

Bio

Ročník 25 • Číslo 1/2015

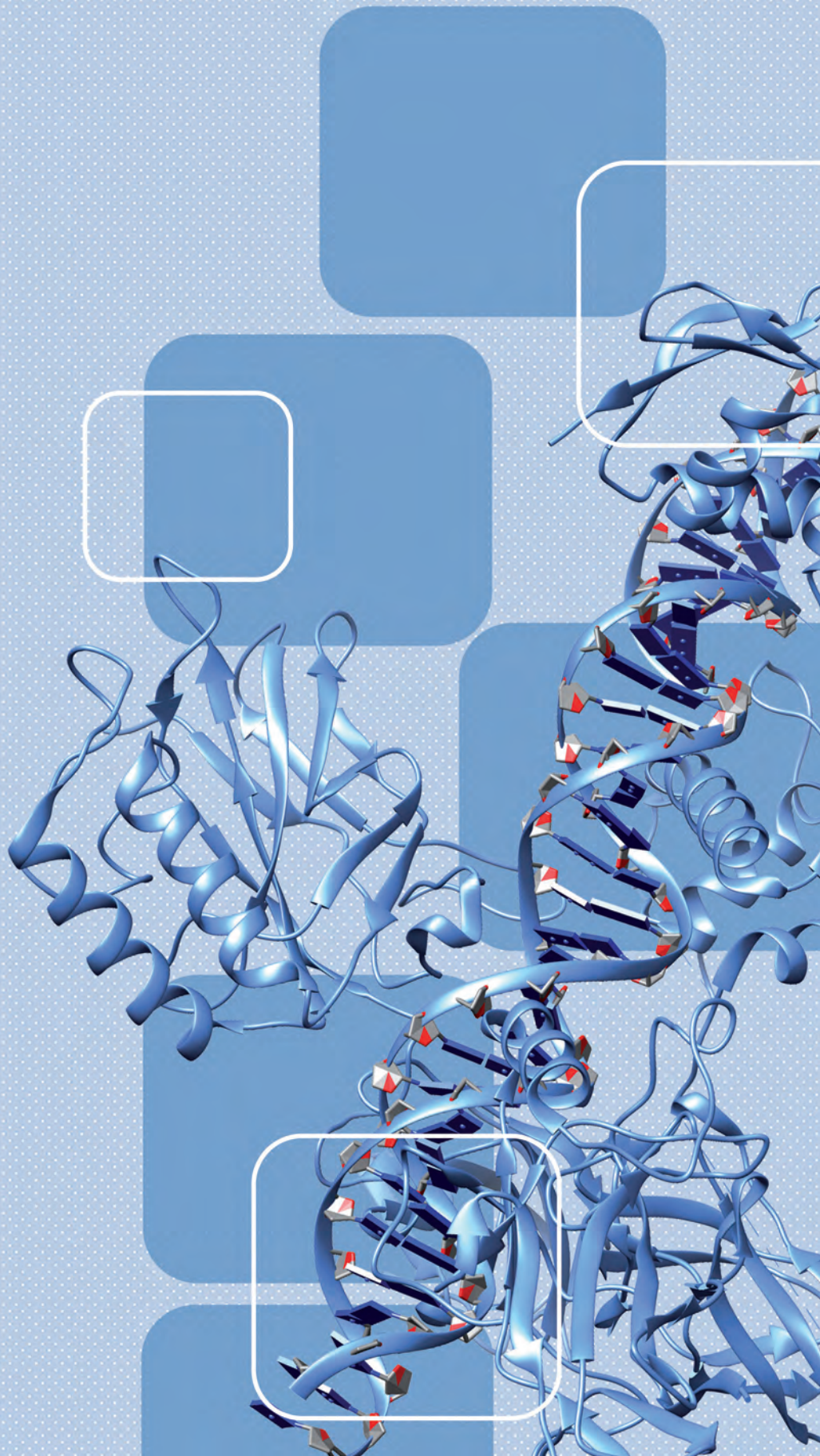
prospect

**BULLETIN
BIOTECHNOLOGICKÉ
SPOLEČNOSTI**

zakládajícího člena
Českého svazu
vědeckotechnických
společností (ČSVTS)

a

člena „European
Federation
of Biotechnology“
(EFB)



Bio prospect

Society address: Institute of Chemical Technology, Technická 3, 166 28 Prague 6, Czech Republic.
Tel.: 420-220 443 151, fax: 420-233 334 769, e-mail: danka.pokorna@vscht.cz, IČO 00570397,
account No.: 19534-061/0100 Komerční banka Praha 6, Dejvická 52, SWIFT CODE: COMBCZTPP

Czech Republic Regional Branch Office as a bridge between European Federation of Biotechnology and Czech Biotechnology Society is located in the Centre of the Region Hana for Biotechnological and Agricultural Research, Šlechtitelů 21, 783 71 Olomouc, Czech Republic

BULLETIN OF CZECH BIOTECHNOLOGY SOCIETY

**founding member of the Czech Association of Scientific
and Technical Societies – <http://en.csvts.cz>**

and

**member of European Federation of Biotechnology
<http://www.efb-central.org>**

Bioprospect, the bulletin of the Biotechnology Society is a journal intended to inform the society members about the most recent developments in this field. The bulletin should supply the vitally important knowledge directly to those who need it and to those who are able to use it properly. In accordance with the rules of the Society, the Bulletin also deals with both theoretical and practical questions of biotechnology. Articles will be published informing about the newest theoretical findings, but many planned papers are devoted to fully practical topics. In Czech Republic there is a growing gap between basic research and production. It is extremely important to reverse as soon as possible the process of further opening of the scissors, and we hope the Bulletin will help in this struggle by promoting both research and practice in our biotechnology. The Bulletin should facilitate the exchange and targeted delivery of information. The editorial board welcome advertisements of products such as chemicals, diagnostics, equipment and apparatus, which have already appeared

on the Czech market, or are projected, enter it. Services, free R&D or production facilities can also be advertised. The editorial board, together with the executive committee of the Biotechnology Society, hope that maybe some information published in the Bulletin, or some new contacts based on it, will give birth to new cooperation with domestic or foreign research teams, to collaborations, joint ventures or strategic alliances providing access to expertise and financing in international markets.

The editorial board invites all of You, who are involved in the field called biotechnology, and who are seeking contacts in Czech Republic, to advertise in the Bulletin BIOPROSPECT, which is mailed directly to more than one and a half thousand Czech biotechnologists.

For more information contacts the editorial board or directly:

Petra Lipovová, Ph.D. (editor in chief)

ICT, Technická 3

166 10 Prague 6, Czech Republic

Phone +420 220 443 028

e-mail: petra.lipovova@vscht.cz

ÚVODEM

Vážení přátelé,

v letošním roce si připomínáme, že uplyne již 25 let od založení naší Biotechnologické společnosti a také Českého svazu vědeckých a technických společností, jehož spoluzakladatelem je i naše společnost. Tuto významnou událost si připomeneme na semináři, který se uskuteční 6. května 2015 v posluchárně VŠCHT AII. Na toto setkání Vás všechny co nejsrdečněji zveme a věříme, že si najdete čas, abychom se na chvíli sešli a nejen zavzpomínali, ale především si připomněli co se v současné době děje v biotechnologiích v České republice. Samozřejmě nemůžeme v krátké vymezené době obsáhnout vše, ale pevně věříme, že výběr informací, které pro Vás připravujeme Vás zaujme. Pokud bude zájem, můžeme v těchto informačních seminářích pokračovat. Podrobnosti o semináři naleznete v přiložené pozvánce a na našich webových stránkách (<http://bts.vscht.cz>).

Rádi bychom připoměli, že naše společnost byla velmi aktivní od samého začátku své existence a již v prosinci 1990 vydala „nulté číslo“ Bioprospectu, které přineslo naši vizi o činnosti společnosti, její první stanoviny i informace o mezinárodních aktivitách v biotechnologiích. V březnu 1991 vyšlo již první regulérní číslo Bioprospectu a nastolili jsme trend čtyř čísel ročně, který dodržujeme dodnes. Dle našeho názoru prodělal Bioprospect pozitivní vývoj jak po stránce obsahové, tak formální. V obsahu Bioprospectu postupně ubývalo běžných informací, který převzaly webové stránky a e-mailové zprávy a zdokonaloval se obsah publikovaných sdělení. Původní bulletin se vlastně změnil na regulérní časopis, který přináší krátké recenzované přehledné články z nejrůznějších oblastí biotechnologií. Redakce přijímá k publikaci články nejen v češtině a slovenštině, ale také v angličtině. Využíváme v tomto směru zejména zahraniční hosty, které žádáme o příspěvek do časopisu. V minulém ročníku jsme pak třetí číslo věnovali některým pracem presentovaným v průběhu

námi organizovaného mezinárodního symposia Bio-Tech 2014 (www.biotech2014.cz). Do budoucna počítáme také s monotematickými čísly, pokud bude o tuto novinku zájem. První vlaštkou tohoto nového trendu je právě první letošní číslo, které představuje výzkumné aktivity Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR. Pokud budou mít některé instituce zájem o podobné monotematické číslo Bioprospectu ať se laskavě obrátí na naši redakci (Petra.Lipovova@vscht.cz).

I po formální stránce doznal Bioprospect řadu pozitivních změn. Několikrát se změnila obálka, daří se dodržovat formální stránku publikovaných sdělení, všechny články obsahují souhrny v angličtině, pokud je článek v češtině, či slovenštině a naopak v češtině, pokud je článek v angličtině. V současnosti pracujeme na dalších vylepšeních, a to vše jen díky dobrovolné práci členů redakční rady a především vedoucího redaktora. V této funkci se během těch 25 let vydávání Bioprospectu vystřídali tři vedoucí redaktori. Jako první působil RNDr. Tomáš Vaněk, CSc následovaný prof. Ing. Ladislavem Fukalem, CSc. V současnosti je hlavním redaktorem doc. Ing. Petra Lipovová, Ph.D. Loňské třetí číslo editoval jako hostující redaktor doc. Ing. Pavel Kotrba, Ph.D. Všem jmenovaným patří velký dík, že se této náročné práci s nadšením věnovali či věnují. Závěrem musíme poděkovat jak vedení VŠCHT, tak ČSVTS za trvalou podporu. Bioprospect vychází nejen v tištěné formě, ale je také (od r. 2006) dostupný na webových stránkách Biotechnologické společnosti.

Věříme, že si i nadále rádi přečtete články, které pro Vás do Bioprospectu připravujeme, ale i jistě mnozí z Vás zde budete rádi publikovat. O historii Biotechnologické společnosti se zmíníme v dalším čísle.

Se srdečnými pozdravy
Vaši
Jan Káš a Petra Lipovová

**Biotechnologická společnost, VŠCHT
a spolupracující organizace**

si Vás dovolují pozvat na seminář

**25 let
Biotechnologické
společnosti**

(1. Část)

konaný **ve středu 6. května 2015**
v posluchárně A II VŠCHT
Praha 6, Technická 3/1903, Budova A

(stanice metra Dejvická, výstup ve směru příjezdu vlaku do ulice Šolínova,
druhou ulicí doleva, budova proti Národní technické knihovně
je budova A VŠCHT, posluchárna je přímo proti vchodu do budovy)

PŘEDBĚŽNÝ PROGRAM:

- 13:00** K. Melzoch, rektor VŠCHT Praha: **Úvodní slovo**
- 13:10** J. Káš: **Stručná historie Biotechnologické společnosti**
- 13:40** J. Masák: **Biotechnologie na VŠCHT**
- 14:10** I. Frébort: **Biotechnologie v Olomouci a okolí**
- 14:40** M. Mandl: **Biotechnologie v univerzitním kampusu
Masarykovy univerzity v Brně**
- 15:10** T. Cajthaml: **Environmentální biotechnologie v MBÚ AV ČR**
- 17:00** Závěr semináře

Vstup je volný pro všechny zájemce

Za organizátory semináře:

Prof. Ing. Jana Zábranská, CSc.

Prof. Ing. Jan Káš, DrSc.

ÚSTAV ŽIVOČIŠNÉ FYZIOLOGIE A GENETIKY AV ČR, v.v.í.

Jan Kopečný, Jan Motlík

ČSAV zřídila k 1. lednu 1963 Laboratoř fyziologie a genetiky hospodářských zvířat se dvěma pracovišti v Uhřetěvsi a v Liběchově. Ty se změnilly na Ústav fyziologie a genetiky hospodářských zvířat ČSAV v roce 1973 a následně na Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR v roce 1993.

Původní badatelská témata, zpočátku téměř plně orientovaná na aplikovaný zemědělský výzkum, se postupně měnila na teoretické studie. Úkoly, na nichž se v současnosti pracuje, se zaměřují od výrazně biomedicínských studií až po témata orientovaná na biodiverzitu a mikrobiota. Propojeny jsou společnou linií sledování fyziologických a genetických parametrů.

ÚŽFG AV ČR patří v systému Akademie věd ČR k ústavům střední velikosti. Skládá se z 12 laboratoří lokalizovaných v Liběchově, Praze a Brně. Má několik společných pracovišť s vysokými školami i s jinými výzkumnými ústavy v ČR. Ústav byl zapojen do Centra buněčné terapie a tkáňových náhrad, Centra pro výzkum biodiverzity, Centra nádorové proteomiky a rozvíjí rozsáhlou mezinárodní spolupráci s renomovanými vědeckými pracovišti od amerického až po asijský kontinent. V rámci strategie AV ČR se podílíme na řešení projektů v oblasti biomedicíny, biodiverzity a potravin. Ústav se také vyznačuje unikátním chovem miniprasat, jež je využíván i mnoha domácími a zahraničními subjekty. Z aktuálně řešených témat jsou nejzajímavější:

Markery chorob

Před 4 měsíci jsme v *Nature Methods*¹ představili nový koncept souběžného pozorování biologických systémů pomocí sentinel, tj. proteinů, které vypovídají o stavu a aktivaci specifických biologických procesů, s využitím metody hmotnostní spektrometrie označované jako SRM (z angl. Selected Reaction Monitoring). Tento přístup nabízí spolehlivý prostředek pro screeningové hodnocení biologických procesů probíhajících v buňkách během fyziologických i patologických podmínek, nebo při působení různých léčiv, což je nezbytným předpokladem k vysvětlení podstaty chorob a nalezení optimální léčby. Práce vznikla ve spolupráci s ETH v Curychu.

Obnova chrupu

Náhrada chybějícího zubu kopírováním vývojového procesu formování zubu představuje mnohem přirozenější alternativu k implantátům. Přitom je nutno vytvořit funkční interakce mezi zubem, okolní kostí a periodontem. Aktuální výzkum v kraniofaciální genetice se proto zaměřuje na mechanismy zodpovědné za správné buněčné a molekulární interakce nejenom v rámci specifického orgánu, ale také v kontextu s přílehlými strukturami. Výsledek studií poskytuje 3D rekonstrukce prvního myšího moláru (M1) během postnatálního období doplněné lokalizací proliferace a apoptózy

a jejich souvislosti s remodelací okolních struktur a formováním alveolární kosti². Vývoj náhradní dentice je sledován u zástupců plazů i savců, kteří mají schopnost vyměnit zuby jednou či několikrát za život.

Molekulární ekologie

Hlavním předmětem vědecko-výzkumné práce Laboratoře molekulární ekologie je odpověď živočichů na změnu klimatu po skončení poslední doby ledové. Studium fylogeografie norníka rudého byla identifikována populace tohoto lesního hlodavce, které mají původ v tzv. „kryptických“ glaciálních refugiích v oblastech pro lesní druhy jinak neobyvatelných. Stávající projekty mají za cíl identifikovat geny odpovědné za fyziologické adaptace, které norníkům umožnily v takových podmínkách přežít, k čemuž využívají širokou škálu metodických přístupů včetně analýzy kandidátních genů a jejich produktů (hemoglobin) a genomové skeny založené na sekvenování nové generace³.

Anaerobní mikrobiota

Anaerobní mikroorganismy v trávicím traktu zvířat a lidí svými počty několikrát převyšují počty eukaryotických buněk hostitele. Komenzální mikroby rozhodují o využívání složek potravy, potlačují růst patogenních mikroorganismů a ovlivňují metabolické a hormonální aktivity hostitele u obratlovců i hmyzu. Změny mikrobiální populace v tomto prostředí mohou vést nebo jsou příznakem zánětlivých střevních onemocnění, pravděpodobně i karcinomu střeva. Podarilo se popsat bakteriální chitinolytickou populaci v trávicím traktu přežvýkavců i lidí. U býložravců se kromě bakterií na utilizaci krmiva v bachoru podílejí i anaerobní houby. Mnohé izoláty vykazovaly unikátní aktivity fibrolytických enzymů, které je možné využít v biotechnologiích. V současnosti probíhá projekt RP7 RUMONOMICS⁴, zaměřený na popis bachorového mikrobiomu, zvýšení utilizace krmiva, snížení globální produkce metanu a amoniaku v chovech skotu a sobů.

Vznik aneuploidie v savčím vajíčku

Letošní číslo *Nature Communications*⁵ publikuje studii skupiny M. Kubelky, A. Šušora a M. Angera o vzniku genetických abnormalit u embrya, které mají původ právě ve vajíčku.

Aneuploidie, která postihuje až 35 % žen po 35. roce života, neboli chybějící či přebývající chromozóm ve vajíčku může vést ke vzniku Downova syndromu. To způsobuje buď mentální retardaci narozeného dítěte, nebo není sluchitelná se životem a způsobuje spontánní potraty v 1. trimestru. Tým zjistil, že potlačení funkce molekulární dráhy mTOR, která je zodpovědná za syntézu specifických bílkovin na správném místě ve správném čase, či její narušení vede ke genomické nestabilitě, i když je vajíčko schopné být oplozeno spermií. Studie také popisuje, že syntéza bílkovin ve vajíčku

neprobíhá ve všech částech této buňky stejně, jak by se mohlo předpokládat, ale probíhá v takzvaném gradientu, který je nezbytný pro vývoj takového vajíčka, které může být základem pro růst zdravého jedince.

Tyto výsledky mají význam nejen pro pochopení primárních kroků při regulaci dějů v této buňce v modelovém organismu myši, ale i pro humánní medicínu.

Projekt ExAM

Z prostředků evropských strukturálních fondů OP VaVpl vzniklo v Liběchově nové centrum špičkových laboratoří PIGMOD (Pig Models of Diseases), jehož výstupy směřují jak do teoretické, tak do aplikační sféry.

Literatura

1. Soste M, Hrabáková R, Wanka S, et al.: *Nat. Methods* 11(10), 1045 (2014).
2. Švandová E, Lesot H, Vanden Berghe T, et al.: *Cell Death & Disease* 5, e1366 (2014).
3. Kotlík P, Marková S, Vojtek L, et al.: *Proc. Royal Soc. B, Biol. Sci.* 281, 1786 (2014).
4. <http://www.ruminomics.eu/>
5. <http://www.nature.com/ncomms/2015/150128/ncomms7078/full/ncomms7078.html>
6. Baxa M, Hruška-Plochář M, Juhás Š, et al.: *J. Huntington's Dis.* 2(1), 47 (2013).

Výzkum vedl k identifikaci nových biomarkerů a ověření terapeutických postupů především u míšního poškození, neurodegenerativních onemocnění a u lidského melanomu. Podařilo se vytvořit plně funkční model Huntingtonovy choroby, který je využíván jak v USA, tak i Evropě⁶. Spolupráce laboratoří Centra PIGMOD s aplikační sférou vedle základního výzkumu představuje podstatnou část objemu vědecké činnosti Centra. Již nyní se laboratoře centra podílejí na řešení řady projektů financovaných soukromými firmami či nadacemi, jako jsou americké HighQ, Neuralstem či holandská uniQure.

HUNTINGTONOVA NEMOC

Gabriela Kocurová, Daniela Pallová, Božena Bohuslavová, Taras Ardan, Jan Motlík

Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, motlik@iapg.cas.cz

Úvodem

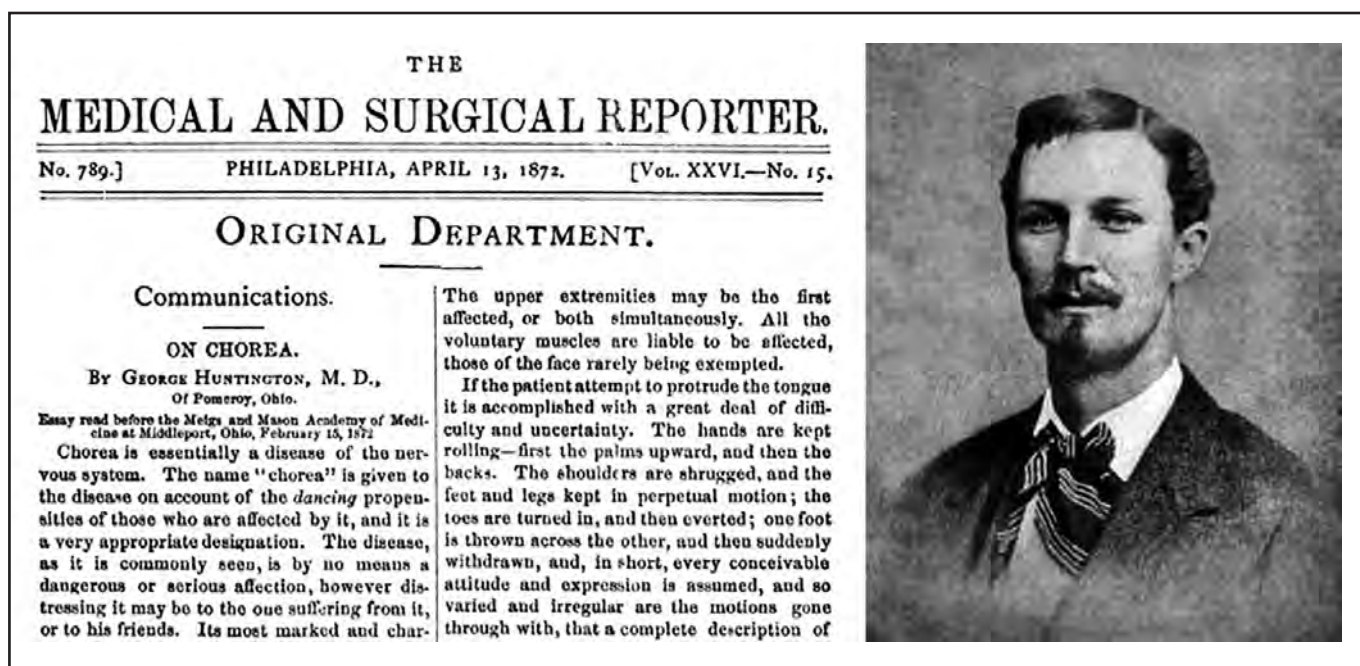
Huntingtonova nemoc (HN) je progresivní dědičné neurodegenerativní onemocnění způsobené expanzí CAG repetice v genu pro protein huntingtin (Htt). Pro HN je charakteristická především rozsáhlá degenerace buněk centrální nervové soustavy, ale mutace má velký dopad i na další orgány a tkáně, protože mutantní Htt je exprimován ve většině tkání. Mechanismy těchto změn nejsou stále dostatečně popsány.

Z historie

Již v roce 1374 byla HN známá jako „taneční mánie“. Zpočátku byly tyto pohyby spojeny s kletbou sv. Víta – proto se onemocnění pojí s názvem tanec sv. Víta, ale až později byly pohyby doprovázející tuto nemoc pojmenovány chorea (Paracelsus, 15. století). První klinický popis choreatických pohybů podal anglický lékař Thomas Sydenham v 17. stol. Základními rysy choroby jako např. manifestace v dospělosti, progresivní průběh s fatálním koncem a choreatické pohyby kombinované s mentálním postižením, byly popsány v 19. stol. americkým praktickým lékařem Georgem Huntingtonem, který je opublikoval v práci *On Chorea* 13. dubna 1872 (Obr. 1). V r. 1911 C. B. Davenport podal přesvědčivé důkazy o tom, že onemocnění se přenáší autozomálně dominantním způsobem. V r. 1983 James F. Gusella identifikoval gen způsobující mutaci jako gen IT15 kódující protein huntingtin a lokalizoval ho na krátké raménko chromozomu 4. Samotná podstata mutace podmiňující vznik nemoci na podkladě zmnožení trinukleotidů (tripletu) CAG, byla objasněna až v roce 1993.

Co způsobuje Huntingtonovu nemoc?

HN má autozomálně dominantní charakter, což znamená, že pravděpodobnost přenosu na potomky je 50%. Jak již bylo výše zmíněno, genetickým podkladem nemoci je mutace krátkého raménka 4. chromozomu, konkrétně oblasti prvního exonu N-terminálního konce genu pro protein huntingtin (4p16.3), kdy dochází ke zmnožení úseku CAG repetice (opakování). Následně se syntetizuje polyglutaminový řetězec a hovoříme o polyQ sekvenci. Polyglutamin je známý pro své časté mutace, odpovídající za řadu chorob, z nichž můžeme zmínit například některé spinocerebelární ataxie (SCA). Nejvíce se klinicky může podobat HN SCA 17 – pacienti mohou mít choreu, kognitivní deficit a poruchy chování odpovídající HN. Proto se v literatuře píše i o tzv. fenokopii HN nebo „huntington like disease“. CAG sekvence má expanzivní sklony, DNA polymerasa při kopírování genomu v tomto místě občas „klouže“, prodlužuje uvedenou repetici, a tím dochází k případům nezděděného, tedy *de novo* výskytu HN. Fyziologicky se v tomto úseku nachází průměrně 16 – 20 opakování. Při počtu 27 – 35 opakování se již jedná o nestabilní formu genu pro huntingtin s až 10% rizikem mezigeneračního prodloužení. Při počtu 36 – 39 opakování je prognóza nejistá, jedinec může, avšak nemusí onemocnět. U jedinců s počtem tripletů vyšším než 40 je již velká jistota nástupu klinických projevů HN⁵. Kromě prodloužení úseku jsou popsány i případy kontrakce, tedy redukce počtu tripletů⁶. Mezi počtem opakování a nástupem klinických projevů obecně platí inverzní korelace, tzn. u osob s vyšším počtem opakování dochází ke snížení věkové hranice nástupu klinic-



Obr. 1: George Huntington poprvé popsal chorobu ve své práci *On Chorea* v roce 1872.

kých příznaků. Vyšší počet tripletů je pozorován spíše u osob s paternálním přenosem vzhledem ke snadné expanzi tripletů během spermatogeneze⁸. Počet tripletů není jediným určujícím faktorem nástupu příznaků. Předmětem diskuzí o zařazení mezi potencionálními faktory ovlivňující věk propuknutí nemoci je studium polymorfismu genů interagujících či asociovaných s huntingtinem⁹.

Výskyt HN

Prevalence je uváděna v rozmezí 3 – 10 nemocných na 100 000 obyvatel a vyznačuje se geografickými rozdíly. Přičemž vyšší prevalence je zaznamenána v Evropě a v zemích osídlených Evropany (Kanada, Amerika, Austrálie), avšak v Japonsku a dalších zemích Dálného Východu, stejně jako v Africe, jsou případy HN zaznamenány také². Vzhledem k problémům s diagnostikou onemocnění je málo přesných statistických dat. Podle Ewansovy studie vydané r. 2013 došlo ve Velké Británii během let 1990 až 2010 k více než zdvojnásobení prevalence HN nemocných, a to z 5,4 na 12,3 nemocných (počítáno na 100 000 obyvatel), přičemž nejvýraznější nárůst byl pozorován ve věkové skupině 51 – 60 let. Přesnější diagnostika, lepší terapie a s tím související prodloužená délka života mohou být těmi faktory, které stojí za nárůstem prevalence HN v populaci. Rovněž větší ochota zaznamenávat probíhající HN do elektronických zdravotních karet hraje v tomto nárůstu svou roli. Pro Českou republiku nejsou přesná data známa, předpokládá se však, že celkový počet nemocných je okolo 1000³.

Formy a projevy

Průběh HN není vždy jednotný a rozlišujeme několik forem této nemoci.

Klasická forma

První příznaky se objevují mezi 35 – 50. rokem života. Počáteční problémy jsou nespecifické – změny osobnosti a poruchy chování (např. deprese, úzkost, iritabilita). Později poruchy pozornosti, učení, krátkodobé paměti, mentální flexibility. Charakteristické jsou také mimovolní pohyby a porucha cílených pohybů (Obr. 2). V pozdějším stadiu se projeví demence a dochází k rozvoji nestability a pádům. Nedílnou součástí nemoci jsou poruchy artikulace, polykání a váhový úbytek. V pokročilém stádiu mimovolní pohyby postupně ubývají. Průběh nemoci je individuální, ale každý pacient se zhruba v průběhu 15 let stává závislým na péči okolí.

Juvenilní forma

Začíná obvykle před 20. rokem života, v 0,5% případech jsou pacienti s klinickými příznaky mladší 10 let. Prevalence je přibližně 5% z celkového počtu postižených HN. Typickým začátkem je nevládní školních aktivit v důsledku kognitivních poruch a motorického zpomalení. Jasným příznakem je diskoordinace pohybů. Pozorujeme takové poruchy chování, jako jsou výbuchy zlosti, agresivita, asociální chování. Rigidita, dystonie a hypokineze jsou hlavní příčinou rychle progresující poruchy stability a chůze. Mimovolní pohyby u této formy se obvykle neobjevují. Asi ve 30% případů jsou registrovány epileptické záchvaty. Dochází také k poruchám polykání a výslovnosti. Rychlá progresse vede k demenci a nesamostatnosti, kdy je pacient celkově závislý na péči okolí.

Forma s pozdním nástupem

První příznaky pozdní formy HN se začínají objevovat u pacientů okolo 60. roku života. Velmi výjimečně u ně-



Obr. 2: Pro HN jsou typické choreatické pohyby a mentální postižení.

kterých pacientů dochází k rozvoji příznaků po dovršení 70 let. Prevalence je okolo 5 %. Tato forma má pomalý průběh a pacienti se dožívají průměrného věku zdravé populace. Hlavním příznakem jsou mimovolní pohyby. Základní denní aktivity pacient zvládá a je po motorické stránce soběstačný. K výrazné demenci rovněž většinou nedochází^{19, 20}.

Patogeneze a léčba

Pro HN je charakteristické poškození projekčních striatálních neuronů. V první řadě se jedná o GABAergní neurony produkující enkefaliny, na nichž jsou uloženy D2 dopaminové receptory. Následně dochází k degeneraci neuronů s D1 dopaminovými receptory produkujícími kromě GABA také substanci P. Interneurony nevykazují tolik známky poškození. Buněčná ztráta se projevuje jako atrofie striata a je pozorovatelná pomocí zobrazovacích metod, jako jsou CT či MR. Kromě striata dochází v pozdějších stádiích onemocnění k poškození dalších struktur mozku (např. mozkové kůry). Tato poškození jsou často spojená se zvýšenou proliferací gliových buněk, což je známkou nástupu určitých reparačních procesů. Konečným stavem je celková atrofie mozku⁴.

Mechanismus vzniku a patogeneze HN není zcela objasněn, ale existuje několik teorií. První z nich poukazuje na skutečnost, že se buňky zabíjejí samy, a to v důsledku chemických změn vyvolaných HN. Onemocnění spouští předčasnou smrt neuronů urychlením apoptózy – vědci zjišťují, zda za to může přítomnost pozměněného huntingtinu. Vložili lidský mutovaný HN gen myším, aby mohli studovat osud jejich nervových buněk a zjistili, že se u myši vyskytují rovněž shluky proteinu Htt (agregáty), stejně jako v nervových buňkách pacientů s HN. Jiné studie prokázaly, že agregáty ve skutečnosti obsahují jen část změněného Htt, z něhož se pravděpodobně v určité chvíli odštěpila část s mutovaným polyglutaminem. Vznikají tak cytotoxické fragmenty proteinu, které končí v buněčném jádře. I když zatím neexistuje žádná léčba, která by zastavila nebo zvrátila průběh tohoto onemocnění, mohou být použity léky upravující některé poruchy chování a hybnosti spojené s HN. Je však důležité mít na paměti, že se tím pomáhají udržet klinické příznaky pod kontrolou, i když pouze po určitou dobu, ale neléčí se samotná nemoc.

Struktura a funkce huntingtinu

Huntingtin (Htt) je protein nacházející se fyziologicky v těle. Patří k ubikviterním proteinům a je exprimován ve všech buňkách těla, nejvíce v mozku a testes¹⁰.

Literatura

1. Zuccato C, Valenza M, Cattaneo E: *Physiol. Rev.* 90(3), 905 (2010).
2. Hoogeveen AT, Willemsen R, Meyer N, et al.: *Hum. Mol. Genet.* 2(12), 2069 (1993).
3. MacDonald ME, Ambrose CM, Duyao MP, et al.: *Cell* 72.6, 971 (1993).
4. Goldberg YP, Kremer B, Andrew SE, et al.: *Nat. Genet.* 5.2, 174 (1993).

V nervových buňkách je přítomen v cytoplasmě. Co se týče struktury, obsahuje několik oblastí, a to N-terminální část (17 aminokyselin), Poly(Q) úsek, Poly(P) úsek, C-konec a tzv. HEAT domény. Htt zasahuje např. do buněčného transportu, mitochondriálních funkcí, synaptického přenosu a také do exprese jiných proteinů. K nejdůležitějším z nich patří mozkový neurotrofní faktor (BDNF, brain-derived neurotrophic factor), jež se účastní přenosu látek uvnitř neuronu, ovlivňuje adaptaci na poškození a oxidační stres, rovněž má antiapoptotický účinek (ovlivňuje buněčnou smrt). Huntingtin je ale významný nejen pro centrální nervovou soustavu, ale účastní se také hematopoézy (krvetočby) nebo působí na vývoj plodu. Jedná se o protein pro organismus zcela nepostradatelný. Úplná ztráta genu pro Htt (tzv. knock-out) u zvířecích modelů vedla k výrazné poruše neurogeneze neslučitelné se životem¹³.

Molekulová hmotnost (kolem 348 kDa) a délka (asi 3 144 aminokyselin) huntingtinu závisí na počtu CAG opakování. Zvýšený počet opakování je zodpovědný za patologickou konformaci proteinu do formy beta skládaného listu, jež se fyziologicky nevyskytuje. U mutovaného proteinu dochází ke změně jeho funkce s toxicými následky. Patogeneze spojená s mHtt je stále předmětem zkoumání, nicméně hovoří se o excitotoxicitě, oxidačním stresu, apoptotických procesech, aktivaci mikroglie, mitochondriální dysfunkci, defektu neurogeneze¹⁴, poruchách axonálního a vezikulárního transportu, poruchách postsynaptické signalizace a transkripčních poruchách¹⁵. Je předpokládán také vliv patologického Htt na ubikvitin-proteazomový¹⁶ a lysosomový systém¹⁷. Mutovaný Htt má díky své změněné konformaci a defektům v proteolytických systémech tendenci k agregaci, kdy v jádrech neuronů nacházíme v pozdějších stádiích nemoci inkluze Htt a v cytoplasmě jsou pozorovatelné agregáty Htt. Význam agregátů není zcela objasněn. Přes počáteční předpokládanou toxicitou funkci se v novějších studiích objevuje hypotéza tvorby agregátů jako protektiva před škodlivými účinky volných a intermediárních forem Htt. Podle některých studií neurony bez inkluze a agregátů umírají rychleji než neurony s těmito formacemi¹⁸.

Závěr

Huntingtonova nemoc je jedním z onemocnění, na které stále nebyl nalezen vhodný lék. Z toho důvodu probíhá mnoho studií zabývajících se osvětlením patogenetických mechanismů této zákeřné nemoci s jediným cílem, nalezení vhodné terapie. Následující příspěvky se snaží o charakterizaci HN z několika pohledů, na něž se soustřeďuje výzkum ÚŽFG v Liběchově.

5. Kremer B, Goldberg P, Andrew SE, et al.: *N. Engl. J. Med.* 330(20), 1401 (1994).
6. Kovtun IV, Welch G, Guthrie HD, et al.: *J. Biol. Chem.* 279(10), 9389 (2004).
7. Leeflang EP, Zhang L, Tavaré S, et al.: *Hum. Mol. Genet.* 4(9), 1519 (1995).
8. Wexler NS, Lorimer J, Porter J, et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U S A* 101(10), 3498 (2004).

Literatura (pokračování)

9. Pringsheim T, Wiltshire K, Day L, et al.: *Mov. Disord.* 27, 1083 (2012).
10. Evans SJ, Douglas I, Rawlins MD, et al.: *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 84(10), 1156 (2013).
11. Roth J, Klempíř J, Uhrová T.: *Psych. pro praxi* 10(5), 205 (2009).
12. Roth J: *Neurol. pro praxi* 13(3), 131 (2012).
13. Aylward EH, Codori AM, Rosenblatt A, et al.: *Mov. Disord.* 15(3), 552 (2000).
14. DiFiglia M, Sapp E, Chase K, et al.: *Neuron.* 14(5), 1075 (1995).
15. Mangiarini L, Sathasivam K, Seller M, et al.: *Cell* 87(3), 493 (1996).
16. Zeitlin S, Liu JP, Chapman DL, et al.: *Nat. Genet.* 11(2), 155 (1995).
17. Roth J: *Lékařské listy* 7, 17 (2009).
18. Gil JM, Rego A: *Eur. J. Neurosci.* 27(11), 2803 (2008).
19. Petrucelli L, Dawson TM: *Ann. Med.* 36(4), 315 (2004).
20. Ravikumar B, Duden R, Rubinsztein DC: *Hum. Mol. Genet.* 11(9), 1107 (2002).
21. Saudou F, Finkbeiner S, Devys D, et al.: *Cell* 95(1), 55 (1998).

Souhrn

Kocurová G., Pallová D., Bohuslavová B., Ardan T., Motlík J.: Huntingtonova nemoc

Huntingtonova nemoc je progresivní dědičné neurodegenerativní onemocnění s autozomálně dominantním typem dědičnosti a nástupem klinických příznaků okolo 30 – 50 roku života. Podkladem nemoci je mutace genu pro protein huntingtin. Dochází ke zmožení CAG repetice a syntéze polyglutaminu. Vlivem odumírání neuronů se objevuje mozková atrofie, pacient trpí změnami nálad, zhoršením kognitivních a motorických funkcí, depresemi. Nakonec dochází k celkovému rozpadu osobnosti.

Klíčová slova: Huntingtonova nemoc, huntingtin, CAG repetice, chorea, demence, deprese, GABAergní systém

Summary

Kocurová G., Pallová D., Bohuslavová B., Ardan T., Motlík J.: Huntington's disease

Huntington's disease is a hereditary progressive neurodegenerative disease with an autosomal dominant pattern of inheritance and the onset of clinical symptoms about 30 to 50 years of age. A basis of the disease is a mutation of gene for a huntingtin protein. There is a multiplication of CAG repeats and the synthesis of polyglutamine. Due to death of neurons, a cerebral atrophy occurs, patients suffer from mood swings, impairment of cognitive and motor functions, depression. Finally, there is an overall personality breakdown.

Keywords: Huntington's disease, huntingtin, CAG repeats, chorea, dementia, depression, GABAergic system

TESTIKULÁRNA DEGENERÁCIA PRI HUNTINGTONOVEJ CHOROBE

Božena Bohuslavová, Monika Mačáková

Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, bohuslavova@iapg.cas.cz

Menej známym obrazom Huntingtonovy choroby (HD) u ľudí sú zmeny na reprodukčnom ústrojenstve mužov. HD je chorobou stredného veku. Jej klinický obraz sa rozvíja u tzv. ľudí v riziku, nositeľov génu pre HD, najviac od 35 – 50 rokov veku. Len malý počet ľudí v riziku (10 %) vykazuje symptómy pred 20 rokom života. Muži s génom pre HD teda môžu splodiť deti včas, ešte pred prvými príznakmi. Treba uviesť ešte jeden zaujímavý fakt, a to že osobám v riziku je odporúčané využiť služby asistovanej reprodukcie s prenatalným genetickým skríningom HD, čo môže také uľahčiť oplodnenie aj u menej kvalitných spermii. Poruchy reprodukčnej sústavy u HD bola prvýkrát zistená u myších modelov HD. Neskôr sa tento fenomén skúmal na posmrtných vzorkách pacientov s HD. Celková testikulárna degenerácia sa prejaví abnormálnou morfológiou semenotvorných kanálikov a atrofiou semenníkov.¹ Zo štúdií došli vedci k výsledku, že pacienti s Huntingtonovou chorobou majú výrazne zníženú spermiogézu.²

Spermiogéza a spermiácia

Spermiogéza začína v období pohlavného dospievania. Prebieha počas celého obdobia pohlavného života. Uskutočňuje sa v semenotvorných kanálikoch semenníka. Nástup spermiogézy je pod kontrolou

gonadotropných hormónov hypofýzy. Spermiogézu reguluje folikulo-stimulačný hormón (FSH). Dochádza k redukcii chromozómov a zo spermiocytov vznikajú spermatické. Poslednou fázou spermiogézy je spermiogénéza. Je to metamorfóza spermatických, počas ktorej sa okrúhla, nepohyblivá spermatická premieňa na štíhlu pohyblivú spermii.¹ V priebehu metamorfózy vznikajú špecifické štruktúry spermie potrebné na oplodnenie. Vytvára sa akrozóm, bičik a súčasne sa spermia zbavuje vody a nepotrebných organel. Nakoniec dochádza k spermiácii. Ide o proces, pri ktorom sú dozreté spermatické uvoľňované zo Sertolihových buniek do semenotvorných kanálikov. Tá sa vykonáva v priebehu niekoľkých dní na apikálnom okraji semenotvorného epitelu a zahŕňa niekoľko krokov, vrátane remodelácie hlavy spermatickej a odstránenia špecializovaných adhézných štruktúr až po konečné uvoľnenie spermatických zo Sertolihových buniek.¹

Chyby v spermiácii

V priebehu spermiácie môžeme pozorovať rôzne poruchy. Z jednou z najčastejších chýb je oneskorené prepúšťanie spermatických zo Sertolihových buniek. 30 % spermatických, ktorým sa nepodarí prejsť Sertolihovou bunkou, sú touto bunkou fagocytované.¹ Predpokladá sa, že niektoré chyby spermiácie nesmú obmedzovať uvoľne-

nie spermatíd, ale budú mať za následok uvoľnenie spermatíd s abnormálnou morfológiou.¹ Abnormálna spermiácia môže mať negatívny vplyv na skorší vývoj zárodočných buniek.

Regulácia spermiácie

Zlyhanie spermiácie môže byť známkou toho, že v semenníkoch nie je všetko v poriadku. Tie sú vysoko citlivé na niektoré narušenia, predovšetkým na látky toxické pre reprodukciu. Tá je regulovaná na mnohých úrovniach rôznych signálnych dráh.

Endokrinné a parakrinné regulácie

Spermiácia reaguje na zmeny testikulárnych hormónov. FSH a androgény pôsobiace na receptory v Sertoliho bunkách, sú hlavné regulátory spermiácie. Ak tieto hormóny chýbajú (napríklad po hypofysectómii) dochádza k spomaleniu, až k následnému zastaveniu spermiácie. Estrogén môže taktiež regulovať spermiáciu¹. Estradiol potláča FSH a intertestikulárne hladiny testosterónu. Tento režim zvyšuje apoptózu buniek, čo značne indukuje zmeny spermiácie.

Kyselina retinová, ktorá sa metabolizuje z retinolu (vitamín A) účinkuje väzbou na retinoidné receptory. Tie riadia expresiu génov. Kyselina retinová pôsobiaca na retinoidný receptor v Sertoliho bunkách je taktiež nevyhnutná pre spermiáciu.¹

Oxytocín je produkovaný v Leydigových bunkách v dobe, ktorá sa zhoduje so začiatkom spermiácie. Stimuluje kontraktilitu semenotvorných kanálikov. U zvierat, ktorým bolo v nadmernom množstve podávaný oxytocín dochádzalo skôr k spermiácii. Naopak pri nedostatku oxytocínu k začiatku spermiácie dochádza neskôr.¹

Testikulárna degenerácia pri Huntingtonovej chorobe

Pacienti s Huntingtonovou chorobou majú špecifickú reprodukčnú patológiu, pri ktorej dochádza k zníženiu počtu zárodočných buniek a abnormálnej morfológii semenotvorného kanálíka.² Dochádza k zníženiu hla-

diny testosterónu a k strate Gonadotropných (GnRH) neurónov v hypotalame, k porušeniu trasy hypotalamus – hypofýza – gonády. To naznačuje, že testikulárna patológia je výsledkom pôsobenia priameho toxického účinku mutovaného proteínu huntingtínu v semeníku a je podporovaná skutočnosťou, že huntingtín má vysokú expresiu ovplyvňujúcu bunkovú populáciu v semenníkoch. Z pokusov vyplýva, že expresia proteínu huntingtínu v mozgu je veľmi podobná expresii proteínu v semenníkoch.² Podobne, ako v mozgu dochádza k atrofii, môžeme túto atrofiu pozorovať i v semenníkoch.

Porušenie trasy hypotalamus – hypofýza – gonády

Mnohé práce poukazujú na deficity trasy hypotalamus – hypofýza – gonády (HHP). V hypotalame sa produkuje GnRH, ktorý stimuluje tvorbu Luteinizačného hormónu (LH) a FSH z hypofýzy. Následne LH stimuluje Leydigove bunky v semenníkoch k produkcii testosterónu. FSH interaguje so Sertoliho bunkami a stimuluje vývoj spermií. Bolo preukázané, že mužskí pacienti majú znížené hladiny LH a testosterónu, ale hladiny FSH nie sú pozmenené.²

Van Raamsdonk a kol. 2007 došli k výsledku, že pacienti s Huntingtonovou chorobou majú výrazne zníženú spermiogézu.² S porovnávaním zo zdravými pacientmi dochádza k signifikantnému zníženiu počtu spermatocytov a spermatíd. U niektorých pacientov sa zdajú byť semenníky aspermické. Bola zistená úplná absencia spermií. Taktiež u pacientov môžeme pozorovať silnejšiu stenu semenotvorných kanálikov oproti zdravým kontrolám. Na základe bodovacieho systému podľa závažnosti zmien v semenníkoch, ďalej počtu spermií a spermatocytov, hrúbky stien tubulov a priemeru prierezov semenotvorných kanálikov sa zistilo, že vzorky s najdlhším počtom opakovaní CAG repetícií mali najzávažnejšie poškodenia. Van Raamsdonk (2007) uvádza, že expresia proteínu Huntingtínu v mozgu je veľmi podobná expresii proteínu v semenníkoch². Tento poznatok nám môže byť nápomocný pri dlhodobých štúdiách vplyvu mutantného Htt na zvieracie modely HD.



Obr. 1: Atrofia semenníka transgénneho mini prasaťa s Huntingtonovou chorobou. Vľavo vidíme semenník zdravého kanca, semenotvorné kanáliky sú priechodné a plne funkčné. Vpravo je semenník od transgénneho zvierťaťa, ktorý je atrofický, semenotvorné kanáliky sú atrofované, skoro nepriechodné. Kanci boli zabitý vo veku 36 mesiacov.

Foto – ÚŽFG AV ČR Liběchov

Transgénné miniprasata tgHD a fertilita tgHD kancov

Miniprasa je vhodný druh pre štúdium prejavov choroby, pretože má veľký gyrencefalický mozog a dlhý život.³ Navyše hlboké znalosti reprodukcie prasiat umožňujú priame neinvazívne porovnávanie reprodukčných parametrov medzi transgenným zvieratom a kontrolou v určitom veku.⁴ Kanci pohlavne dospievajú vo veku 5 – 6 mesiacov.

Náš výskum môžeme rozdeliť na pokusy za života mini prasaťa a po smrti zvierťa

Pokusy počas života mini prasaťa

Po odbere a spracovaní semena určujeme počet spermíí v ejakuláte, ich progresivitu a motilitu. Na presné zistenie týchto parametrov používame Sperm Cell Analyzer. Zo spracovaného semena, ktoré uskladňujeme v chladničke, robíme „survival test“. Ide o každodenné meranie progresivity a motility spermíí počas piatich dní za sebou. Semeno môžeme taktiež použiť na vykonanie penetračného testu, aby sme zistili schopnosť či sú spermie schopné penetrovať do oocytu. Na zistenie lokalizácie proteínu huntingtínu vykonávame imunohistochemické pokusy. Približne raz za štvrt roka posielame vzorky semena do pražského laboratória, na určenie mitochondriálnych abnormalít u spermíí.

Počet spermíí v ejakuláte u kancov vo veku 13 – 26 mesiacov bol signifikantne znížený.³ Priemerný počet spermíí u TgHD bol medzi $2,45 - 3,65 \times 10^9$ oproti $8,15 - 12,48 \times 10^9$ u WtHD kancov.

Pokusy po smrti zvierťa

Po humánnom zabití zvierťa, a odobratí semenníka s prisemenníkom prikočíme k ich preplachu. Zo získaných spermíí urobíme analýzu Sperm Cell analyzerom. Následne semeno spracujeme a môžeme ho použiť na imunohistochemické reakcie. Okrem semena na imunohistochemické pokusy použijeme aj semenník.

Prvé predbežné pokusy ukázali, u TgHD kancov, ktorý mali výrazne zníženú reprodukčnú schopnosť, došlo k atrofii semenníkov a semenotvorných kanálikov. Veľkosť semenníka u WtHD kanca bol 7×5 oproti semenníku TgHD kanca s veľkosťou $5,7 \times 4$ cm.

Literatura

1. O'Donnell L, Nicholls PK, et al.: *Spermatogenesis* 14, (2011).
2. Van Raamsdonk JM, et al.: *Neurobiol. Dis.* 26, 512 (2007).

Súhrn

Bohuslavová B., Mačáková M.: Testikulárna degenerácia pri Huntingtonovej chorobe

Pri Huntingtonovej chorobe dochádza k testikulárnej degenerácii. Tá je následne príčinou zníženej reprodukčnej schopnosti pacientov. Do teraz ale nie je zistená presná príčina spôsobujúca poruchu spermiogenézy. Následnými štúdiami by sa mohla táto príčina objasniť a tým taktiež napomôcť k objasneniu patogenézy mutovaného huntingtínu.

Kľúčové slová: Huntingtonova choroba, semenník, spermia

Summary

Bohuslavová B., Mačáková M.: Testicular degeneration in Huntington's disease

One of the effect of Huntington's disease is the testicular degeneration. It causes a reduced reproductive capacity of patients. Unfortunately, up to now the exact cause of the malfunction of spermiogenesis is not know. Subsequent studies could clarify the cause and thus help to clarify the pathogenesis of mutated huntingtin.

Keywords: Huntingotnova disease, testes, sperm



Obr. 2: Oplodnený oocyt. Penetračný test: oplodnený oocyt s 2 prvojadrami a 1 dekondezujúcou sa spermiou s uvoľneným bičíkom. (polyspermia je bežná v *in vitro* oplodnení u prasačích oocytov pozn.) Bol použitý mikroskop CARL ZEIS JENA, zväčšenie obrázku je 25x.

Foto – ÚŽFG AV ČR Liběchov

Záver

Výsledky mnohých štúdií poukazujú na výrazné poškodenie reprodukčných parametrov u pacientov s Huntingtonovou chorobou. Tieto zmeny nepozorujeme len u ľudí, ale môžeme ich pozorovať aj u transgenných prasiat, alebo u transgenných myšší. Našou snahou je čo najlepšie preskúmať mechanizmus škodlivého pôsobenia Huntingtonovej choroby na reprodukčný aparát a ozrejmiť i patogenézu ochorenia.

Poděkování: Financováno z projektu 7F14308 Czech-Norwegian Research Programme a výzkumného Centra PIGMOD (C2.1.05 12.1.00103.0124).

3. Baxa M, et al.: *J. Huntington's Dis.* 47 (2013).
4. Mačáková M, Pavlok A, et al.: *Poster abstract* 84, 8th Annual HD therapeutics conference: a forum for drug discovery & development 105, (2013).

ZVÍŘECÍ MODELY HUNTINGTONOVY NEMOCI

Daniela Pallová, Zdenka Ellederová

Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v. v. i. Liběchov, pallova@iapg.cas.cz, ellederova@iapg.cas.cz

Úvod

Vnesením mutace způsobující vznik Huntingtonovy nemoci (HN) do genomu nejrůznějších živočichů, můžeme sledovat některé patofyziologické mechanismy a buněčné pochody, připomínající onemocnění u lidí. Onemocnění je způsobeno expanzí trinukleotidu CAG (cytosin-adenin-guanin) v genu pro protein huntingtin (Htt). HN má autozomálně dominantní charakter, což znamená, že pravděpodobnost přenosu na potomky je 50%. Projevuje se mimovolnými pohyby, poruchami chování a kognitivních funkcí. Vědecký pokrok v HN se opírá o dostupnost vhodných zvířecích modelů, které umožňují nahlédnout do genetiky, či do patofyziologie této nemoci. Od identifikace genu zodpovědného za HN byla vyvinuta řada zvířecích modelů tohoto onemocnění. Velké zvířecí modely, jako jsou například domácí hospodářská zvířata, nabízejí některé výrazné výhody oproti hlodavcům. Ať už je to větší mozek, který je přístupný pro zobrazování a intracerebrální terapie, delší životnost, nebo podobná morfologie a funkce orgánu. Nejčastější otázka však zní, který z těchto modelů nejvíce rekapituluje lidskou nemoc?

Bezobratlé modely HN

Nejčastěji studovanými zvířecími modely jsou hlodavci, ale také se používají nesavčí modely HN. Příkladem jsou modely bezobratlých, jako je hádátka obecná *Caenorhabditis elegans*, octomilka obecná *Drosophila melanogaster*, nebo dánío pruhované *Danio rerio*, které umožňují rychlé testování specifických hypotéz a nových terapeutických strategií¹. Tato zvířata v mnoha ohledech rekapitulují lidské onemocnění, včetně buněčné smrti a tvorby agregátů. Zároveň krátká životnost bezobratlých umožňuje jednoduše a levně vytvářet velké množství zvířat. Nicméně důkladné zhodnocení procesů vyvolávajících HN, jež je nezbytné pro vývoj nových léčebných postupů, vyžaduje v konečném důsledku komplexnější modely².

Myší modely HN

Dominantní charakter genové mutace HN umožnil snadno vytvořit genetické modely v několika druzích s mutací způsobující abnormální neurologický fenotyp u všech zvířat, ve kterých je exprimován. Byly vytvořeny myší a potkaní linie nesoucí buď zkrácenou nebo celou (full-length) formu mutovaného genu pro huntingtin a to vloženého do genomu náhodně (transgenní modely), nebo specificky do genového lokusu pro Htt daného organismu (knock-in modely).

Transgenní modely

R6/1 a R6/2 transgenní myší modely byly nejprve charakterizovány Batesovou a kol., a stále patří mezi nejrozšířenější transgenní myší modely³. Nejlépe popsaným a nejčastěji používaným modelem jsou R6/2

myši nesoucí repetici se 144 tripletů CAG a vykazující progresivní pohybový deficit, rychlý úbytek hmotnosti, poruchy učení a paměti, poruchy chování (Obr. 1)². Velký počet opakování v modelu R6/2 odpovídá juvenilnímu nástupu příznaků HN u lidí. U některých R6/2 myší je známo, že se příznaky objeví již ve 4 týdnech, i když průměrný věk nástupu symptomů je 9. -11. týden. Zvířata umírají v průměru ve věku 10 až 13 týdnů, zřídka přežívají víc než 14 týdnů².



Kontrola

R6/2

Obr. 1: Srovnání R6/2 transgenní myši a kontroly ze stejného vrhu. Vzhledem k extrémní délce CAG opakování jsou projevy HN u transgenů velmi výrazné. R6/2 transgenní myš demonstrující stočení do klubíčka při pověšení za ocas, zatímco kontrola se chová pasivně².

Myši R6/2 nesou v genomu menší počet CAG repetic než myši R6/1, a proto u nich pozorujeme mírnější příznaky, pozdější nástup nemoci, kolem 13. – 20. týdne a také delší dobu přežívání, většinou víc než rok². Tento transgenní model se nepoužívá tak často jako model R6/2, proto je také méně prozkoumán.

Borchelt a kol. vytvořili N171-82Q transgenní myší model exprimující 171 N-terminálních aminokyselin lidského Htt pod kontrolou myšího promotoru, jehož fragment obsahuje 82 CAG repetic, proto se příznaky projeví až po několika měsících, umírají okolo pátého měsíce⁴. Právě pro pozdější nástup motorických symptomů a striatální degenerace je tento model atraktivní pro studium presymptomatických terapií.

Knock-in modely

Knock-in myší modely jsou z genetického hlediska považovány za nejvhodnější pro studium HN. Vytvoření těchto myší zahrnuje nahrazení části myšího genu pro Htt mutantní lidskou kopií, která obsahuje expandovanou oblast CAG. Tyto myší modely se vyznačují pozdějším nástupem behaviorálních a neuroanatomických změn. Nicméně jejich poruchy chování nejsou tak výrazné jako u transgenních modelů, a když jsou přítomny, obvykle trvá mnohem déle než se vyvinou².

Kondicionální modely

V r. 2000 Yamamoto a kol. vytvořili kondicionální myši model HN, u kterého je možné inaktivovat mutovaný gen tetracyklinem podaným v potravě. Překvapivě byl po inaktivaci pozorován úbytek vytvořených agregátů Htt a došlo i ke zlepšení klinického stavu zvířete⁵.

Dostupnost množství různých myších modelů HN poskytuje výkonné nástroje pro preklinické testování terapeutických strategií, protože myši mají podobné genetické pozadí a délky repetice CAG jako lidé. Kromě toho látky mohou být testovány na zvířatech před nástupem choroby a údaje mohou být změřeny poměrně rychle vzhledem ke krátké životnosti mnoha myších modelů HN⁶.

I když není pochyb o tom, že díky hlodavcům s HN se dosáhlo mnoho vědeckých poznatků, jejichž užitečnost ale limituje několik omezení. Za prvé mozky hlodavců se významně liší od člověka, jak v jejich malé velikosti, tak i v jejich neuroanatomické organizaci a za druhé hlodavci mají mnohem kratší délku života než lidé, čím se vylučuje možnost studovat dlouhodobé změny⁷. Právě z těchto poznatků vzniká potřeba hledání nových velkých zvířecích modelů HN.

Velké zvířecí modely HN

Velké savčí modely HN mohou prokázat patologické rysy, které jsou více podobné pacientům, a proto mohou pomoci odhalit více účinných terapeutických cílů⁸.

Z hlediska vývoje jsou člověku nejbližší někteří primáti – opice. Mají podobné genomy a stavbu mozku jako člověk, čímž představují unikátní zvířecí modely pro studium patogeneze a průběh nemoci. Primátům jako modelům HN se věnuje jen několik týmů badatelů. Anthony Chan a kol. vytvořili skupinu kontrolních a HN opic makak rhesus (*Macaca mulatta*) pro dlouhodobé studium kognitivních poruch a poruch chování pomocí nukleární magnetické rezonance. Jejich cílem je vypracovat integrovaný časový průběh rozvoje a progresu onemocnění u opic s HN, který usnadní jejich budoucí využití v preklinických studiích⁹. Tým Jodi McBrideové také pracuje s modelem makak rhesus, na kterém sleduje markery a symptomy onemocnění, které mohou být použité k posouzení a zlepšení prediktivní účinnosti terapeutických látek¹⁰. Avšak aby mohly být primáti přijatelní jako zvířecí model pro výzkum HN, je třeba překonat několik překážek, které stojí v cestě. V průběhu nemoci se očekávají nejen motorické, ale i psychické a kognitivní poruchy, takže v rámci experimentálního testování nastávají vážné praktické a etické otázky. Zvládnout nemocná zvířata v opičí kolonii je velmi obtížné a dlouhodobá izolace, která se v průběhu HN vyžaduje, může primátům způsobit stres vyúsťující v deprivaci.

Dalším vhodným modelem pro studium HN jsou také ovce (*Ovis aries L.*), a to nejen kvůli analogické morfologii mozku ve srovnání s člověkem, ale také se srovnatelnou tělesnou hmotností a podobnými tělesnými systémy. Proto byly také používány jako modely v souvislosti s reprodukční biologii, respirační a kardiovaskulární fyziologií a dalšími. Zároveň se vyznačují dobrou a dlouhou pamětí a také rychlou schopností učit se. To umožnilo Jenny Mortonové rozvíjet kognitivní testy

podobné testům na lidech. Vědci tak mohou studovat úplný průběh HN, který je u člověka spojen s postupným mentálním a motorickým úbytkem a srovnat ho se zdravými jedinci⁷.

Stále častěji se v biomedicinském výzkumu využívají prasata (*Sus scrofa*) a to nejen kvůli fyziologii podobné člověku. Oproti ovčím mají prasata určité výhody jako například početný vrh. Výhodami v použití prasat pro studium neurodegenerativních onemocnění je zejména podobnost lidského a prasečího mozku. Problémem může být hmotnost těla, která při velkém nárůstu je jen těžko využitelná pro experimentální účely. To je důvod, proč se při výzkumu uplatňují miniprasata. Jediným pracovištěm, které má tento prasečí model HN je právě Ústav živočišné fyziologie a genetiky (ÚŽFG) v Liběchově.

Liběchovská miniprasata z ÚŽFG

V roce 2009 se nám na Ústavu živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd ČR, v. v. i., v Liběchově, podařilo vytvořit transgenní miniprase, které nese část genu pro lidský mutovaný Htt (Obr. 2)¹¹. Přenos do prasečích zygot se uskutečnil pomocí lentivirového vektoru nesoucího N-terminální část lidského huntingtinu se 145 CAG/CAA repeticemi. Jakmile embrya došla do stádia blastocysty, byla laparoskopicky vložena do vejcovodů náhradních matek. Takto získané zvířecí modely-miniprasata, jsou schopny se přirozeně rozmnožovat a přenášet vložený gen na potomky.

První transgenní miniprase byla prasnička Adela, která se stala zakladatelkou linie transgenních miniprasat s vloženým genem HN (transgenní HN-TgHD) a také netransgenní WT (wild type). Podíl transgenních jedinců je ve vrzích přibližně 40%. Křížením TgHD a WT miniprasat vznikly postupně 4 filiální generace (oz. F1, F2, F3, F4). Kanci z F1 generace prošli před prvním rokem života andrologickým vyšetřením a byli zařaze-



Obr. 2: Miniprasata z Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v. v. i., v Liběchově.

Foto z ÚŽFG, Liběchov¹¹.

ni do reprodukce. Vytvořili první jedince F2 generace. Pro výzkum HN máme v současnosti k dispozici přibližně 208 miniprasat, včetně TgHD i WT¹¹. Využíváme tkáně a mozky stárnoucích zvířat, které testujeme na přítomnost agregátů, oligomerů a fragmentů Htt souvisejících s patologií onemocnění HN u lidských pacientů.

Závěr

Přes množství zmiňovaných zvířecích modelů žádný stoprocentně nesplňuje všechny požadavky týkající se výzkumu HN. Bezobratlé transgenní modely pomoh-

ly odhalit základní molekulární důsledky mutovaného Htt, zatímco na hlodavcích byly do jisté míry objasněny základní mechanismy. Velcí savci však představují komplikovanější a nesrovnatelně věrohodnější modely, bez kterých se pochopení nemoci a testování léčiv neobejde. Proto je jejich studování nezbytné, i když složité a náročné.

Poděkování: Financováno z projektu 7F14308 Czech-Norwegian Research Programme a výzkumného Centra PIGMOD (C2.1.05 12.1.00103.0124).

Literatura

1. Brignull HR, Morley JF, et al.: *Methods Enzymol.* 412, 256 (2006).
2. Ramaswamy S, McBride JL, Kordower JH: *ILAR J.* 48, 356 (2007).
3. Mangiarini L, Sathasivam K, et al.: *Cell* 87, 493 (1996).
4. Schilling G, Becher MW, et al.: *Hum. Mol. Genet.* 8, 397 (1999).
5. Yamamoto A, Lucas JJ, Hen R: *Cell* 101, 57 (2000).
6. Rubinsztein DC: *Cell* 18, 202 (2002).
7. Morton AJ, Howland DS: *J. Huntington's Dis.* 2, 3 (2013).
8. Li XJ, Li S: *Curr. Top. Behav. Neurosci.* (2013).
9. Chan WSA: Abstrakt 140 z konference HD2014 v Cambridgi, nepublikovaný
10. McBride J, Clark R: Abstrakt 142 z konference HD2014 v Cambridgi, nepublikovaný
11. Baxa M, Hruska-Plochan M, et al.: *J. Huntington's Dis.* 2, 47 (2013).

Souhrn

Pallová D., Ellederová Z.: Zvířecí modely Huntingtonovy nemoci

Přestože se HN intenzivně studuje po celém světě, účinná léčba zůstává v nedohlednu. Dobře popsaná mutace, která podmiňuje rozvoj HN, umožňuje studovat tuto chorobu na zvířecích modelech, které mohou pomoci objevit způsob, jak opravit nebo zastavit proces odumírání nervových buněk. Od identifikace mutace genu způsobujícího HN, bylo vyvinuto množství zvířecích modelů včetně bezobratlých, hlodavců, a také velkých hospodářských zvířat. V průběhu posledních dvou desetiletí již velké zvířecí modely ukázaly, že jsou účinnou a důležitou součástí souboru modelů HN, bez kterých se výzkum neobejde. Pro úspěšné vyvinutí léčby bude nejspíše potřebná spolupráce všech úrovní výzkumu, od identifikace mechanismu HN v nižších modelech, přes ověření použitím laboratorních myší, přizpůsobení léčebného přístupu v modelech velkých zvířat až k detailním klinickým testům.

Klíčová slova: Huntingtonova choroba, huntingtin, zvířecí modely, miniprasata

Summary

Pallová D., Ellederová Z.: Animal models of Huntington's disease

Even if HN has been intensively studied worldwide, effective treatment remains unresolved. Well described mutation causing HN allows to study the disease in animal models that can help to find a way to correct or halt the process of neurodegeneration. Since the identification of the causative gene of HN, a number of animal models have been developed including invertebrates, rodents and large animals. Over the last two decades large animal models have shown their importance in HN research. For successful treatment it will be necessary to cooperate on all levels of research, from the identification of the mechanism at lower HN models, through verification using laboratory mice and adapting therapeutic approaches in large animal models to detailed clinical tests.

Keywords: Huntington's disease, huntingtin, animal models, minipigs

MELATONÍN A JEHO FUNKCIE V HUNTINGTONOVÉJ CHOROBE

Petra Rausová

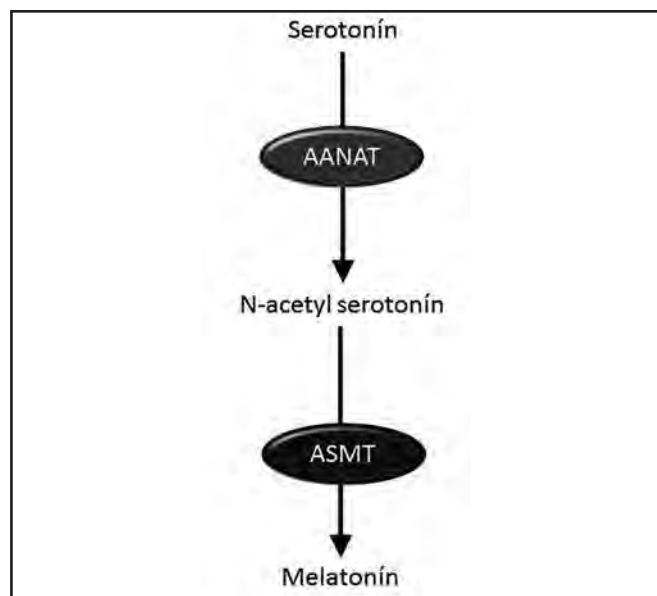
Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR v. v. i. Liběchov, rausova@iapg.cas.cz

Úvod

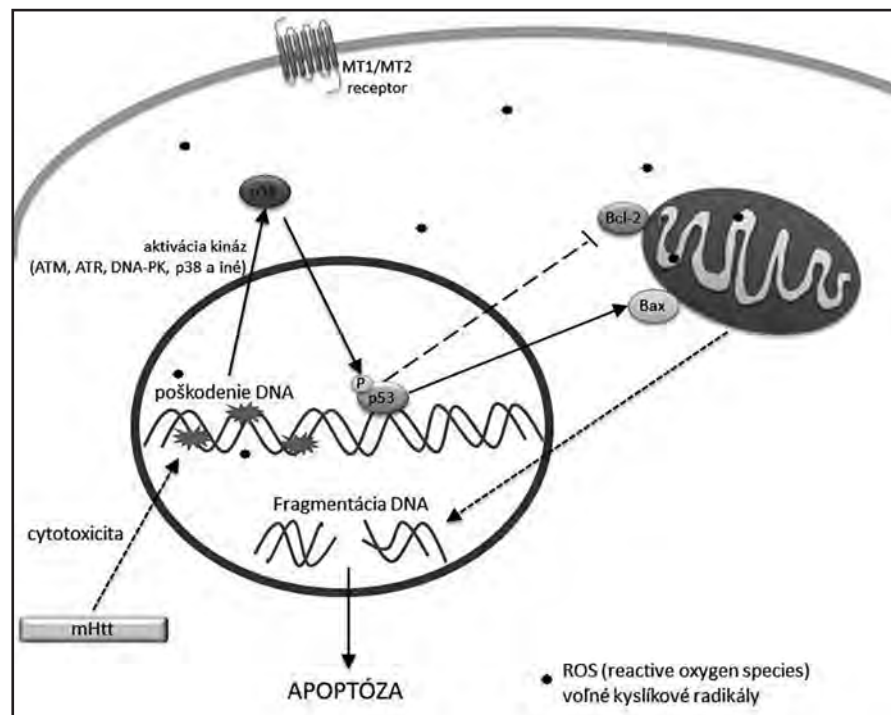
Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine), hormon, ktorého hlavná úloha spočíva v regulácii spánku a ďalších telesných aktivít. Je sekretovaný hlavne epifýzou (pineal gland) ale aj ďalšími tkanivami a orgánmi ako retina, koža, črevá, krvné doštičky, kostná dreň a v menšej miere aj inými¹⁻⁶. Produkcia melatonínu je regulovaná noradrenálínom (norpinephrine), ktorý sa v noci uvoľňuje zo sympatických nervových vlákien (SCN, suprachiasmatic nucleus). Noradrenalín zvyšuje koncentráciu intracelulárnej cAMP (cyclic AMP) cez

beta-adrenergické receptory a aktivuje cAMP-dependentnú proteín kinázu A (PKA). Pinealocyty neustále syntetizujú AANAT proteín (arylalkylamine N-acetyltransferase) zo stále prítomnej Aanat mRNA. Počas dňa, za absencie stimulácie noradrenalínom, je AANAT proteín okamžite proteolyticky degradovaný. V noci zapíčiňujú zvýšené hladiny cAMP fosforyláciu AANAT pomocou proteín kinázy A (PKA). Táto posttranslačná modifikácia vedie k interakcii fosforylovaného AANAT s regulačnými 14-3-3 proteínmi, ktoré chránia AANAT pred degradáciou. Zvýšenie AANAT proteínu vedie aj

k zvýšeniu jeho aktivity. Stimulácia cAMP/PKA signálnej dráhy by mohla tiež zohrávať úlohu pri aktivácii génovej expresie pinealocytov. Táto transkripčná aktivácia génu Aanat je prvotným mechanizmom pre indukciu biosyntézy melatonínu⁷. Syntéza melatonínu začína hydroxyláciou a decarboxyláciou aminokyseliny tryptofán. Tým vzniká serotonín (5-hydroxytryptophan). Serotonín je N-acetylovaný pomocou AANAT na N-acetyl serotonín. V poslednom kroku je tento premenený pomocou enzýmu ASMT (acetylserotonin O-methyltransferase) na melatonín⁸ (Obr. 1).



Obr. 1: Schéma biosyntézy melatonínu. Serotonín je N-acetylovaný pomocou AANAT na N-acetyl serotonín, tej je následne premenený pomocou enzýmu ASMT (acetylserotonin O-methyltransferase) na melatonín.



Obr. 2: Vnútrotná dráha apoptózy. Následkom akumulácie DNA-poškodenia, ktoré môže byť vyvolané cytotoxicitou, oxidatívnym stresom a inými faktormi, sa aktivujú kinázy ako ATM, ATR, DNA-PK, p38 a iné. Tieto kinázy sú schopné aktivovať p53 jeho fosforyláciou. To vedie k vnútornej dráhe apoptózy.

Huntingtonova choroba (HD), dedičné neurodegeneratívne ochorenie, nie je len chorobou centrálnej nervovej sústavy (CSN), ale aj periférnych tkanív⁹. Okrem neurodegenerácie a neurologických symptómov sú pozorované aj iné príznaky u HD pacientov, ako osteoporóza, testikulárna degenerácia, či strata svalového tkaniva¹⁰.

Jedným z významných rysov Huntingtonovej choroby sú poruchy spánku, spôsobené postupným znižovaním hladiny melatonínu s progresiou choroby¹¹ a jeho významne nízkymi hladinami u symptomatických pacientov HD¹². Mechanizmus, ktorý zapríčiňuje znižovanie hladín melatonínu je zatiaľ nejasný.

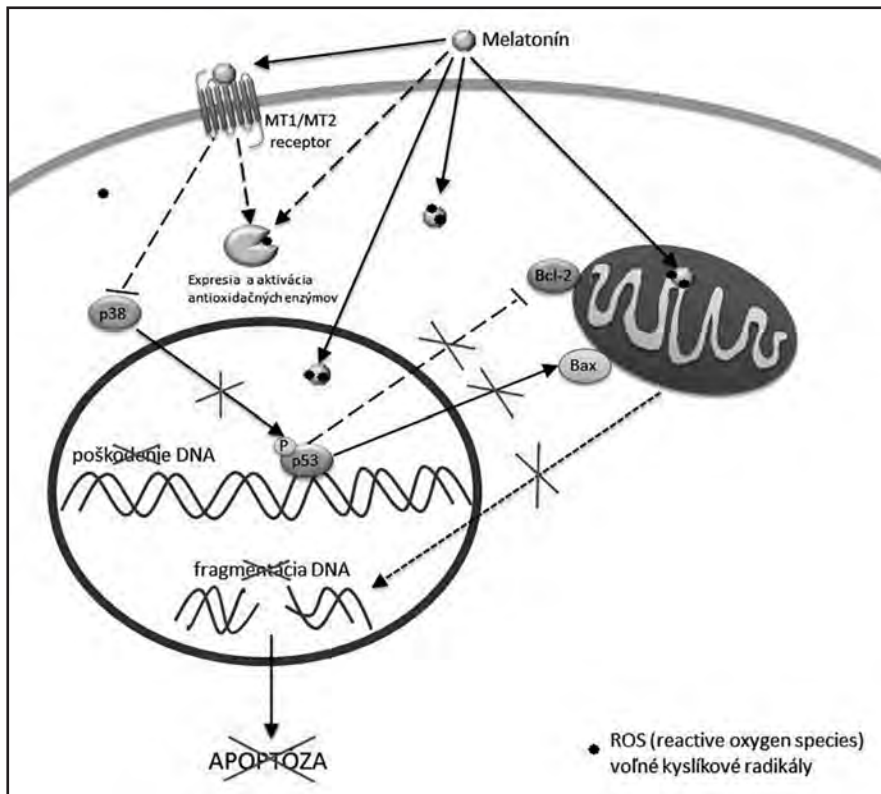
Akú úlohu teda zohráva melatonín v Huntingtonovej chorobe? Neurodegenerácia v HD sa pripisuje odumieraniu neurónov najmä v oblasti striata a cortexu. Jednou z možných terapeutických stratégií cielených na neurodegeneráciu by mohla predstavovať redukcia apoptózy¹³.

Melatonín a apoptóza

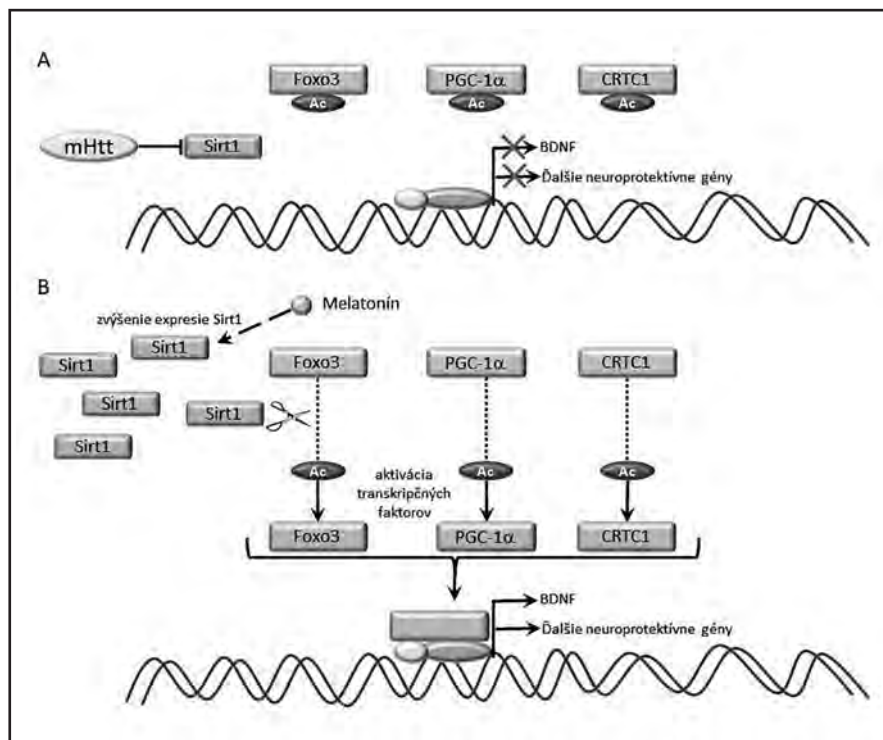
Apoptózu spôsobujú zvýšené hladiny pro-apoptického proteínu p53. A práve hladiny p53 sú zvýšené v mozgoch u HD pacientov a transgénnych myšič modeloch pre HD¹⁴ ako aj v periférnych tkanivách¹⁵. Tieto zvýšené hladiny fosforylovaného p53 na seríne 15¹⁶ sú následkom akumulácie DNA-poškodenia v HD^{17, 18}, následnej aktivácie kináz ako ATM, ATR, DNA-PK, p38 a iné, ktoré sú schopné aktivovať p53 fosforyláciou na serínoch a treonínoch v transaktívnej doméne (serín 15, troenín 18 a serín 20), čo vedie k akumulácii p53 v jadre a k jeho transkripčnej aktivite (gény apoptózy, opravy DNA, senescencie, zastavenie bunecného cyklu a iné). Časť p53 zostáva v cytoplazme, kde sa viaže na anti-apoptotický proteín Bcl-2¹⁹ a priamo aktivuje pro-apoptotický proteín Bax, čo vedie k vnútornej dráhe apoptózy²⁰ (Obr. 2). Blokácia p53 pomocou pifithrin- α , RNA interferencie alebo genetickej delécie bráni depolarizácii mitochondriálnej membrány a cytotoxicite v HD bunkách ako aj neurobehaviorálnym abnormalitám u HD transgénnych myšič¹⁴.

Melatonín má mnoho fyziologických funkcií. Jeho biologické efekty sú buď závislé alebo nezávislé od jeho membránových receptorov (MT1 a MT2), ktorých expresiu sám udržuje²¹. Melatonín má schopnosť indukovať vnútrotnú dráhu apoptózy v tumorových bunkách, ale aj schopnosť inhibovať ju v normálnych netumorových bunkách prostredníctvom jeho antioxidantných vlastností, zvyšovaním expresie a aktivity antioxidantných enzýmov a inhibíciou pro-apoptotických dráh²².

Inhibícia pro-apoptotických dráh melatonínom zahŕňa fosforyláciu p38, ktorá následne blokuje aktiváciu proteínu p53. Inaktivácia p53 znižuje



Obr. 3: Melatonín inhibuje vnútornú dráhu apoptózy v normálnych bunkách. Melatonín je schopný inhibovať vnútornú dráhu apoptózy v normálnych bunkách nepriamou inhibíciou p38 pomocou jeho receptor-závislej dráhy. Proteín p38 následne nie je schopný fosforylovať p53, a tým nedochádza k jeho transkripčnej aktivite a akumulácii v bunke. Melatonín taktiež zohráva úlohu ako vychytávač voľných radikálov v bunke a taktiež zvyšuje expresiu a aktivitu iných antioxidantných enzýmov.



Obr. 4: Ovplyvnenie fyziologickej funkcie deacetylázy Sirt1. (A) Mutovaný huntingtín interaguje so Sirt1, a tým bráni deacetylovaniu a aktivovaniu Sirt1 substrátov, kľúčových transkripčných faktorov (Foxo3, PGC-1 α , CRTC1 a iné). Transkripcia BDNF a ďalších neuroprotektívnych génov je za absencie týchto aktívnych transkripčných faktorov potlačená. (B) Prítomnosť melatonínu zvyšuje nie len hladiny Sirt1, ale aj deacetyláciu jeho substrátov (Foxo3, PGC-1 α , CRTC1 a iné).

je pomer Bax/Bcl-2, ktorá inhibuje stratu mitochondriálneho membránového potenciálu. Tento sled dejov inhibuje kaspasu-9 (casp9), a tým aj aktiváciu kaspasy-3 (casp3), čo vedie k zabráneniu apoptózy v normálnych bunkách²¹ (Obr. 3).

Je preukázané, že melatonín sprostredkováva neuroprotekciiu, spomaľuje nástup choroby a mortalitu transgénnych myšich modelov pre HD. Navyše, toxicita mutovaného huntingtínu (mHtt) v ľudských a myšich bunkách je asociovaná so stratou MT1 receptorov, čo zvyšuje zraniteľnosť neurónov, a tým urýchľuje neurodegeneratívny proces²³.

Neuroprotektívne efekty melatonínu

BDNF (brain-derived neurotrophic factor) zohráva dôležitú neuroprotektívnu úlohu v neurónoch. Génová expresia BDNF je v HD narušená, čo vedie k rozvoju symptómov HD²⁴. Expresia BDNF je závislá od jeho transkripčných faktorov. Jedným z nich je transkripčný faktor CREB. Foxo3 a CRTC1 (TORC1) sú koaktivátormi CREB, ktoré s ním môžu interagovať, a tým sú schopné zvýšiť jeho transkripčnú aktivitu²⁵.

Aktivita CRTC1 (TORC1), Foxo3 a taktiež PGC-1 α , transkripčného koaktivátora regulujúceho mitochondriálnu biogénezu a funkciu, je v HD potlačená²⁶, čo má za následok narušenie génovej expresie BDNF a iných neuroprotektívnych génov. Aktivácia CRTC1, Foxo3 a PGC-1 α vyžaduje odstránenie kľúčových acetylových skupín pomocou deacetylázy Sirt1²⁷. Ukázalo sa, že mHtt interaguje so Sirt1, a tým inhibuje jeho deacetylačnú aktivitu. To následne vedie k hyperacetylácii a inaktivácii Sirt1 substrátov ako Foxo3 a CRTC1 a zamedzení expresie BDNF a iných neuroprotektívnych faktorov (Obr. 4A). Sirt1, preto, zohráva významnú úlohu v neurodegenerácii HD a chráni pred neurotoxicitou. Zvýšenie expresie Sirt1 vedie k zlepšeniu neuropatologických príznakov spôsobených mHtt v troch rôznych myšich modeloch HD^{28, 29}.

Bolo preukázané, že melatonín je schopný zvyšovať hladiny Sirt1 v primárnych neurónoch. Taktiež bolo pozorované zvýšenie deacetylácie Sirt1 substrátov ako p53, PGC-1 α , Foxo1,

ADAM10 a NFκB (Obr. 4B). Indukcia expresie Sirt1 utlmuje neurodegeneráciu v zvieracích modeloch Alzheimerovej a Huntingtonovej choroby³⁰.

Záver

Melatonín má mnoho fyziologických vlastností. Má schopnosť chrániť normálne bunky pred apoptózou, ktorá zohráva významnú úlohu v odumieraní neurónov a následnej neurodegenerácii. Melatonín tiež zvyšuje hladiny deacetylázy Sirt1, čo priaznivo ovplyvňuje

je expresiu BDNF (brain derived neurotrophic factor) a ďalších neuroprotektívnych faktorov. Melatonín zohráva, preto, významnú úlohu v Huntingtonovej chorobe. Keďže sú jeho hladiny sú u pacientov znížené, mohol by predstavovať nový terapeutický cieľ pre Huntingtonovu chorobu.

Podakovanie: Financované z projektu 7F14308 Czech-Norwegian Research Programme a výskumného Centra PIGMOD (C2.1.05.12.1.00103.0124).

Literatúra

1. Bubenik GA: *Did. Dis. Sci.* 47, 2336 (2002).
2. Cardinali DP, Ladizesky MG, Boggio V, et al.: *J. Pineal. Res.* 34, 81 (2003).
3. Champier J, Claustrat B, Besancon R, et al.: *Life sci.* 60, 2191 (1997).
4. Liu C, Fukuhara C, Wessel JH, et al.: *Cell Tissue Res.* 315, 197 (2004).
5. Slominski A, Pisarchik A, Semak I, et al.: *FASEB J.* 16, 896 (2002).
6. Stefulj J, Hortner M, Ghosh M, et al.: *J. Pineal. Res.* 30, 243 (2001).
7. Schomerus C, Korf HW: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1057, 372 (2005).
8. Klein DC: *Adv. Exp. Med. Biol.* 460, 5 (1999).
9. Almeida S, Sarmento-Ribeiro AB, Janeiro C, et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 374, 599 (2008).
10. van der Burg JM, Bjorkqvist M, Brundin P: *Lancet. Neurol.* 8, 765 (2009).
11. Aziz NA, Pijl H, Frolich M, et al.: *J. Neurol.* 256, 1961 (2009).
12. Kallioliá E, Silajdzic E, Nambron R, et al.: *J. Mov. Disord.* 29, 1511 (2014).
13. Schapira AH, Olanow CW, Greenamyre JT, Bezaud E: *Lancet.* 384, 545 (2014).
14. Bae BI, Xu H, Igarashi S, et al.: *Neuron.* 47, 29 (2005).
15. Ehrnhoefer DE, Skotte NH, Ladha S, et al.: *Hum Mol Genet.* 23, 717-729 (2014)
16. Illuzzi JL, Vickers CA, Kmiec EB: *J. Mol. Neurosci.* 45, 256 (2011).
17. Illuzzi J, Yerkes S, Parekh-Olmedo H, Kmiec EB: *J. Neurosci. Res.* 87, 733 (2009).
18. Enokido Y, Tamura T, Ito H, et al.: *J. Cell Biol.* 189, 425 (2010).
19. Mihara M, Erster S, Zaika A, et al.: *Mol. Cell.* 11, 577 (2003).
20. Mathai JP, Germain M, Shore GC: *J. Biol. Chem.* 280, 23829 (2005).
21. Lanoix D, Lacasse AA, Reiter RJ, Vaillancourt C: *Mol. Cell Endocrinol.* 348, 1 (2012).
22. Richter HG, Hansell JA, Raut S, Giussani DA: *J. Pineal. Res.* 46, 357 (2009).
23. Wang X, Sirianni A, Pei Z, et al.: *J. Neurosci.* 31, 14496 (2011).
24. Zajac MS, Pang TY, Wong N, et al.: *Hippocampus.* 20, 621 (2010).
25. Conkright MD, Canettieri G, Sreteron R, et al.: *Mol. Cell.* 12, 413 (2003).
26. Cui L, Jeong H, Borovecki F, et al.: *Cell.* 127, 59 (2006).
27. Rodgers JT, Lerin C, Haas W, et al.: *Nature.* 434, 113 (2005).
28. Jeong H, Cohen DE, Cui L, et al.: *Nat. Med.* 18, 159 (2012).
29. Jiang M, Wang J, Fu J, et al.: *Nat. Med.* 18, 153 (2012).
30. Tajés M, Gutierrez-Cuesta J, Ortuno-Sahagun D, et al.: *J. Pineal. Res.* 47, 228 (2009).

Súhrn

Rausová P.: Melatonín a jeho funkcie v Huntingtonovej chorobe

Huntingtonova choroba predstavuje dedičné neliečiteľné neurodegeneratívne ochorenie. Progresia choroby je sprevádzaná postupným znižovaním hladiny melatonínu. Mechanizmus, ktorý zapríčiňuje toto znižovanie hladín melatonínu zostáva nejasný. Melatonín zohráva významnú úlohu nielen v dráhe apoptózy, ale jeho prítomnosť zvyšuje aj expresiu BDNF (brain derived neurotrophic factor) a ďalších neuroprotektívnych faktorov. Štúdium vplyvu melatonínu v Huntingtonovej chorobe by mohlo, predstavovať nový terapeutický prístup k liečbe tejto choroby.

Kľúčové slová: melatonín, Huntingtonova choroba, apoptóza, p53, BDNF, Sirt1

Summary

Rausová P.: Melatonin and its functions in Huntington's disease

Huntington's disease represents an inherited neurodegenerative disorder lacking the effective treatment. Progression of the disease is accompanied by gradual melatonin levels reduction. Mechanism causing this reduction of melatonin levels remains unknown. Melatonin plays a major role not only in the apoptosis pathway, but also its presence increases the expression of BDNF (brain derived neurotrophic factor) and other neuroprotective factors. Study of melatonin and its effects in Huntington's disease might represent a novel therapeutic approach in the treatment of this disease.

Keywords: melatonin, Huntington's disease, apoptosis, p53, BDNF, Sirt1

VLIV MUTANTNÍHO HUNTINGTINU NA MECHANISMUS SIGNALIZACE ODPOVĚDI BUŇKY NA POŠKOZENÍ DNA A OPRAVY POŠKOZENÉ DNA

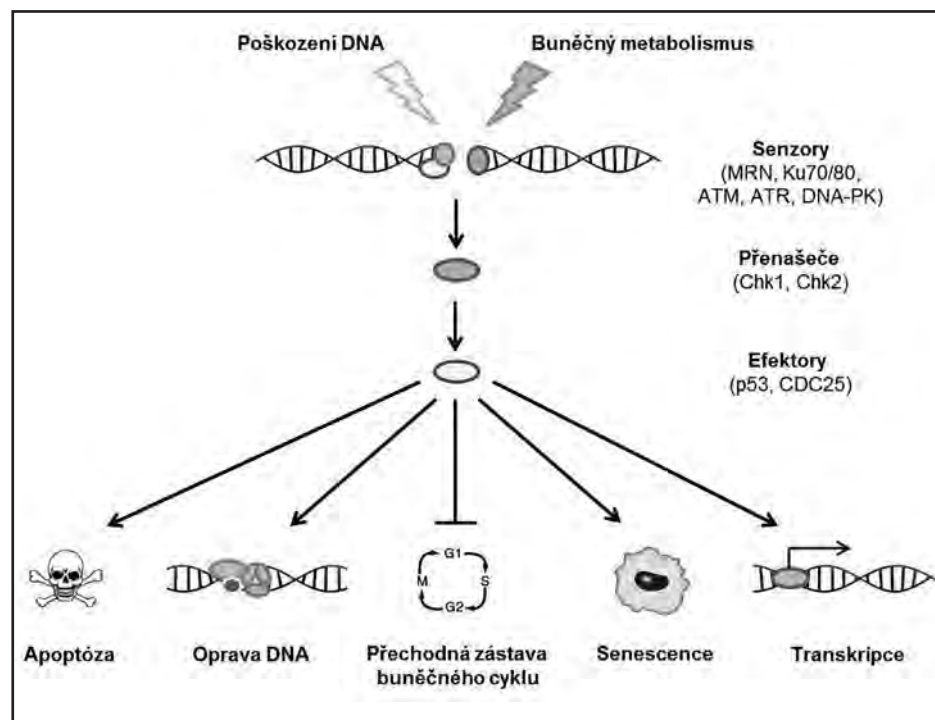
Ján Valášek

Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, valasek@iapg.cas.cz

Úvod

Stabilita genomu má zásadní význam pro přežití buňky a správné přenesení genetické informace při jejím dělení. V evoluci se proto vyvinuly kontrolní body poškození DNA, díky kterým může buňka reagovat adekvátním způsobem na intenzitu a rozsah poškození. Tato reakce je zprostředkována souborem signálních drah, souhrnně označovaných jako odpověď na poškození DNA (z angl. DNA Damage Response, DDR). Této signalizace se účastní velké množství proteinů a lze je rozdělit podle jejich funkce na senzory, přenašeče signálu a efektory. Rozsah poškození a průběh opravy DNA ovlivňuje budoucí osud buňky¹. (Obr. 1)

škození fosforylují další senzor – formu histonu H2A tzv. H2AX. V jednom místě zlomu dochází k fosforylaci stovek až tisíců molekul H2AX (tzv. γ H2AX) v rozpětí až 2 Mbp DNA, které slouží jako platforma pro navázání proteinů opravujících poškozenou DNA. Sensorické kinasy, aktivují přenašeče signálu (kinasy Chk1 a Chk2). Chk1/2 fosforylaci stabilizují efektorovou molekulu p53, což je transkripční faktor, který je zodpovědný za aktivaci transkripce proteinů účastnících se inhibice buněčného cyklu a programované buněčné smrti – apoptózy. Dále Chk1/2 inhibují fosfatasy CDC25, která je nutná pro aktivaci cyklin-dependentních kinas (CDKs) regulujících průběh buněčného cyklu^{1, 3, 4}.



Obr. 1: Zjednodušené schéma odpovědi na poškození DNA (DNA Damage Response – DDR). Poškození DNA je detekováno senzory a pomocí přenašečů jsou aktivovány efekторы. Úroveň poškození DNA určuje odpověď buňky.

Signalizace poškození DNA

Nejtěžší formou poškození DNA jsou dvouřetězcové zlomy (Double Strand Breaks – DSBs), které mohou být způsobeny vlastní metabolickou aktivitou buňky nebo ionizujícím zářením na různých místech molekuly DNA. Jejich nedostatečná oprava může mít za následek genomovou nestabilitu buňky². Místa DSBs jsou rozeznány specifickými senzory – komplexem MRN (Mer11-Rad50-NBS1) nebo Ku70/80 jenž aktivují sensorické kinasy ATM/ATR/DNA-PK. Ty v okolí místa po-

Oprava DNA

Homologní rekombinace

Mechanismus opravy DSBs je závislý na fázi buněčného cyklu. U proliferujících buněk, které mají v S fázi a G2 fázi buněčného cyklu zdvojenou genetickou informaci, se uplatňuje oprava pomocí homologní rekombinace. Po navázání komplexu MRN (Mer11-Rad50-NBS1) na konce DNA dochází k resekci 5' konců nukleasou Mre11. Komplex MRN současně asociuje s proteiny CtIP a BRCA1, které jsou důležité pro správnou nukleasovou aktivitu. Na jednořetězcové 3' přesahy se naváže RPA protein, který je poté nahrazen proteinem Rad51. Dojde k invazi obou jednořetězcových přesahů do intaktního homologního duplexu, který slouží jako templát pro syntézu DNA. Následně dochází k ligaci a vytvoření dvou Hollidayových struktur, které mohou migrovat po DNA. Dále jsou štěpeny endonukleasou a ligovány.

Může také dojít ke vzniku crossingoveru^{5, 6}.

Nehomologní spojení konců

V terminálně diferencovaných buňkách, jako jsou neurony, a v buňkách v G0 a G1 fázi buněčného cyklu je hlavním mechanismem opravy DSBs pomocí tzv. mechanismu spojení nehomologních konců (classical Non-Homologous End Joining – cNHEJ). Na konce DNA se naváže heterodimer Ku (Ku70/80) a protein 53BP1, které chrání DNA před resekci. Ku následně váže DNA-PKcs (catalytic subunit)

a vytváří funkční kinasu DNA-PK. Ta fosforyluje histon H2AX a další proteiny jako Ku, Artemis, XRCC4 a ligasu IV (Lig IV). Jednořetězcové přesahy obsahující poškozené nukleotidy jsou odstraněny komplexem DNA-PK a Artemis, která má endonukleasovou aktivitu. Upravené konce jsou spojeny komplexem XRCC4-Lig IV-XFL^{7,8}.

Signalizace poškození DNA u Huntingtonovy choroby

Kumulace poškození DNA během dlouh neurodegenerativních onemocněního života neuronů přispívá k patogenezi u Huntingtonovy nemoci (HN) a dalších. V současné době existuje pouze několik publikací popisujících vliv mutantního huntingtinu (mHtt) na DDR signalizaci u DSBs a na mechanismus jejich oprav. Ty naznačují dva odlišné způsoby interference mHtt s DDR.

První způsob interference mHtt popisuje ovlivnění opravy DNA pomocí cNHEJ a poškození DDR signalizace. Na běžně používaném zvířecím modelu R6/2 myši bylo popsáno, že přítomnost mHtt způsobuje sám o sobě u mladých myši jednořetězcové zlomy (SSBs), DSBs a dále dochází k aktivaci ATM, p53 a H2AX^{10, 11}. mHtt interaguje s Ku70 proteinem a snižuje aktivitu DNA-PK, která je důležitá pro opravu DNA pomocí cNHEJ mechanismu. Ektopická exprese Ku70 vede k zmírnění fenotypového projevu u myšičího i hmyzího (*Drosophila*) modelu HN^{10, 12}. Nicméně aktivace ATM a histonu H2AX není zcela jednoznačná. Byla totiž publikována studie provedená na konfluentní kultuře lidských fibroblastů od pacientů s HN. Ta popisuje, že mHtt přispívá k nižší fosforylaci histonu H2AX, ale k delší perzistenci γ H2AX fokusů. mHtt navíc interaguje s monomerním ATM v cytoplasmě a zabraňuje řádnému transportu ATM z cytoplasmy do jádra. Současně dochází ke zvýšení perzistence a množství fokusů nukleasy Mre11 v místech DSBs¹³.

Druhý způsob interference mHtt s DDR popisuje narušení samotné detekce DSBs. Studie na neuronech z R6/2 myši popisuje interakce mHtt s BRCA1 proteinem narušuje časoprostorovou dynamiku tvorby BRCA1 – závislé tvorby γ H2AX ložisek¹⁴.

Nádorový supresor p53

Transkripční faktor p53 je důležitým nádorovým supresorem, jehož mutace se vyskytuje v 50 – 55% nádorů. Sjednocuje odpověď buňky na stresové signály jakým je poškození DNA vyvolané metabolismem buňky, různými chemickými látkami, ionizujícím a UV zářením. Dalším stresovým signálem může být např. hypoxie. Míra poškození DNA určuje další osud buňky. Pokud je poškození opravitelné, tak p53 indukuje transkripci inhibitorů buněčného cyklu (např. p21^{waf1/Cip1}) a současně proteinů účastnících se opravy DNA. Po její opravě buňka vstupuje do buněčného cyklu a pokračuje v proliferaci.

Je-li poškození opravitelné, ale natolik závažné, že nemožňuje buňce další dělení, dochází k navození buněčné senescence (nevratná zástava buněčného cyklu). Při neopravitelném poškození dochází k p53 – závislé expresi proapoptotických genů (např. *bax*)¹⁵.

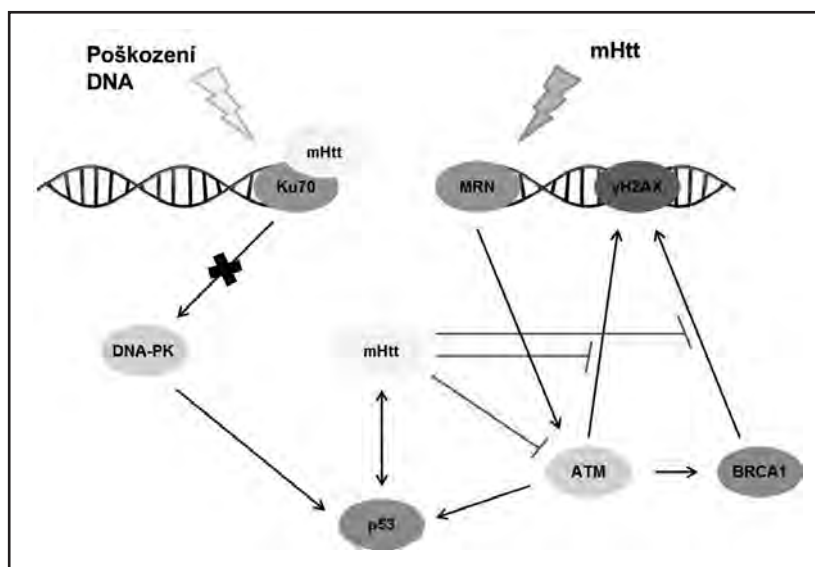
p53 při Huntingtonově nemoci

Na buněčných kulturách bylo ukázáno, že po indukci poškození DNA ionizujícím zářením dochází k p53 – závislému zvýšení množství *mhtt* mRNA a expresi mHtt proteinu. Pokus na myších s p53^{+/+} a p53^{-/-} ozářených ionizujícím zářením ukázal, že u myši p53^{+/+} dochází ke zvýšení exprese mHtt a p21^{waf1/Cip1} v cortexu a striatu myšičího mozku. U p53^{-/-} myši toto pozorováno nebylo¹⁶. Podobný experiment na homozygotním myšičím modelu pro mutovanou alelu *Hdh* (*Hdh*^{Q140}) popsal vliv množství funkčních alel *p53* (p53^{+/+}, p53^{+/-} a p53^{-/-}) na patogenezi HN. U myši s chybějící funkční formou p53^{-/-} došlo ke snížení exprese mHtt v mozku a varlatech. Dále pak k oddálení a zmírnění fenotypu. Současně vzrostla tvorba jaderných agregátů mHtt ve striatu, což je považováno za ochranný mechanismus buňky před toxicitou mHtt^{17, 18}.

Expresce mHtt v buněčném modelu dále ovlivňuje posttranslační modifikace p53. Dochází ke zvýšení fosforylace na serinu 15, který je zodpovědný za stabilizaci p53. Zajímavé je, že se snižuje acetylace lysinu 382 (K382), v důsledku čehož dochází k narušení správné oligomerizace p53¹⁹.

Závěr

V současné době je možné říci, že publikace popisující vliv mutantního huntingtinu na mechanismus signalizace odpovědi buňky na poškození DNA a opravy poškozené DNA nedokáží poskytnout uspokojivou odpověď. Často jsou vzájemně protichůdné (Obr. 2). Lze to vysvětlit tím, že byly použity různé experimentální modely – buněčné kultury s ektopickou expresí mutantního huntingtinu (HeLa, HCT116), hmyzí a myšičí modely nebo lidské fibroblasty.



Obr. 2: Schéma vytvořené z většiny dosud publikovaných prací sumarizuje vliv mutantního huntingtinu na signalizační dráhu při odpovědi na poškození DNA.

Literatura

1. Ciccia A and Elledge SJ: *Mol. Cell* 40, 179 (2010).
2. Jackson SP: *Carcinogen.*, 23, 687 (2002).
3. Pilch DR, Sedelnikova OA, Redon C, et al.: *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.*, 81, 123 (2003).
4. Yang J, Yu YN, Hamrick HE, Duerksen-Hughes PJ: *Carcinogen.* 24, 1571 (2003).
5. Dudas A, Chovanec M: *Mut. Res. Rev. Mut. Res.* 566, 131 (2004).
6. Wang H, Shao Z, Shi LZ, Hwang PYH, et al.: *J. Biol. Chem.* 287, 21471 (2012).
7. Brooks PJ: *Mut. Res. Fundamental Mol. Mech. Mutagen.* 509, 93 (2002).
8. Deriano L, Roth DB: *Ann. Rev. Genet.* 47, 433 (2013).
9. Coppede F, Migliore L: *Curr. Aging Sci.* 3, 3 (2010).
10. Enokido Y, Tamura T, Ito H, Arumughan A, et al.: *J. Cell Biol.*, 189, 425 (2010).
11. Illuzzi J, Yerkes S, Parekh-Olmedo H, Kmiec EB: *J. Neurosci. Res.* 87, 733 (2009).
12. Tamura T, Sone M, Iwatsubo T, Tagawa K: *PloS one* 6, e27408 (2011).
13. Ferlazzo ML, Sonzogni L, Granzotto A, et al.: *Mol. Neurobiol.* 49, 1200 (2014).
14. Jeon GS, Kim KY, Hwang YJ: *Mol. Neurobiol.* 45, 550 (2012).
15. Levine AJ: *Cell* 88, 323 (1997).
16. Feng Z, Jin S, Zupnick A, Hoh J: *Oncogene* 25, 1 (2006).
17. Ryan AB, Zeitlin SO, Scrabble H. *Neurobiol Disease* 24, 419 (2006).
18. DiFiglia M, Sapp E, Chase KO, et al.: *Science* 277, 1990 (1997).
19. Illuzzi JL, Vickers CA, Kmiec EB: *J. Mol. Neurosci.* 45, 256 (2011).

Souhrn

Valášek J.: Opověď na poškození DNA u Huntingtonovy choroby

Udržení integrity genomu má zásadní vliv pro přežití buněk, správné zachování a přenesení genetické informace. Její narušení má za následek zastavení buněčné proliferace, apoptózu a případně tumorigenezi. Buňka disponuje různými opravnými mechanismy a signálními dráhami, které se mají vypořádat s poškozením. Tato signalizace je odpovědí na poškození DNA (DNA Damage Response – DDR). Bylo popsáno, že mutantní huntingtin způsobuje poškození DNA, interaguje s některými opravnými a signálními proteiny. Nicméně přesný popis jeho účinku na DDR signalizaci a opravu DNA není jednoznačný, jelikož současné publikace obsahují protichůdné výsledky.

Klíčová slova: poškození DNA, oprava DNA, p53, Huntingtonova choroba, mutantní huntingtin,

Summary

Valášek J.: DNA damage response in Huntington disease

Maintaining the integrity of the genome is essential for cell survival, good preservation and transfer of genetic information. The disruption of the genome results in arrest of cell proliferation, apoptosis and possibly tumorigenesis. The cell has different mechanisms of DNA repair and signaling pathways in response to DNA damage. This signaling pathway is called DNA Damage Response (DDR). It has been reported that the mutated huntingtin causes DNA damage, interacts with certain remedies and signaling proteins. However, an accurate description of its effect on the DDR signaling and DNA repair is not clear, since recent publications contain contradictory results.

Keywords: DNA damage, DNA repair, p53, Huntington disease, mutant huntingtin

ROLE IMUNITNÍHO SYSTÉMU PŘI HUNTINGTONOVĚ NEMOCI

Petra Vochozková a Ivona Valeková

Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v. v. i., Liběchov, Biomedicínské centrum PIGMOD, Liběchov, vochozkova@iapg.cas.cz, valekova@iapg.cas.cz

Úvod

Patologie související s Huntingtonovou nemocí (HN) není omezena jen na změny v mozku pacientů. Další abnormality¹, které jsou pravděpodobně důsledkem všudypřítomné exprese mutovaného proteinu huntingtinu (mHtt), byly nalezeny mimo centrální nervovou soustavu (CNS), a to v periferních tkáních včetně endokrinního systému, krve, kardiovaskulárního systému, kosterního svalstva, gastrointestinálního traktu a pohlavních orgánů²⁻⁴. Zánětlivé změny jsou běžným průvodním znakem různých neurodegenerativních onemocnění včetně Alzheimerovy a Parkinsonovy nemoci, nebo amyotrofické laterální sklerózy (ALS)⁵. U Hun-

tingtonovy nemoci jsou tyto poruchy funkce imunitního systému²⁸, na rozdíl od zmíněných onemocnění, jen málo prostudovány.

V tomto příspěvku proto chceme ozřejmit roli imunitního systému a význam znalostí imunitních procesů v průběhu etiopatogeneze choroby. Detekce probíhající imunitních procesů by mohla sloužit nejen jako biomarker nástupu a progresu onemocnění ale představuje též oblast pro možné terapeutické zásahy.

Význam imunitního systému při HN

Funkce imunitního systému (IS) je u HN narušena nejen v CNS, ale také v periferních tkáních organismu.

Již v preklinickém stadiu onemocnění dochází k výrazným změnám v produkci cytokinů, a to i mnoho let před začátkem psychických a motorických symptomů⁶.

Podle výsledků nedávných studií by cytokiny mohly sloužit jako biomarkery nástupu a progresu tohoto onemocnění⁵. Jelikož se až doteď nepodařilo najít účinnou léčbu HN, mohly by některé složky imunity být vhodnými adepty pro zacílení terapie a vývoj nových léků. S tím úzce souvisí i hledání citlivějších metodik, které by byly schopné stanovit změny koncentrací biomarkerů u pacientů a zvířecích modelů a detekovat změny vzniklé v odpovědi na podaný lék⁷.

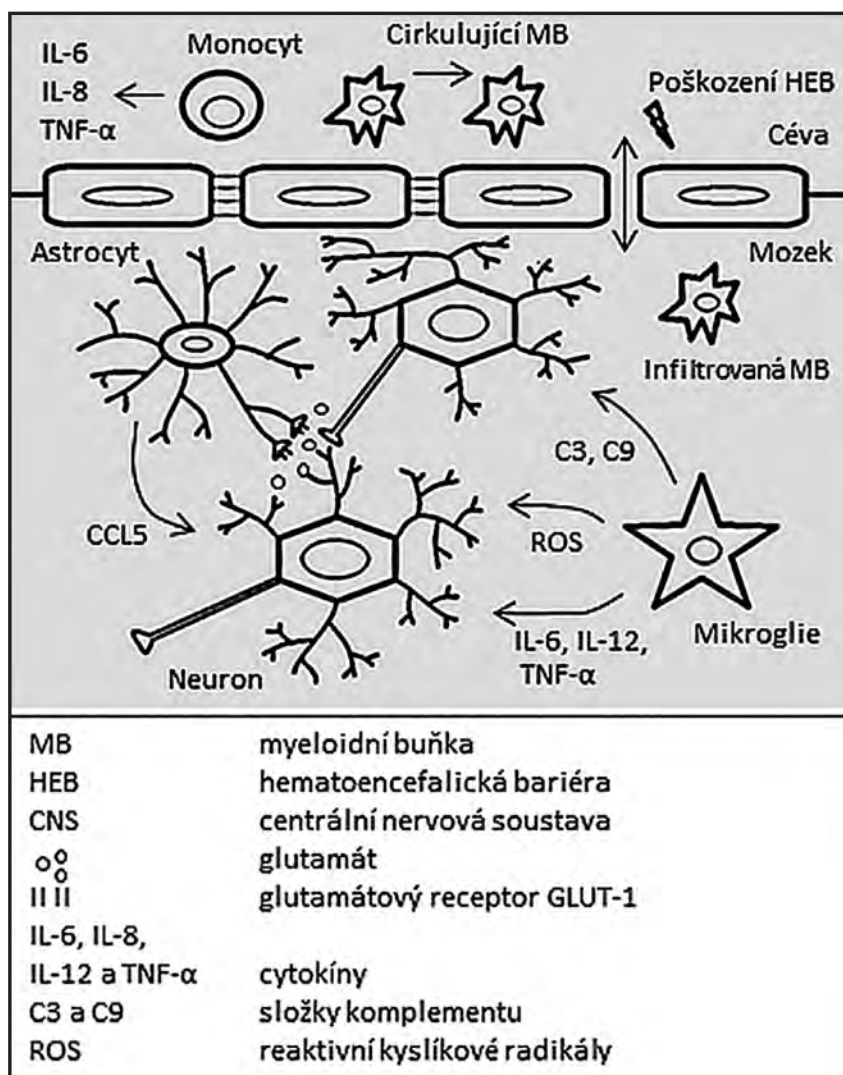
Centrální nervová soustava: mozek a mikroglie

V důsledku exprese mHtt dochází ve striatu, jako součásti bazálních ganglií mozku, ke tkáňově specifické ztrátě neuronů. Kromě neuronů jsou v mozku přítomné i jiné nervové buňky, mezi které patří například astrocyty, oligodendrocyty a mikroglie. V těchto buňkách také dochází k expresi mutovaného huntingtinu, čímž i tyto buňky přispívají k patogenezi onemocnění. Proto u neurodegenerativních nemocí můžeme mluvit o chronickém zánětu. Doposud není zcela jasné, zda gliové buňky reagují na chybnou konformaci mHtt, vytvořené agregáty anebo dokonce na apoptotická tělíska bývalých neuronů. Každopádně platí, že astrocyty a mikroglie reagují na změny ve svém okolí a jsou důležitými buňkami, které se účastní imunitních procesů v mozku, mimo jiné i protože mikroglie plní funkci antigen prezentujících buněk (APC)²².

Mikroglie jsou imunokompetentní buňky centrální nervové soustavy⁸. Představují makrofágy v CNS. Jedná o buňky monocyto-makrofágové vývojové řady. Ve zdravém mozku dospělého člověka jsou v klidovém "resting" stavu. Produkují protizánětlivé cytokiny a neurotrofní faktory podporující přežívání neuronů⁹. V případě poškození CNS se mikroglie aktivují. U HN dochází k takovéto aktivaci ještě před nástupem klinických příznaků¹⁰. Aktivované mikroglie sekretují v první řadě prozánětlivé cytokiny jako je IL-6, IL-12 a tumor nekrotizující faktor alfa (TNF- α). Druhotně dochází ke zvýšené aktivaci kaspas, nárůstu intracelulární hladiny vápníku a produkci reaktivních kyslíkových radikálů a oxidu dusnatého, což následně vede ke smrti neuronů a poškození struktury mozku¹¹. Hustota aktivované mikroglie stoupá s progresí onemocnění¹². Výrazná astroglióza a mikroglióza je přítomna v částech mozku jako je *nucleus caudatus* a *capsula interna* pacientů s HN v pozdních stádiích onemocnění (3. a 4. stupeň závažnosti neurodegenerace HN podle Vonsattela²¹). Dále byla také zjištěna zvýšená biosyn-

téza cytotoxických komplementových složek C3 a C9 v mikroglíích mozku HN pacientů²¹. Efekt mikroglíí je pak modulován vzájemnými interakcemi mezi neurony, astrocyty a mikroglíemi²⁸.

Základní funkcí astrocytů je především poskytnutí strukturální a metabolické podpory neuronům. Na rozdíl od mikroglíí nejsou APC. Přesto v aktivovaném stavu produkují cytokiny¹³. Např. u myšičího modelu R6/2 je vlivem exprese mHtt poškozena produkce i sekrece chemokinu CCL5/RANTES¹⁴, který podporuje vývoj neuritů a aktivitu neuronů a má tedy vliv na dysfunkci neuronů³. Astrocyty exprimující mHtt mají na svém povrchu méně glutamátových přenašečů zajišťující influx do buněk, neurony jsou tedy vystaveny nadměrné stimulaci glutamátem, což vede k jejich poškození až smrti. Glutamát je ve vysokých koncentracích pro buňku toxický²². Jiným důležitým aspektem je účast astrocytů na hematoencefalické bariéře. CNS je imunologicky privilegovaný orgán a není v přímém kontaktu s cirkulujícími buňkami imunitního systému. Výběžky astrocytů jsou součástí této bariéry, dotýkají se vlásečnic a vylučují do jejich okolí signální molekuly. Vlivem mHtt a dysfunkce astrocytů může být při HN bariéra poškozena a může tedy docházet k neregulované výměně mezi mozkovou tkání a cévním systémem^{23, 24} (Obr. 1).



Obr. 1: Aktivace imunitního systému během HN^{26, 27}

Imunitní buňky: monocyty

Nedávné studie dále prokázaly, že i buňky extra-neurálního původu (např. krevní buňky myeloidní řady) hrají významnou roli v patogenezi HN. Již v preklinických fázích onemocnění se objevuje dysfunkce cirkulujících imunitních buněk (monocytů). Cirkulující monocyty izolované z krve HN pacientů a transgenních myších modelů jsou patologicky hyperaktivní po *in vitro* stimulaci bakteriálním lipopolysacharidem⁶ a nepřiměřeně reagují na imunitní stimuly¹⁶. Tyto abnormality periferních myeloidních buněk mohou pomoci porozumět funkci mikroglie, které u pacientů s HN zatím nejsou dostupné. Objasnění vztahu mezi imunitními buňkami v mozku a krvi může sloužit k identifikaci a testování možných cílů pro terapeutický zásah, a také ke zjištění vlivu imunitního systému na progresi HN. Dysfunkce cirkulujících imunitních buněk může představovat důležitou součást patologie HN a zároveň by mohla odrážet procesy současně probíhající v centrální nervové soustavě.

Porucha migrace myeloidních buněk

Charakteristickým znakem pro mikroglie, stejně jako pro periferní imunitní buňky (monocyty a makrofágy) je, že překonávají morfologické bariéry a migrují za chemoatraktantem do míst infekce nebo poranění. U Huntingtonovy nemoci vede přítomnost mHtt k poruše migrace imunitních buněk v reakci na zánětlivý podnět¹⁷. Tento migrační defekt byl také potvrzen na myších modelech HN BACHD a R6/2^{16, 17}.

Tělní tekutiny: mozkomíšní mok a krev

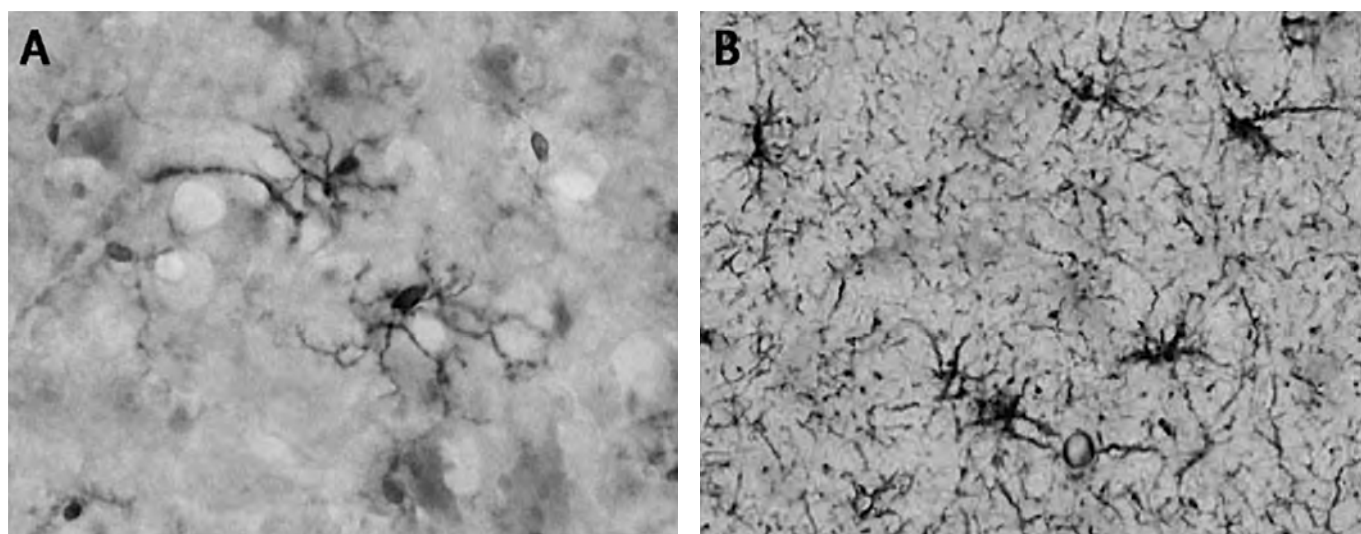
Nejdůležitější tekutinou ve vztahu k mozku je mozkomíšní mok, do kterého jsou lokálně uvolňovány působky vytvářené při procesech probíhajících v mozkové tkáni. Jeho odběr je ale invazivní a bolestivý. Složky krve – sérum a plazma – jsou dostupné snadněji a minimálně invazivně, a právě ony mohou představovat možný zdroj pro detekci významných biomarkerů nástupu a progresu HN. Navíc byla zjištěna korelace mezi kon-

centracemi různých molekul mezi plasmou a mozkomíšním mokem. Pacienti s HN mají zvýšené koncentrace prozánětlivých cytokinů IL-6, IL-8 a TNF α a chemokinů v plazmě a mozkomíšním moku už v premanifestačním stadiu choroby^{6, 15}. Podobné zvýšení zánětlivých cytokinů bylo pozorované také u myších modelů HN (myší kmeny R6/2, Hdh^{Q150Q/Q150}, YAC128)⁶.

Metodiky pro hledání biomarkerů

Při hledání užitečných biomarkerů typických pro pre-symptomatické období a progresu HN se používá několik metodik. Jedním z přístupů je přímé sledování nervové tkáně *post mortem* pro detekci zánětlivých změn. Kvantitativní reverzně transkripční PCR (RT-PCR) udává relativní poměr mRNA transkriptů mezi HN a kontrolními buňkami, a tím určuje zvýšení či snížení genové exprese cílového proteinu zapojeného do zánětlivého procesu. Velmi časté je také imunohistochemické barvení, a to jak mediátorů zánětlivé reakce, tak i markerů aktivovaných gliových buněk²¹. Pro mikroglie jsou to např. Iba1 nebo akumulované železo (Fe). Mezi markery astrocytů pak patří GFAP, vimentin, S-100 a glutamin syntasa (Obr. 2)^{21, 22, 25}. Případně je možné z mozkové tkáně izolovat zmíněné buněčné populace, u kterých se opět *in vitro* pozoruje exprese příslušných buněčných markerů anebo mediátorů zánětu prostřednictvím imunofluorescence nebo průtokové cytometrie. Mimo jiné izolované buňky lze také podrobit stimulaci, a tím prohloubit rozdíl mezi HN a kontrolními buňkami ať v cytokinové odpovědi nebo přežívání (odolnost ke stresu)²⁶.

Dále se používají imunotesty (*immunoassays*), které v současnosti představují široce používané techniky pro detekci a kvantifikaci proteinů. Díky své vysoké citlivosti jsou imunologické testy důležité zejména pro analýzu cytokinů, chemokinů, růstových faktorů a mnoha dalších proteinů přítomných v tělních tekutinách či buňkách ve velmi malém množství. Lze jimi sledovat koncentrace zánětlivých proteinů při HN. Konkrétně se jedná o testy ve dvojím možném prostorovém uspořádání: (i) testy s protilátkami imobilizovanými na pev-



Obr. 2: Imunohistochemické barvení detekující aktivaci buněk v mozku pomocí markeru Iba1 pro mikroglie. A) a markeru GFAP pro astrocyty B) (měřítka 20 μ m)

ném plochem nosiči ve formě mikročipů nebo na dně jamek mikrotitrační destičky např. Quantibody® (Ray-Biotech), MULTI-ARRAY® (Meso Scale Discovery), ELISA, a jiné, nebo (ii) o testy v suspenzi, které používají protilátky navázané na mikrokuličkách (xMAP® Technology (Luminex))^{18, 19}. Značně se využívají i další proteomické postupy např. 2D gelová elektroforéza, semikvantitativní immunobloting a kvantitativní hmotnostní spektrometrie.

Další možností je sledovat zánětlivé změny *in vivo* přístupem pomocí PET (pozitronová emisní tomografie). Tato zobrazovací technika umožňuje pozorovat zánětlivé procesy při poškození mozku způsobené HN, kdy se podává mírně radioaktivní látka, která po své vazbě k ligandu emituje záření snímané kamerou. Využívá se např. ligand PK11195-, který má vysokou afinitu k perifernímu receptoru benzodiazepinů (PBR) nacházející se na aktivovaných mikrogliích.

Model transgenního miniprasete pro HN

Vývoj efektivních léčiv modifikujících onemocnění, jako i identifikace biomarkerů nástupu a progresu Huntingtonovy nemoci závisí na porozumění mechanismů patogeneze HN. Bylo proto vytvořeno několik zvířecích modelů pro HN (hlodavci, ovce, miniprasata, opice), které jsou klíčové pro testování účinnosti nových terapeutických strategií.

Zavedení velkých zvířecích modelů pro studium HN nabízí řadu výhod. Miniprase jako velký zvířecí model má mnoho fyziologických podobností s člověkem. S podobnou velikostí a neuroanatomii mozku (gyrifikace mozku apod.) a délkou života dovoluje prase dlou-

hodobé studie za účelem sledování pomalé progresse onemocnění. V naší laboratoři byl vytvořen unikátní biomedicínský model miniaturního transgenního prasete nesoucího N-koncovou část lidského mutovaného proteinu huntingtinu²⁰.

Právě u těchto miniprasat se v naší laboratoři snažíme sledovat koncentrace zánětlivých proteinů v krvi, mozkomíšním moku a mozku pomocí cíleného proteomického profilování s využitím unikátních a vysoce citlivých imunotestů. Předpokládáme, že po důkladném screeningu potenciálních biomarkerů budeme schopni tímto způsobem v budoucnu měřit účinnost testovaných léčiv.

Závěr

Přestože prozatím nejsou známy podrobné mechanismy odpovědi imunitního systému na mutovaný huntingtin, imunitní systém nepochybně hraje roli v patogenezi HN a odráží stav poškození. Periferní krev je ideálním prostředím pro sledování změn v průběhu života pacientů. Imunologické techniky umožňují měřit koncentrace biomarkerů především cytokinů sekretovaných buňkami imunitního systému. Cytokiny pravděpodobně představují vhodný cíl nových terapeutických přístupů ke zpomalení nástupu/progrese HN.

Poděkování: Tato publikace vznikla v rámci projektu 7F14308 Česko Norského výzkumného programu, výzkumného Centra PIGMOD (C2.1.0512/1.00103/0124), výzkumného záměru ÚŽFG (RVO 67985904) a s podporou CHDI nadace (ID 1305, A5378, A-8248).

Literatura

1. Van der Burg JM, Björkqvist M, Brundin P: *Lancet Neurol.* 8, 8 (2009).
2. Van der Burg JM, Winqvist A, Aziz NA, et al.: *Neurobiol. Dis.* 44, 1 (2011).
3. Soulet D, Cicchetti F: *Mol. Psychiatry.* 16, 9 (2011).
4. Kotrcova E, Jarkovska K, Valekova I, et al.: *Proteomics Clin. Appl.* (2014).
5. Hsiao HY, Chern Y: *Mol. Neurobiol.* 41,2 (2010).
6. Björkqvist M, Wild EJ, Thiele J, et al.: *J. Exp. Med.* 205, 8 (2008).
7. Henley SM, Bates GP, Tabrizi SJ: *Curr. Opin. Neurol.* 18, 6 (2005).
8. Soulet D, Rivest S: *Curr. Biol.* 18, 12 (2008).
9. Streit WJ: *Glia.* 40, 2 (2002).
10. Tai YF, Pavese N, Gerhard A, et al.: *Brain.* 130, 7 (2007).
11. Hanisch UK: *Glia.* 40, 2 (2002).
12. Sapp E, Kegel KB, Aronin N, et al.: *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 60, 2 (2001).
13. Aloisi F, Ria F, Adorini L: *Immunol. Today.* 21, 3 (2000).
14. Chou SY, Weng JY, Lai HL, et al.: *J. Neurosci.* 28, 13 (2008).
15. Wild E, Magnusson A, Lahiri N, et al.: *PLoS Curr.* 3 (2011).
16. Trager U, Andre R, Magnusson-Lind A, et al.: *Neurobiol. Dis.* 73C (2014).
17. Kwan W, Träger U, Davalos D, et al.: *J. Clin. Invest.* 122, 12 (2012).
18. Fu Q, Zhu J, Van Eyk JE: *Clin. Chem.* 56, 2 (2010).
19. Valekova I, Kupcova Skalnikova H, Jarkovska K, et al.: *Methods Mol. Biol.* (2014).
20. Baxa M, Hruska-Plochan M, Juhas S, et al.: *J. Huntingtons Dis.* 2, 1 (2013).
21. Singhrao SK, Neal JW, Morgan BP, et al.: *Experimental Neurology.* 159, 2 (1999).
22. Shin JY, Fang ZH, Yu ZX, et al.: *J. Cell Biol.* 171, 6 (2005).
23. Rodriguez JJ, Olabarria M, Chvatal A, et al.: *Cell Death Differ.* 16, 3 (2009).
24. Volterra A, Meldolesi J: *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 626 (2005).
25. Simmons DA, Casale M, Alcon B, et al.: *Glia.* 55, 10 (2007).
26. Hsiao HY, Chen YC, Chen HM, et al.: *Hum. Mol. Genet.* 22, 9 (2013).
27. Ellrichmann G, Reick C, Saft C, et al.: *Clin. Dev. Immunol.* 541 (2013).
28. Moller T: *J. Neural. Transm.* 117, 8 (2010).

Souhrn

Vochozková P., Valeková I.: Role imunitního systému při Huntingtonově nemoci

Huntingtonova nemoc (HN) způsobuje rozsáhlé změny v centrálním nervovém systému, jako i systémové abnormality, včetně zvýšené produkce zánětlivých proteinů. Mezi další příznaky HN patří aktivace imunitních buněk periferní krvi. Tento stav je pozorován již mnoho let před předpokládaným nástupem motorických symptomů nemoci. Proteiny imunitního systému mohou proto představovat potenciální biomarker nástupu a progresu HN. Pro sledování časných změn a pro dlouhodobé studie biomarkerů Huntingtonovy nemoci jsme vytvořili biomedicínský model HN – transgenní miniaturní prase nesoucí N-koncovou část lidského mutovaného huntingtinu (mHtt, 548aa, 124Q).

Klíčová slova: Huntingtonova nemoc, imunologické biomarkery, patogeneze

Summary

Vochozkova P. and Valekova I.: Role of immune system in Huntington's disease

Huntington's disease (HD) causes widespread changes in central nervous system and systemic alterations including up-regulation of inflammatory proteins. HD symptoms include an activation of circulating immune cells in peripheral blood. This situation can be observed many years before the predicted onset of motor dysfunction which determinates immune proteins as potential biomarkers of HD onset and progression. To carefully monitor early HD changes and fluctuation of HD biomarkers for a long time we have established a biomedical model of HD – miniature pigs transgenic for N-terminal part of human mutated huntingtin (mHtt, 548aa, 124Q).

Keywords: Huntington's disease, immunological biomarkers, pathogenesis

PROTEOLYTICKÉ ENZYMY V PATOGENEZI HUNTINGTONOVY NEMOCI

Gabriela Kocurová, Taras Ardan

Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, ardan@iapg.cas.cz

Úvod

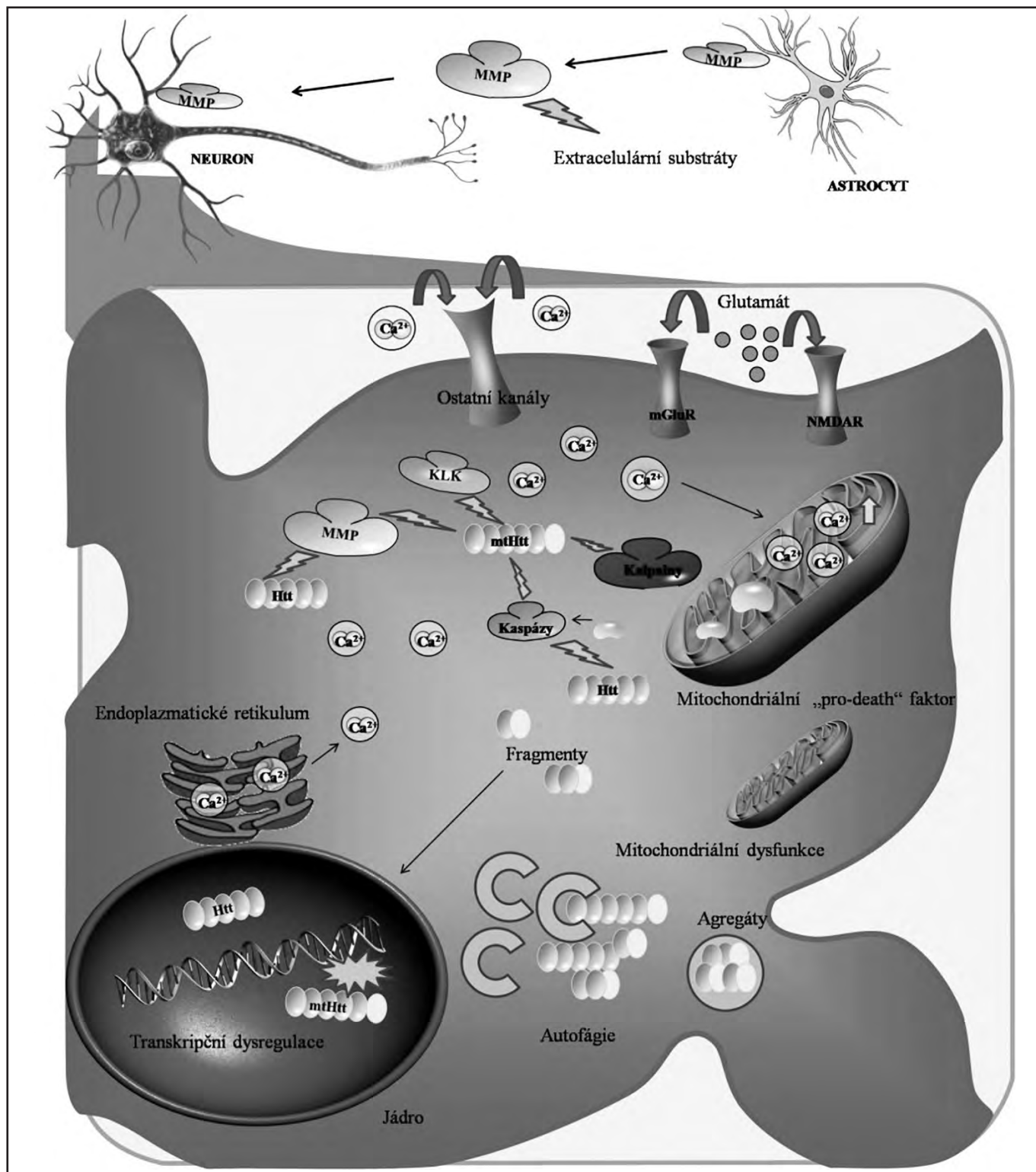
I když mezi možné příčiny vzniku a rozvoje onemocnění můžeme zařadit snížení antiapoptického vlivu normálního huntingtinu (Htt), inhibici aktivity proteazomů, zvýšenou tvorbu kyslíkových radikálů a prozánětlivých mediátorů, jedním z klíčových mechanismů patogeneze Huntingtonovy nemoci (HN) je proteolýza mutantního huntingtinu (mHtt)¹. Poslední studie naznačují, že mutovaná forma Htt a především jeho malé proteolytické fragmenty jsou velmi toxické pro neurony, které se nacházejí ve striátu a mozkové kůře, a inhibice proteolýzy mutantního Htt významně snižuje neurotoxicitu. I když mechanismus aktivity proteasomů u HN je stále předmětem výzkumu, předpokládá se, že v časných fázích nemoci mutovaná forma Htt senzibilizuje N-methyl-D-aspartátové receptory (NMDAR) a dochází k influxu Ca²⁺ iontů do nitrobuněčného prostoru. Následkem influxu vápníkových iontů jsou aktivovány Ca²⁺-dependentní enzymy a hovoříme o excitotoxickém působení mHtt. V dysregulaci Ca²⁺ homeostázy u HN hrají roli nejen ionotropní NMDAR, ale i metabotropní glutamátové receptory (mGluR), jež jsou četné v buňkách striata. Na štěpení mHtt se podílejí různé skupiny proteolytických enzymů². Mezi nejvíce probádané patří kaspasy, kalpainy a matrix metaloproteinasy (MMP) (Obr. 1).

Kaspasy

Kaspasy jsou cystein-aspartátové proteasy, které se účastní procesů spojených s apoptózou, buněčným cyklem nebo zánětlivou reakcí. Kaspasy zapojené v apoptotické kaskádě dělíme na iniciační a exekuční. Iniciační kaspasy aktivované v rámci programované bu-

něčné smrti jsou závislé na stresu a typu buněk a organizují vysoce účinnou proteolytickou kaskádu, která vede k aktivaci exekučních kaspas a následné buněčné smrti. Do skupiny iniciačních kaspas se řadí kaspasa-2, -8, -9, -10 a pro vytvoření aktivního dimeru je potřebná jejich aktivace. Mezi exekuční patří kaspasy-3, -6, -7 a formování jejich aktivního heterodimeru vyžaduje proteolytické štěpení prodomény na malou a velkou podjednotku³.

Kaspasy se účastní procesů štěpení mutovaného huntingtinu za vzniku toxických fragmentů obsahujících polyQ sekvenci a jejich akumulace může vést k aktivaci dalších kaspas a následnému poškození buňky. Jak již bylo uvedeno výše, jedním ze substrátů kaspas je i protein Htt. Štěpné místo se nachází v N-terminální oblasti mezi aminokyselinami aa460 a aa600. I když štěpení mHtt hraje pravděpodobně významnou roli v patogenezi HN, je možné, že ne všechny fragmenty jsou toxické. Klíčovým enzymem účastnícím se těchto procesů je kaspasa-6, kdy při její blokádě dochází ke zlepšení fenotypu u HN myší², stejně jako v případě použití farmaceutik blokujících aktivitu kaspas⁴. Poslední studie naznačují, že štěpení kaspasou-6 v pozici aa586 je považováno za zvláště důležité pro patogenezi HN. Při mutaci v tomto místě u YAC128 HN transgenního myšího modelu exprimujícího celou formu lidského Htt došlo k výraznému zlepšení fenotypu⁵. Kaspasa-3 štěpí Htt v pozici aa513 a 552, kaspasa-2 v pozici aa552. Vzniklé fragmenty mají rozdílnou délku a distribuci v buňce. Fragmenty vzniklé štěpením kaspasou-2 a -3 o velikosti 75 kDa a 70 kDa jsou lokalizovány perinukleárně, zatímco velmi toxické fragmenty vzniklé štěpením kaspasou-6 jsou akumulovány v jádře⁶. Rovněž TgHD myší modely prokázaly toxicitu dalších fragmentů: exo-



Obr. 1: V neuronech HN buněk dochází ke štěpení mtHtt kaspasami, kalpainy a matrix metaloproteinasami za tvorby toxických fragmentů mtHtt. Vysoké koncentrace mtHtt v buňce způsobují vznik agregátů, jež často podléhají autofagii. Kumulace malých fragmentů mtHtt v nervové buňce vede k transkripční dysregulaci a celé řadě organelových dysfunkcí (poškození transkripčních genů jaderné DNA, porucha mitochondriálního energetického metabolismu, poškození vezikulárního transportu). V extracelulárním prostoru následkem aktivace membránově vázaných nebo sekrečních MMP může proteolýza vyústit ve štěpení substrátů podílejících se na zánětu, což umocňuje neurotoxický efekt těchto enzymů.

nu 1 Htt fragmentu (R6/2 myši) a aa171 Htt N-terminálního fragmentu (N171-82Q myši)⁷.

Kalpainy

Kalpainy jsou rodina Ca^{2+} -dependentních intracelulárních cysteinových proteas zahrnujících μ - a m-kal-

painy. Oba druhy jsou heterodimery skládající se z větší 80 kDa katalytické a menší 28 kDa regulační podjednotky. Velká podjednotka se liší mezi jednotlivými členy této proteinové rodiny a je aktivní i bez podjednotky malé. K přechodu do aktivního stavu μ -kalpainům stačí hladiny vápenatých iontů v řádu mikromolů, zatímco

m-kalpains potřebují hodnoty Ca^{2+} v řádu milimolů. Vazba Ca^{2+} iontů vede k autolytickému procesu a katalytická podjednotka se v případě μ -kalpainů odštěpí z původně 80 kDa velkého proteinu na protein o velikosti 76 kDa, v případě m-kalpainů je podjednotka štěpena na 20 kDa úseky. Regulační podjednotka, jež je společná pro obě formy kalpainů, je z původních 28 kDa zkrácena na 21 kDa. Aktivace kalpainů je zprostředkována mnoha apoptotickými a nekrotickými stimuly. Fyziologická funkce a možné rozdíly mezi těmito dvěma μ - a m-kalpains jsou prozatím nejasné. Předpokládá se jejich participace jak v dělení a migraci buněk⁸, tak i v integriny mediované signální transdukcii a apoptóze⁹. Zatímco Htt je štěpen kaspasami na fragmenty o molekulové hmotnosti 70, 75 a 80 kDa¹⁰ v případě štěpení kalpainy vznikají fragmenty menší (62, 67, 72 kDa). Rozsah štěpení Htt je v přímé úměře k délce polyQ řetězce. Aktivace kalpainů byla potvrzena v lidských tkáních HN pacientů. Celkové množství aktivovaných a neaktivovaných kalpainů je zvýšeno u HN pacientů ve srovnání s kontrolami¹¹. Nižší koncentrace kalpainů produkuje fragmenty o molekulové hmotnosti 67 kDa a 62 kDa a při vyšších koncentracích se objevují štěpné produkty o délce 47 kDa. Jak již bylo uvedeno výše, μ -kalpainy i m-kalpains štěpí Htt ve stejných místech, ale při rozdílných intracelulárních koncentracích Ca^{2+} : μ -kalpainy štěpí Htt v přítomnosti vápenatých iontů o nízké koncentraci (3 μM) i vysoké koncentraci (10 mM) Ca^{2+} , m-kalpains pouze při vysokých koncentracích (10 mM). Také vlastní aktivace kalpainů je ovlivněna Ca^{2+} homeostázou. V případě preinkubace s kalpainovým inhibítorem 1 dochází ke kompletní blokaci štěpení Htt oběma typy kalpainů. Při použití inhibitoru $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ATPasy endoplasmatického retikula dochází ke zvýšení koncentrace Ca^{2+} iontů uvnitř buněk a nachází se zde vyšší hladiny 28 kDa kalpainové regulační podjednotky.

Hladiny fragmentů Htt se zvyšují po štěpení kaspasami-2 a -3, což reprezentuje asi 5 % celkového množství fragmentů. Zbytek je štěpen kalpainy a ostatními proteasami. Gafni a kol. potvrdili, že většina fragmentů je velikosti 72 kDa v případě mutantního Htt o délce 15Q, nebo 82 kDa u mutantního Htt s 135Q. Pomocí delecí analýzy bylo určeno místo štěpení kalpainů v oblasti aa535-537 Htt (serin-serin-serin), kdy při delecii tohoto úseku došlo k eliminaci produkce štěpů o velikosti 72 kDa. Při delecii oblasti aa468-470 (leucin-threonin-alanin) došlo k redukci 67 kDa fragmentů. I když místo štěpení Htt charakteristické pro tvorbu fragmentu velikosti 62 kDa nebylo určeno, není to tak významný nedostatek, protože takto velký fragment reprezentuje menšinu v celkovém počtu fragmentů. V případě Htt 138Q-(1-1212) došlo k redukci fragmentů oproti Htt 15Q-(1-1212) díky akumulaci polyQ Htt ve stacking gelu. Eliminace produkce konkrétních štěpů vedla k redukci další proteolýzy Htt, kdy bylo sníženo množství jak nízkomolekulárních fragmentů pravděpodobně vzniklých štěpením aspartátovými proteasami stejně, tak i Htt agregátů (3,7x méně).

Přítomnost fragmentů Htt v jádře buňky koreluje s cytotoxicitou, jež může být zvýšena aktivací buněčných lokalizačních signálů a naopak snížena při aktivaci buněč-

ných exportních signálů. Celá forma Htt obsahuje přirozeně se vyskytující exportní signály, které mu umožňují přecházet z jádra do cytoplazmy a naopak. Většina Htt je v cytosolu (>95 %). V mnoha studiích se uvádí, že podmínkou pro vstup fragmentů do jádra buňky je jejich velikost menší než 50 kDa. Tyto závěry jsou však založeny hlavně na imunofluorescenčních analýzách hodnotících agregáty Htt, ale ne na subcelulární frakcionaci. Je potřeba ozřejmit, zda fragmenty mohou putovat z cytoplazmy do jádra a naopak, a zda dochází ke štěpení v jádře normálně se vyskytujícího malého procenta Htt. Kalpainy a kaspasami štěpený Htt se akumuluje v cytoplazmě a jádře v případě 72/82 kDa fragmentů a především v jádře u 67/77 kDa fragmentů.

Charakterizace kalpainů není tak pokročilá jako u kaspas. Tři z patnácti enzymů kalpainové rodiny – kalpain-1, kalpain-2 a kalpain-4 byly do značné míry již prostudovány, u dalších tří – kalpain-5, kalpain-7 a kalpain-10 je známá jejich vysoká exprese v mozkové tkáni, předpokládá se tedy jejich role v Ca^{2+} zprostředkované patogenezí, což potvrzuje rovněž zvýšená hladina jejich mRNA u R6/2 myšího modelu HN. Aktivní i inaktivní forma kalpainu-2 byla primárně nalezena v cytoplasmatické frakci, kalpain-7 a kalpain-10 měl svou inaktivní formu lokalizovanou jak v jádře, tak v cytoplazmě, zatímco aktivní formu pouze v jádře, a obě formy kalpainu-5 byly přítomny jak v cytoplazmě, tak v jádře buňky. Thapsigargin je léčivo selektivně inhibující sarko-endoplasmatickou Ca^{2+} -ATPasu, což vede k velkému zvýšení intracelulárního Ca^{2+} . Po jeho aplikaci se potvrdila regulace aktivace kalpainů těmito ionty. Semi-quantitativní PCR odhalila zvýšené množství transkriptů kalpainu-5, -7 a -10. Byly pozorovány rovněž vyšší hladiny proteinů a jejich aktivních forem¹².

Matrix metaloproteinasy

Matrix metaloproteinasy (MMP) jsou Zn-dependentní proteolytické enzymy, které se účastní mnoha fyziologických i patologických procesů. Především je známo jejich zapojení v degradaci extracelulárních proteinů, avšak jejich význam je mnohem větší, protože mezi substráty najdeme chemokiny, buněčné receptory, cytokiny a růstové faktory¹³. Spolu s adamalysiny, serralysiny, fragilysiny a astaciny náleží do velké rodiny Zn-dependentních metaloproteinas označovaných jako metzinciny. Většina MMP obsahuje charakteristickou HEXXH sekvenci, která interaguje se zinkem¹⁴. Je známo více než 20 MMP vyskytujících se u člověka.

V roce 2010 skupina kolem Millera¹⁵ publikovala rozsáhlou studii snažící se zmapovat proteolytické enzymy zodpovědné za zvýšené hladiny malého 48 kDa N-terminálního fragmentu mutovaného Htt. Při screeningu 514 siRNA všech známých lidských proteas bylo identifikováno 41 proteas, které ovlivňují akumulaci fragmentů Htt, přičemž 11 z nich bylo potvrzeno i v opakovaném testování. Mezi identifikovanými proteasami byli tři MMP (MMP-10, MMP-14, MMP-23B)¹⁵. Touto studií byla demonstrována zvýšená aktivita těchto enzymů jak v buněčných kulturách, tak i na zvířecích modelech HN, přičemž MMP-10 se prokazatelně podílela na přímém štěpení Htt, zatímco MMP-14 a MMP-23B nikoliv. V ná-

sledné studii vlivu MMP na toxicitu buněk se potvrdilo, že knock-down (inhibice exprese genu) významně snižuje odumírání neuronů ve striatu. Použití NNGH (N-Isobutyl-N-(4-methoxyphenylsulfonyl)glycyl-hydroxamová kyselina), farmakologického inhibitoru MMP, stejně jako endogenních inhibitorů TIMP1, TIMP2, TIMP3, vedlo k blokaci Htt-mediované toxicity v Hdh 111Q/111Q buňkách. V těchto buňkách byl také zaznamenán 5,7x vyšší výskyt štěpené formy MMP-10 ve srovnání s Hdh7Q/7Q buňkami. Jelikož tento fakt ještě neznamenal, že jsou zvýšeny i hladiny aktivované MMP-10 v buňkách s mtHtt, byla provedena analýza enzymu pomocí použití fluorogenního substrátu. Výsledky analýzy potvrdily významné zvýšení aktivity MMP v Hdh111Q/111Q buňkách. Následně byly použity myši HN modely YAC128 (celá forma mtHtt) a R6/2 (fragment mtHtt). Výsledky získané na těchto myších modelech potvrdily 1,6-1,8 násobné zvýšení aktivity MMP ve striatu YAC128 (stáří 16 měsíců) a R6/2 (stáří 10 týdnů) ve srovnání se zdravými kontrolami. Po precipitaci a následné zymografii byly nalezeny zvýšené hladiny aktivovaných MMP velikosti od 50 kDa do 90 kDa v lyzátech kortexu a striata R6/2 myši. 50 kDa štěp odpovídal aktivní formě MMP-10. Štěp velikosti 90 kDa reprezentoval MMP-9 (92 kDa), jež je aktivovaná pomocí MMP-10.

I když MMP mohou být produkovány v gliových buňkách a neuronech, jejich kolokalizací s gliovým markerem (GFAP) a neuronálním markerem (NeuN) bylo prokázáno, že většina aktivních MMP je přítomna v neuronech. Pro určení, zda je Htt přímým substrátem MMP-10 a MMP-14, buněčný lyzát exprimující mtHtt byl inkubován s rekombinantními MMP. Jako kontrola byla použita MMP-2, která nebyla předtím potvrzena jako jedna z proteas navozujících proteolýzu a buněčnou toxicitu. V souvislosti s nalezením fragmentu o velikosti 48 kDa u normálního Htt a 70 kDa u mtHtt 148Q byl Htt určen jako substrát pro MMP-10, ne však pro MMP-14, ani MMP-2. In vitro translace Htt15Q rovněž potvrdila, že Htt je substrátem pro MMP-10, ne však pro MMP-14 a MMP-2. Všechny tři MMP byly stejně aktivní po přidání fluorescenčního substrátu. Na rozdíl od knock-downu

MMP-14, knock-down MMP-10 potlačoval mtHtt toxicitu přímo. V porovnání s kaspasami a kalpainy MMP-10 štěpí Htt blíže jeho N-konci. Pro zjištění přesného štěpícího místa MMP-10 byly Htt15Q (1-469) a Htt138Q (1-469) inkubovány s MMP-10 *in vitro*. Analýza molekulárních hmotností Htt15Q štěpných produktů specifikovala místo štěpení Htt okolo aminokyseliny aa414. Vyšetřování aminokyselinové sekvence v této oblasti a porovnání se známými Htt substráty ukázalo na možné štěpící místo v pozici aa402. Pro ověření této hypotézy byla provedena deleční analýza oblasti aa402-403 Htt, jejímž výsledkem bylo snížení proteolýzy MMP-10. Stejně tak při aplikaci MMP-10 do post-mortem buněčného lyzátu byl štěpný produkt o velikosti 50 kDa zvýšen.

Ačkoliv většina MMP je exprimována ve formě proenzymů a štěpení na jejich aktivní formu probíhá mimo buňku, MMP-10 štěpí Htt intracelulárně. Vyšetřením kolokalizace endogenního Htt a MMP-10 bylo zjištěno, že tyto dva proteiny spolu vysoce kolokalizují, přičemž v buňkách podstupujícím buněčnou smrt je míra kolokalizace podstatně vyšší. Kolokalizace nebyla zapříčiněna přímou proteinovou interakcí vzhledem k negativní MMP-10 a Htt koimunoprecipitaci.

Doposud známé informace naznačují, že selektivní inhibice MMP by mohla být potenciálně účinným prostředkem terapie HN. Například knock-out myši pro MMP-9 vykazovaly lepší výsledky po cerebrální ischemii, což by mohlo být v přímé souvislosti s post-mortem analýzou mozků HN pacientů, která odhalila zvýšenou koncentraci MMP-9, zatímco v mozku zdravých lidí tato nalezena nebyla¹⁶.

Závěr

Předchozí studie naznačují, že proteolytické enzymy jsou jedním z faktorů podílejících se na patogenezi HN. Prozatím nejsou mechanismy působení fragmentů mtHtt zcela objasněny, avšak studium této problematiky zdá se být jedním z možných slibných přístupů směřujících k lepšímu pochopení nemoci a zejména k následnému nalezení vhodné terapie HN pacientů.

Literatura

1. Goldberg YP, Nicholson DW, Rasper DM, et al.: *Nat Genet* 13, 442 (1996).
2. Graham RK, Deng Y, Slow EJ, et al.: *Cell* 125, 1179 (2006).
3. Baumgartner R, Medel G, Briand Ch, et al.: *Biochem J* 423, 429 (2009).
4. Chen M, Ona VO, Li M, et al.: *Nat. Med.* 6, 797 (2000).
5. Warby SC, Doty CN, Graham RK, et al.: *Hum. Mol. Genet.* 17, 2390 (2008).
6. Mangiarini L, Sathasivam K, Sellar M, et al.: *Cell* 87, 493 (1996).
7. Huttenlocher A, Palecek SP, Lu Q, et al.: *J. Biol. Chem.* 272, 32719 (1997).
8. Kulkarni S, Saido TC, Suzuki K, et al.: *J. Biol. Chem.* 274, 21265 (1999).
9. Wellington CL, Singaraja R, Ellerby L, et al.: *J. Biol. Chem.* 275, 19831 (2000).
10. Graham RK, Ehrnhoefer DE, Hayden MR: *Trends in Neurosci.* 34, 646 (2011).
11. Gafni J, Hermel E, Young JE, et al.: *J. Biol. Chem.* 279, 20211 (2004).
12. Gafni J, Ellerby LM: *J. Neurosci.* 22(12), 4842 (2002).
13. Miller JP, Holcomb J, Al-Ramahi I, et al.: *Neuron* 67, 199 (2010).
14. LÓutepez-Pelegrin M, Ksiazek M, Karim YA, et al.: *J. Biol. Chem.* in press (2015).
15. Krawitz P, Haffner C, Fluhrer R, et al.: *J. Biol. Chem.* 280, 39515 (2005).
16. Silvestroni A, Faull RL, Strand AD et al.: *Neuroreport* 20, 1098 (2009).

Souhrn

Kocurová G., Ardan T.: Proteolytické enzymy v patogenezi Huntingtonovy nemoci

Huntingtonova nemoc je provázena vznikem agregátů a toxických fragmentů mutovaného huntingtinu. Funkce těchto forem není doposud zcela objasněna, nicméně proteolýza mutovaného huntingtinu je jedna ze složek podílející se na patogenezi onemocnění. Hlubší studium těchto proteolytických enzymů a jejich zapojení v procesu neurodegenerace může vést k lepšímu pochopení nemoci a k nalezení vhodné terapie.

Klíčová slova: Huntingtonova nemoc, huntingtin, proteolytické enzymy, kaspasy, kalpains, matrix metalloproteinasy

Summary

Kocurová G., Ardan T.: Proteolytic enzymes in pathogenesis of Huntington's disease

Huntington's disease is accompanied by formation of aggregates and toxic fragments of mutant huntingtin. A function of these forms has not been fully elucidated, nevertheless, the proteolysis of mutant huntingtin is one of the components participating in the pathogenesis of the disease. Further examination of these proteolytic enzymes and their involvement in a process of neurodegeneration might lead to better understanding of the disease and finding an appropriate therapy.

Keywords: Huntington's disease, huntingtin, proteolytic enzymes, caspases, calpains, matrix metalloproteinases

OBSAH

Úvod	1
25 let Biotechnologické společnosti	2
Kopečný J., Motlík J.: Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i.	3
Kocurová G., Pallová D., Bohuslavová B., Ardan T., Motlík J.: Huntingtonova nemoc	5
Bohuslavová B., Mačáková M.: Testikulární degenerace při Huntingtonově chorobě	8
Pallová D., Ellederová Z.: Zvířecí modely Huntingtonovy nemoci	11
Rausová P.: Melatonin a jeho funkce v Huntingtonově chorobě	13
Valášek J.: Opověď na poškození DNA u Huntingtonovy choroby	17
Vochozková P., Valeková I.: Role imunitního systému při Huntingtonově nemoci	19
Kocurová G., Ardan T.: Proteolytické enzymy v patogenezi Huntingtonovy nemoci	23

CONTENTS

Editorial	1
25 years of Czech Biotechnology Society	2
Kopečný J., Motlík J.: Institute of Animal Physiology and Genetics AS ČR, v.v.i.	3
Kocurová G., Pallová D., Bohuslavová B., Ardan T., Motlík J.: Huntington's disease	5
Bohuslavová B., Mačáková M.: Testicular degeneration in Huntington's disease	8
Pallová D., Ellederová Z.: Animal models of Huntington's disease	11
Rausová P.: Melatonin and its functions in Huntington's disease	13
Valášek J.: DNA damage response in Huntington disease	17
Vochozkova P. and Valekova I.: Role of immune system in Huntington's disease	19
Kocurová G., Ardan T.: Proteolytic enzymes in pathogenesis of Huntington's disease	23

REDAKČNÍ RADA

Ing. Petra Lipovová, Ph.D., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (vedoucí redaktor)
prof. Ing. Jan Káš, DrSc., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (redaktor)
doc. Ing. Pavel Ulbrich, Ph.D., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (redaktor)
Ing. Martina Nováková, Ph.D., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (redaktor)
RNDr. Ivan Babůrek, CSc., Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i., Rozvojová 263, 165 02 Praha 6
doc. Ing. Radovan Bílek, CSc., Endokrinologický ústav, Národní 8, 116 94 Praha 1
prof. Ing. Alena Čejková, CSc., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6
prof. RNDr. Gustav Entlicher, CSc., Katedra biochemie PřF UK, Albeřtův 6, 128 43 Praha 2
RNDr. Milan Fránek, DrSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno
prof. Ing. Ladislav Fukal, CSc., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6
Ing. Jan Kopečný, DrSc., Ústav živočišné fyziologie a genetiky, AV ČR, v.v.i., Vídeňská 1083, Praha 4
prof. RNDr. Pavel Peč, CSc., Katedra biochemie, Univerzita Palackého v Olomouci, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc
doc. RNDr. Jana Pěkníková, Ph.D., Biotechnologický ústav AV ČR, v.v.i. Vídeňská 1083, 142 00 Praha 4
RNDr. Vladimír Vala, Teva Czech Industries, s.r.o., Ostravská 29, 747 70 Opava – Komárov
doc. RNDr. Petr Zbořil, CSc., Ústav biochemie, PřF MU, Kotlářská 267/2, 611 37 Brno

POKYNY PRO AUTORY

Rukopis musí být opatřen plným jménem autorů, jejich pracovištěm a e-mailovými adresami. Text se předkládá jako soubor MS Word (doc, docx, rtf) ve formátu jednoduchého řádkování písmem fontu Arial o velikosti 11. Rozsah není při dodržení správné publikační praxe omezen.

Článek má tyto části: Název práce, jména autorů a pracoviště, e-mailová adresa autora, úvod, vlastní text členěný do kapitol, závěr, příp. poděkování, citace literatury, český souhrn a klíčová slova a anglický souhrn a klíčová slova. Odkazy na literaturu se číslují v pořadí, v jakém přicházejí v textu a jsou uváděny formou exponentu (bez závorek) v příslušném místě textu (včetně tabulek a obrázků). Zkratky časopisů se používají podle zvyklosti Chemical Abstract Service Source Index.

Příklady citací: Horgan AM, Moore JD, Noble JE, et al.: Trends Biotechnol. 28, 485 (2010)

Lowestein KA: Silicones. A Story of Research. Wiley, New York 2006

Fujiki M. (2008): Helix generation, amplification, switching, and memory of chromophoric polymers.

In: Amplification of Chirality, Topics in Current Chemistry 248. (Soai K. ed.), Springer, Berlin, 119-201.

Novák Z.: Disertační práce. VŠCHT Praha 2008.

<http://www.fs.fed.us/research/>, staženo 3. září 2011.

Tabulky se označují římskými číslicemi. Každá tabulka je opatřena názvem a popisem umístěným nad tabulkou. Obrázky se číslují arabskými číslicemi (příklad formátu **Obr. 1:**). Každý obrázek musí být opatřen legendou, která jej činí jednoznačně srozumitelným (tj. bez nutnosti hledat nezbytné informace v textu). Obrázky nevkládejte do textu rukopisu, ale zasílejte je samostatně v některém z běžných formátů např. tif, jpg (rozlišení 300 dpi).

Rukopisy je třeba zaslat e-mailem na adresu jan.kas@vscht.cz nebo na petra.lipovova@vscht.cz. Bližší informace naleznete na <http://bts.vscht.cz>.

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

The manuscript must be provided with the full name of authors, the institutions name and with e-mail addresses. Text is presented in a MS Word (doc, docx, rtf) format, single line spacing, font Arial, font size 11. The size is not restricted.

The article contains the following sections: title, authors and institutions, e-mail address of the corresponding author, introduction, text divided into chapters, conclusions, references, summary and keywords in English, summary and keywords in Czech. References are numbered according to their appearance in the text and as an exponent (without parentheses) in the appropriate place in the text.

Examples: Horgan AM, Moore JD, Noble JE, et al.: Trends Biotechnol. 28, 485 (2010)

Lowestein KA: Silicones. A Story of Research. Wiley, New York 2006

Fujiki M. (2008): Helix generation, amplification, switching, and memory of chromophoric polymers.

In: Amplification of Chirality, Topics in Current Chemistry 248. (Soai K. ed.), Springer, Berlin, 119-201.

Novak Z.: Diploma Thesis, ICT Prague 2008.

<http://www.fs.fed.us/research/>, downloaded 1st September 2011

Tables are numbered by Roman numerals. Each table is provided with a name and description placed above the table. Pictures are numbered in Arabic numerals (example format **Fig. 1:**). Each image must be provided with a legend. Pictures should be sent separately in a common format such as tif, jpg (resolution 300 dpi). Manuscripts should be sent to the e-mail address jan.kas@vscht.cz or petra.lipovova@vscht.cz. More information can be found on <http://bts.vscht.cz>.

BIOPROSPECT

Vydavatel:
BIOTECHNOLOGICKÁ SPOLEČNOST
Technická 3
166 28 Praha 6
IČ: 00570397

Zapsán do evidence periodického tisku a bylo mu přiděleno evidenční číslo:
MK ČR E 19409

Zařazen do Seznamu recenzovaných neimpaktovaných periodik
vydáváných v ČR platnému pro rok 2014.

Tiskne:
VENICE Praha, s.r.o.
Za Hanspaulkou 13/875
160 00 Praha 6

ISSN 1210-1737

Neprodejné – jen pro členy Biotechnologických společností.

Stránky biotechnologické společnosti (<http://bts.vscht.cz>)
jsou archivovány Národní knihovnou ČR (www.webarchiv.cz).