem. Zajímavostí je, že tyto poruchy byly pozorovány pouze u zvířat, která byla ustájena odděleně od zdravých netransgenních kusů.⁴⁸ Problémem u ovcí, jako u velkého zvířecího modelu HN, zůstává neúplná dokumentace celého ovčího genomu, a proto následné problémy



Obr. 4 – Magnetická rezonance a spektroskopie mozku transgenních a kontrolních wild type miniaturních prasat ve věku 24 měsíců

s aplikací genomických technologií jako jsou Affymetrix profilace a RNA seq pro analýzu genů a patologických drah, které mohou být dysfunkční v ovčích modelech.³⁵ Nedávno byl transgenní ovčí model využit k optimalizaci a ověření bezpečnosti terapie HN na bázi AAV (adeno-associated virus) konstruktů, se zaměřením na jejich šíření v CNS a přestup do neuronů.⁴⁹

Prase – miniaturní prase

Velkými výhodami použití miniprasat, oproti ovčím jako velkých zvířecích modelů HN, je větší počet potomků v jednom vrhu, vrh 2x do roka a fyziologická podobnost trávicí soustavy s člověkem. První transgenní prasata pro zemědělský výzkum byla vytvořena před třemi desítkami let, přičemž 90 % z nich představují zvířata pro biomedicínský výzkum. V současnosti probíhá neustálý progres v sekvenaci prasečího genomu. Mimo jiné genetické manipulační techniky, jako je transgeneze a homologní rekombinace, jsou u miniprasat poměrně dobře vypracovány³⁵ a umožnily vytvoření transgenních modelů u řady lidských chorob, jako je pigmentosa retinis, cystická fibróza, diabetes mellitus, nádorová onemocnění, kardiovaskulární choroby a v neposlední řadě neurodegenerativní nemoci.⁵⁰ První transgenní miniaturní prasata jako model HN byla vytvořena již v roce 2001 pomocí pronukleárních mikroinjekcí mutované huntingtonové cDNA se 75 CAG repeticemi pod kontrolou potkaního neuron specifického enolázového promotoru.⁵¹ Další transgenní miniaturní prase pro studium HN bylo vytvořeno na linii tibetského miniaturního prasete metodou nukleárního transferu.⁵² Tato prasata exprimovala N-terminální konec (208 aminokyselin) lidského mutovaného huntingtinu s expandovaným polyglutaminovým traktem (105Q). Počet kopií transgenu byl určen na 3–4. Pouze jediné prase přežilo více než měsíc, a v čase vydání publikace bylo čtyři měsíce bez neurologických symptomů. V mozku uhynulých transgenních selat byl pozorován zvýšený počet apoptotických neuronů (DNA fragmentace, pozitivita na kaspázu 3). V důsledku poptávky po velkých zvířecích modelech HN se prof. Jan Motlík a jeho tým v Ústavu živočišné fyziologie a genetiky, Akademie věd České republiky pokusili vytvořit transgenní miniaturní prasata nesoucí lidský mutovaný huntingtin.³ V roce 2009 se metodou lentivirové transgeneze narodilo první sele exprimující N-terminální konec (548 aminokyselin) lidského mutovaného huntingtinu se 124 CAG/CAA repeticemi. Počet kopií transgenu byl určen na jeden, přičemž jeho lokalizace byla zjištěna na dlouhém raménku chromozomu 1 (1q24-q25). Transgenní prasnička (obr. 3) dala vzniknout F1, F2 a F3 generaci transgenních miniprasat, které také exprimují lidský mutovaný huntingtin.⁵³ V roce 2011 tým profesora Motlíka vytvořil také miniaturní prase nesoucí

kopii genu s plnou délkou lidského mutovaného huntingtinu a 145CAG/CAA repeticemi, ale produkce proteinu se u tohoto zvířete nepotvrdila, pravděpodobně v důsledku zabudování do nepřepisujícího místa DNA.

U linie se zkrácenou délkou mutovaného huntingtinu byly zjištěny poruchy v samčích rozmnožovacích orgánech, pokles kvantity a kvality spermií, snížená schopnost oplodnění oocytů in vitro⁵⁴ a srdeční patologie.

U 24 měsíčních transgenních kanců byla provedena magnetická rezonance (MRI, obr. 4) mozků a varlat, přičemž pomocí magnetické spektroskopie (MRS) se zjistil pokles kreatininu (tCr) v thalamu a zvýšení poměru cholinu ke kreatininu (tCho/tCr) v striátu, thalamu, hipokampu a bílé hmotě, což by mohlo souviset se začínajícími patologickými změnami a snížením energetického metabolismu na buněčné úrovni. U těchto kanců byl ve varlatech také detekován pokles poměrů fosfomonoesterů a diesterů k ATP (PME/tATP a PDE/tATP), což koreluje se sníženým množstvím a kvalitou spermií a nižší proliferací buněk.^{55,56} Ve striátu 24měsíčních transgenních zvířat se také detekovalo zvýšení imunoreaktivity IBA-1 (Ionized Calcium-Binding Adapter Molecule 1, marker mikroglíí – detekce zánětlivých procesů).

V krevním séru F2 a F3 generace transgenních prasat do jednoho roku života byla detekována zvýšená koncentrace IL-8. Monocyty izolované z těchto prasat jsou patologicky hyperaktivní v odpovědi na stimulaci, a rovněž u nich byla pozorována zvýšená produkce IL-8. V krevním séru 36měsíčních transgenních prasat byla zjištěna zvýšená aktivace komplementového systému (klasická i MBL cesta). Mimo jiné v krevním séru transgenních miniprasat byla pozorována dysbalance TGFβ1 (*Transforming Growth Factor beta 1*), podobně jako u pacientů s HN v preklinické fázi choroby. V cerebrospinální tekutině bylo také zjištěno snížení IFNα, a to již v raném věku transgenních miniprasat. Ve striátu (nucleus caudatus, putamen) 36měsíčních transgenních zvířat byly mimo jiné pomocí MW8 protilátky (pro detekci agregátů) sporadicky detekovány agregáty. V buňkách a tkáňích těchto transgenních miniprasat se také zjistilo narušení energetického metabolismu a struktury mitochondrií a opravy DNA po poškození.^{53,57-9} Nicméně prasata všech transgenních generací jsou zatím bez klinických příznaků HN. Prasata jsou ve všeobecnosti považována za chytřejší než ovce, nicméně jasné důkazy o tom chybí. Tak či onak prasata ani ovce nebyly nikdy předtím rutinně používány v laboratořích pro kognitivní testování. Na druhou stranu kognitivní testování je dobře etablováno u opic, což je favorizuje.³⁵ Nicméně miniaturní prasata a ovce stále nabývají na důležitosti jako velké animální modely. Díky své velikosti, orgánové kapacitě a fyziologii podobné v několika aspektech lidem, jsou tato zvířata vhodná pro preklinické experimenty a dlouhodobé bezpečnostní studie.^{3,17}

Diskuse a závěr

Neurodegenerativní nemoci postihují miliony pacientů a jejich rodin. V důsledku komplexnosti těchto chorob a našeho limitovaného chápání jejich patogeneze, je vývoj designu terapeutických postupů, které by je mohly efektivně léčit, poměrně náročný. Je pravděpodobné, že neexistuje a ani existovat nebude zvířecí model, který splní všechny požadavky týkající se většiny nezodpovězených otázek ve výzkumu a vývoji HN. Nicméně velké zvířecí modely jsou přínosným doplněním ostatních modelů této nemoci (nižší organismy a hlodavci). Například u transgenního opičího modelu způsobil fragment mutovaného huntingtinu těžkou patofyziologii a histologické analýzy mozků těchto opic ukázaly klasické agregáty v jádrech a neuropilu, které jsou podobné agregátům u hlodavců. Tato dlouhožijící zvířata jsou ale nepostradatelná pro svoji schopnost napodobit pomalou a progresivní premanifestační fázi této dědičné nemoci. Co je však ještě důležitější, je možné u nich studovat průběh nemoci pomocí senzitivních měření (MRI, PET, EEG, elektrofyziologie, molekulární analýzy včetně RNAseq, testy motorických a kognitivních funkcí), jejichž výsledky by mohly být nápomocny při hledání markerů HN. Velké zvířecí modely HN je potřebné zařadit do preklinických testů zvláště pro genovou terapii, jelikož získaná data z velkých zvířat budou cenná pro předpovídání biodistribuce, bezpečnosti a účinnosti u lidských pacientů. Jedním z mnoha příkladů slibné terapie HN je RNAi (ALN-HTT), která je vyvíjena ve spolupráci s Alnylam Pharmaceuticals, Inc. Medtronic, Inc. a CHDI Foundation, Inc. k utlumení mRNA huntingtinu a snížení produkce mutovaného huntingtinu (Alnylam Pharmaceuticals, 2011). Nicméně pro všechny velké zvířecí modely HN existuje jedna limitace a tou je, že všechny modely jsou transgenní, a proto nesou dvě kopie vlastního normálního druhově specifického huntingtinu a jednu extra kopii vneseného lidského mutovaného. Proto žádný z těchto modelů nerekapituluje HN na genetické úrovni jako u lidí, kde je jedna normální a jedna mutovaná alela. V současné době se snaží překonat tento problém firma Exemplar Genetics (Sioux City, IA), která se pokouší o vytvoření knock-in miniprasečího modelu HN na genetickém pozadí liběchovského miniprasete.

Poděkování

Práce vznikla za finanční podpory grantů Technologické agentury České republiky TA01011466, 7F – Finanční mechanismy EHP/Norsko (2008–2017) 7F14308, CHDI Foundation (A-5378, A-8248), projektu ExAM – CZ.1.05./2.1.00/03.0124 a Institucionální podpory RVO: 67985904.

Literatura:

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):971-83.
2. Roth, J. Huntingtonova nemoc. *Cesk Slov Neurol N* 2010;73/106(2):107-123.

3. Zuccato, C., Valenza, M., Cattaneo, E. Molecular mechanisms and potential therapeutical targets in Huntington's disease. *Physiol Rev* 2010;90(3):905-81.
4. 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):493-506.
5. Renoir, T. et al., Sexually dimorphic dopaminergic dysfunction in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Pharmacol Biochem Behav* 2014;127C:15-20.
6. Du, X. et al. The influence of the HPG axis on stress response and depressive-like behaviour in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Exp Neurol* 2015;263:63-71.
7. Harrison, D. J., et al., Exercise attenuates neuropathology and has greater benefit on cognitive than motor deficits in the R6/1 Huntington's disease mouse model. *Exp Neurol* 2013;248:457-69.
8. Peruchio, J., et al. Striatal infusion of glial conditioned medium diminishes huntingtin pathology in r6/1 mice. *PLoS One* 2013;8(9):e73120.
9. 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):6182-95.
10. 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):181-92.
11. 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):198-202.
12. Slow, E. J. et al. Selective striatal neuronal loss in a YAC128 mouse model of Huntington disease. *Hum Mol Genet*, 2003;12(13):1555-1567.
13. Van Raamsdonk, J. M. et al. Selective degeneration and nuclear localization of mutant huntingtin in the YAC128 mouse model of Huntington disease. *Hum Mol Genet* 2005;14(24):3823-35.
14. Bayram-Weston, Z. et al. Light and electron microscopic characterization of the evolution of cellular pathology in YAC128 Huntington's disease transgenic mice. *Brain Res Bull* 2012;88(2-3):137-47.
15. Trager, U. et al. Characterisation of immune cell function in fragment and full-length Huntington's disease mouse models. *Neurobiol Dis* 2014;73C:388-398.
16. Liang, X. et al. An Automated and Quantitative Method to Evaluate Progression of Striatal Pathology in Huntington's Disease Transgenic Mice. *J Huntingtons Dis* 2014;3(4):343-50.
17. Hladký, S. Zvířecí modely Huntingtonovy nemoci. Česká zemědělská univerzita v Praze. 2012:40.
18. Baldo, B., Cheong, R. Y., Petersen, A. Effects of deletion of mutant huntingtin in steroidogenic factor 1 neurons on the psychiatric and metabolic phenotype in the BACHD mouse model of Huntington disease. *PLoS One*, 2014;9(10):e107691.
19. Trueman, R. C., et al. Early onset deficits on the delayed alternation task in the Hdh(Q92) knock-in mouse model of Huntington's disease. *Brain Res Bull* 2012;88(2-3):156-162.
20. Lin, C. H., et al. Neurological abnormalities in a knock-in mouse model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 2001;10(2):137-44.
21. Young, D. et al. Mutant huntingtin gene-dose impacts on aggregate deposition, DARPP32 expression and neuroinflammation in HdhQ150 mice. *PLoS One*, 2013;8(9):e75108.
22. 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):11-26.
23. Hickey, M. A. et al. Extensive early motor and non-motor behavioral deficits are followed by striatal neuronal loss in knock-in Huntington's disease mice. *Neuroscience* 2008;157(1):280-95.
24. Marangoni, M., et al. Age-related axonal swellings precede other neuropathological hallmarks in a knock-in mouse model of Huntington's disease. *Neurobiol Aging* 2014;35(10):2382-93.
25. Jin, J. et al. Early white matter abnormalities, progressive brain pathology and motor deficits in a novel knock-in mouse model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 2015.
26. von Horsten, S. et al. Transgenic rat model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 2003;12(6):617-24.
27. Cao, C. et al. Progressive deterioration of reaction time performance and choreiform symptoms in a new Huntington's disease transgenic rat model. *Behav Brain Res* 2006;170(2):257-61.
28. Kantor, O. et al. Selective striatal neuron loss and alterations in behavior correlate with impaired striatal function in Huntington's disease transgenic rats. *Neurobiol Dis* 2006;22(3):538-47.
29. Nguyen, H. P., et al. Behavioral abnormalities precede neuropathological markers in rats transgenic for Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 2006;15(21):3177-3194.
30. Vlamings, R. et al. Metabolic and electrophysiological changes in the

- basal ganglia of transgenic Huntington's disease rats. *Neurobiol Dis* 2012;48(3):488--494.
31. Cong, W. N. et al. Altered hypothalamic protein expression in a rat model of Huntington's disease. *PLoS One* 2012;7(10):e47240.
 32. Yu-Taeger, L. et al. A novel BACHD transgenic rat exhibits characteristic neuropathological features of Huntington disease. *J Neurosci* 2012;32(44):15426--1538.
 33. Abada, Y. S. et al. Reversal learning and associative memory impairments in a BACHD rat model for Huntington disease. *PLoS One* 2013;8(11):e71633.
 34. Abada, Y. S. et al. Assessment of motor function, sensory motor gating and recognition memory in a novel BACHD transgenic rat model for huntington disease. *PLoS One* 2013;8(7):e68584.
 35. Morton, A. J., Howland, D. S. Large genetic animal models of Huntington's Disease. *J Huntingtons Dis* 2013;2(1):3-19.
 36. Gil, J. M., Rego, A. C. The R6 lines of transgenic mice: a model for screening new therapies for Huntington's disease. *Brain Res Rev* 2009;59(2):410-31.
 37. Yang, S. H. et al. Towards a transgenic model of Huntington's disease in a non-human primate. *Nature* 2008;453(7197):921-924.
 38. Laowtammathron, C. et al. Monkey hybrid stem cells develop cellular features of Huntington's disease. *BMC Cell Biol* 2010;11:12.
 39. Chan, A. W. et al. Reprogramming Huntington monkey skin cells into pluripotent stem cells. *Cell Reprogram* 2010;12(5):509-17.
 40. Putkhao, K. et al. Pathogenic cellular phenotypes are germline transmissible in a transgenic primate model of Huntington's disease. *Stem Cells Dev* 2013;22(8):1198-1205.
 41. Carter, R. L. et al. Reversal of cellular phenotypes in neural cells derived from Huntington's disease monkey-induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports* 2014;3(4):585-93.
 42. Chan, A. W. et al. A two years longitudinal study of a transgenic Huntington disease monkey. *BMC Neurosci* 2014;15:36.
 43. Wang, C. E. et al. Accumulation of N-terminal mutant huntingtin in mouse and monkey models implicated as a pathogenic mechanism in Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 2008;17(17):2738-2751.
 44. Kocerha, J. et al. microRNA-128a dysregulation in transgenic Huntington's disease monkeys. *Mol Brain* 2014;7:46.
 45. Jacobsen, J. C. et al. An ovine transgenic Huntington's disease model. *Hum Mol Genet* 2010;19(10):1873-1882.
 46. Reid, S. J. et al. Further molecular characterisation of the OVT73 transgenic sheep model of Huntington's disease identifies cortical aggregates. *J Huntingtons Dis* 2013;2(3):279-95.
 47. Morton, A. J., Avanzo, L. Executive decision-making in the domestic sheep. *PLoS One* 2011;6(1):e15752.
 48. Morton, A. J. et al. Early and progressive circadian abnormalities in Huntington's disease sheep are unmasked by social environment. *Hum Mol Genet* 2014;23(13):3375-3383.
 49. van der Bom, I. M. et al. Finding the striatum in sheep: use of a multi-modal guided approach for convection enhanced delivery. *J Huntingtons Dis* 2013;2(1):41-45.
 50. Gun, G., Kues, W. A. Current progress of genetically engineered pig models for biomedical research. *Biores Open Access* 2014;3(6):255-264.
 51. Uchida, M., et al. Production of transgenic miniature pigs by pronuclear microinjection. *Transgenic Res* 2001;10(6):577-582.
 52. 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):3983-3394.
 53. Baxa, M. et al. A transgenic minipig model of Huntington's Disease. *J Huntingtons Dis* 2013;2(1):47-68.
 54. Macakova, M. et al. Reproductive parameters and mitochondrial function in spermatozoa of F1 and F2 minipig boars transgenic for n-terminal part of the human mutated huntingtin. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry* 2012;83:A16-A16.
 55. Jozefovičová, M. et al. Minipig model of Huntington's disease: 1H MR spectroscopy of the brain. *ESMRMB 2013, 30th Annual Scientific Meeting. Heidelberg; Springer Verlag, Toulouse 2013:481-482.*
 56. Jozefovičová, M. et al. 31P MR spectroscopy of the testes of transgenic minipigs with Huntington's disease. *ESMRMB 2013, 30th Annual Scientific Meeting. Heidelberg; Springer Verlag, Toulouse 2013:485.*
 57. Benova, I. et al. Activation of cytokine production in F1 and F2 generation of miniature pigs transgenic for n-terminal part of mutated human huntingtin. *J Neurolog Neurosurg Psychiatry* 2012;83:A16-A16.
 58. Ondruskova, N. et al. Study of protein O-GlcNAcylation in the brain tissue in Huntington's disease. *Glycobiology* 2014;24(11):1207-1207.
 59. Rausova, P. et al. Genotoxic stress in fibroblasts and mesenchymal stem cells isolated from miniature pigs transgenic for n-terminal part of mutated human huntingtin. *J Neurolog Neurosurg Psychiatry* 2012;83:A7-A7.
 60. Chmelík, F., & Frömel, K. (2013). *Manuál pro práci s programem EndNote*. Olomouc: Univerzita Palackého.

Adresa autorky:**Jana Hodanová****Gymnázium Jana Palacha Mělník****Mělník 27 601**