

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra genetiky a šlechtění



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

**Neuronální ceroidní lipofuscinóza způsobená mutací genu
CLN6 u plemen psů využívaných pro canisterapii**

Bakalářská práce

Autor práce: Markéta Maroušková

Obor studia: Zoorehabilitace a asistenční aktivity se zvířaty

Vedoucí práce: doc. Dr. Ing. Pavel Vejl

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Neuronální ceroidní lipofuscinóza způsobená mutací genu CLN6 u plemen psů využívaných pro canisterapii" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 16.7. 4. 2020 _____

Poděkování

Chtěla bych touto cestou poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce doc. Dr. Ing. Pavlu Vejlovi za pomoc, cenné rady a především trpělivost při zpracování teoretické i experimentální části práce. Zároveň mé díky patří i Ing. Daniele Čílové, která se podílela na přípravě vzorků pro experiment a poskytla mi mnoho odborných rad během naší spolupráce. Na závěr bych jedno malé díky věnovala i svému blízkému příteli Jakobovi Peterovi Slivkovi za jeho trpělivost, když mi vysvětloval biochemické procesy v lidském těle.

Neuronální ceroidní lipofuscinóza způsobená mutací genu *CLN6* u plemen psů využívaných pro canisterapii

Souhrn

Bakalářská práce je zaměřena na onemocnění neuronální ceroidní lipofuscinózy mutací genu *CLN6* u plemene australský ovčák, které nachází své využití i jako pes vhodný pro canisterapii. Práce je rozdělena na dvě části.

První část je věnována literární rešerši o nemoci, jejím mechanismu, zároveň srovnává různé genetické příčiny a symptomy u člověka a u psa. Neuronální ceroidní lipofuscinóza patří mezi poruchy metabolismu lyzozomů v buňkách, též známé jako poliodystrofie. Dědí se autozomálně, převážně recesivně a projevuje se progresivními neurodegenerací. Mezi hlavní symptomy patří slepota, ztráta kognitivních a motorických funkcí a předčasná smrt. Fluorescenční mikroskopii jsou u nemocných jedinců pozorovatelné shluky lipopigmentů ceroidu a lipofuscinu, které se v lyzozomech akumulují vlivem chybně fungující autofagie. Defekt způsobuje nesprávně translatovaný protein, specifický pro každý mutovaný gen.

U člověka bylo zjištěno 16 kauzálních genů zapojených do nemoci a u psa 8 kauzálních genů. Nástup nemoci a její progresse byla u psů srovnatelná s projevy nemoci u člověka, pes se tudíž jeví jako vhodný model pro výzkum možných terapií, které by se daly aplikovat i na člověka.

Druhá část práce byla věnována vlastnímu experimentu. Cílem bylo navrhnout funkční PCR-RFLP marker, kterým by bylo možné odlišit mutované a nemutované alely genu *CLN6*. Byla navržena dvojice primerů pro amplikon o velikosti 332 bp. Pomocí bioinformatické analýzy bylo zjištěno, že enzym *FauI* je schopen štěpit pouze mutovanou alelu v místě mutace (c.829T>C) na fragmenty o velikosti 195 a 137 bp. Navržený marker má kodominantní charakter - umí odlišit i heterozygoty (=přenašeče nemoci).

Pro experiment se použily vzorky 20 psů, přičemž 1 z nich byl již dříve testován v jiné laboratoři jako přenašeč. Navrženým markerem se potvrdilo, že se jedná skutečně o heterozygota. Potenciálním heterozygotem mohl být i další pes, který je s tímto v příbuzenském vztahu. U tohoto vzorku byl však zřejmě chybně proveden odběr buňkových stěrů a během transportu došlo k degradaci DNA. Analýza u tohoto psa tudíž nemohla být provedena.

Použitá metoda se i tak jeví jako účinná a je vhodná pro použití za účelem populační analýzy a zmapování výskytu mutované alely genu *CLN6* u plemene australský ovčák v České republice.

Klíčová slova: pes domácí, *Canis familiaris*, neuronální ceroidní lipofuscinóza, australský ovčák, gen *CLN6*, PCR-RFLP

Neuronal ceroid lipofuscinosis caused by mutation of the *CLN6* gene in dog breeds used for canistherapy

Summary

The bachelor thesis focuses on the disease of neuronal ceroid lipofuscinosis caused by mutations of the *CLN6* gene in the Australian Shepherd breed, which finds its use as a dog suitable for canistherapy. The work is divided into two parts.

The first part is devoted to a literature research on the disease and its mechanism, at the same time it compares various genetic causes and symptoms in humans and dogs. Neuronal ceroid lipofuscinosis is a disorder of lysosome metabolism in cells, also known as poliodystrophy. It is inherited autosomally, mostly recessively, and manifests as progressive neurodegeneration. Main symptoms include blindness, loss of cognitive and motor functions and premature death. Fluorescence microscopy reveals clusters of ceroid and lipofuscin lipopigments in diseased individuals that accumulate in lysosomes due to malfunctioning autophagy. The defect is caused by an incorrectly translated protein specific for each mutated gene.

There were 16 causal genes involved in the disease in humans and 8 causal genes in dogs. The onset of the disease and its progression in dogs was comparable to the manifestations of the disease in humans, so the dog appears to be a suitable model for research into possible therapies that could be applied to humans.

The aim of the second part was to design a functional PCR-RFLP marker that could distinguish mutated and non-mutated alleles of the *CLN6* gene. A primer pair for a 332 bp amplicon was designed. Using bioinformatic analysis, the *FauI* enzyme was found to be able to cleave only the mutated allele at the mutation site (c.829T> C) into 195 and 137 bp fragments. The proposed marker has a codominant character - it can also distinguish heterozygotes (disease carriers).

Samples of 20 dogs were used for the experiment, one of which had previously been tested in another laboratory as a carrier. The proposed marker confirmed that they were indeed heterozygous. Another dog whose case is related to this could also be a potential heterozygote. However, buccal swabs appear to have been incorrectly taken from this sample and DNA degraded during transport. Therefore, analysis for this dog could not be performed.

The method used still appears to be effective and is suitable for use in population analysis and to map the occurrence of a mutated allele of the *CLN6* gene in the Australian Shepherd breed in the Czech Republic

Keywords: dog, *Canis familiaris*, neuronal ceroid lipofuscinosis, Australian Shepherd, *CLN6* gene, PCR-RFLP

Obsah

1	Úvod	8
2	Cíl práce	9
2.1	Vědecké hypotézy	9
2.2	Cíle práce	9
3	Literární rešerše	10
3.1	Australský ovčák	10
3.1.1	Australský ovčák v canisterapii	11
3.2	Neuronální ceroidní lipofuscinóza	12
3.2.1	Mechanismus nemoci	13
3.2.1.1	Endozomálně lysozomální systém	13
3.2.1.2	Mitochondrie	17
3.2.1.3	Lipopigmenty	19
3.3	NCL u psa domácího	21
3.3.1	Mutace genu <i>CLN1</i> u člověka	22
3.3.2	Mutace genu <i>CLN2</i> u člověka	25
3.3.3	Mutace genu <i>CLN3</i> u člověka	28
3.3.4	Mutace genu <i>CLN4</i> u člověka	28
3.3.5	Mutace genu <i>CLN5</i> u člověka	29
3.3.6	Mutace genu <i>CLN6</i> u člověka	32
3.3.7	Mutace genu <i>CLN7</i> u člověka	33
3.3.8	Mutace genu <i>CLN8</i> u člověka	34
3.3.9	Mutace genu <i>CLN9</i> u člověka	35
3.3.10	Mutace genu <i>CLN10</i> u člověka	35
3.3.11	Mutace genu <i>CLN11</i> u člověka	36
3.3.12	Mutace genu <i>CLN12</i> u člověka	36
3.3.13	Mutace genu <i>CLN13</i> u člověka	37
3.3.14	Mutace genu <i>CLN14</i> u člověka	37
3.3.15	Jiné mutované geny u člověka související s NCL	38
3.3.16	Další plemena s nálezem NCL	38
3.4	Léčba a terapie	39
3.5	Genetické testování	41
3.5.1	Molekulární markery	41
3.5.2	PCR	41
4	Materiál a metody	43
4.1	Hodnocení psi	43
4.2	Izolace DNA	44
4.3	Navržení PCR-RFLP markeru pro identifikaci kauzální mutace genu <i>CLN6</i> popsané Katz et al. (2011)	45
4.3.1	PCR amplifikace fragmentu genu <i>CLN6</i> s kauzální mutací	45
4.3.2	Detekce alel genu <i>CLN6</i> pomocí restričního štěpení	46
5	Výsledky	47
5.1	Izolace DNA	47
5.2	Bioinformatická analýza kauzální mutace genu <i>CLN6</i> a navrhování PCR-RFLP markeru	47
5.2.1	Bioinformatická analýza genu <i>CLN6</i>	47
5.2.2	Navržení dvojice PCR-RFLP markeru	50
5.3	Genotypizace vybraných zástupců plemene australský ovčák	52
5.3.1	Elektroforeogramy použité pro identifikaci genotypu	52
5.3.2	Přehled výsledků genotypizace vybraných zástupců plemene australský ovčák	54
6	Diskuze	55
7	Závěr	56

8	Seznam obrázků a tabulek	57
8.1	Seznam obrázků	57
8.2	Seznam tabulek.....	57
9	Literární zdroje	58

Úvod

Plemeno australského ovčáka (AO) se v posledních letech těší velké oblibě, a to jak v domácím prostředí, tak i v pracovním, do kterého řadíme například i canisterapeutickou činnost a asistenční aktivity se zvířaty. Poptávka po plemeni narůstá především díky jeho specifické ideální povaze, která je vhodná hlavně pro aktivní majitele. Australský ovčák vedle svojí pracovitosti a učenlivosti totiž vyniká také energičností a pro uspokojení svých potřeb vyžaduje mnohem více pozornosti, než tomu obvykle bývá u jiných plemen užívaných v zoorehabilitaci.

Zároveň nové majitele přitahuje svojí širokou variabilitou fenotypu, v dnešní době nejčastěji tzv. „merle“ zbarvením, které se vyznačuje typickými geneticky podmíněnými skvrnami na srsti, často doprovázené heterochromií. Toto zbarvení s sebou ovšem nese velká zdravotní rizika postihujících zrak, pohybovou soustavu, srdeční činnost, ale i reprodukční systém.

Bohužel se ale nejedná o jediný genetický defekt plemene, a proto bývá u chovatelů AO zvykem před uchovněním psa jej nechat geneticky testovat na nejrůznější choroby, které by mohly plemeno v následujících generacích ohrozit.

Jednou z těchto testovaných nemocí je i neuronální ceroidní lipofuscinóza, progresivní neurodegenerativní onemocnění vyskytující se jak u psů, tak i u jiných druhů savců, včetně člověka. Typickými projevy nemoci jsou zhoršení kognitivních a psychomotorických funkcí, ztráta zraku, epileptické záchvaty a předčasná smrt.

Nemoc se v rámci různých plemen projevuje jinými kauzálními geny a mutacemi, u australského ovčáka je nositelem mutace gen *CLN6* a *CLN8*.

Tato práce je zaměřena na gen *CLN6* a konkrétní substituční mutaci c.829T>C, která má za následek záměnu tryptofanu za arginin, a způsobuje tedy nefunkčnost proteinu *CLN6*.

Experimentální část se soustředí na navržení vhodného genetického markeru pro mutovaný gen *CLN6* a následnou identifikaci mutace v genu pomocí PCR-RFLP a restričního štěpení.

1 Cíl práce

2.1 Vědecké hypotézy

- Genetické příčiny vzniku neuronální ceroidní lipofuscinózy jsou u různých plemen způsobeny mutacemi různých genů. U plemene australský ovčák se předpokládá, že toto onemocnění způsobuje substituční mutace 7. exonu genu *CLN6*.
- Kauzální mutace způsobuje vznik restrikčního místa pro enzym *FauI*. Existuje tudíž předpoklad pro navržení PCR-RFLP markeru odlišujícího původní a mutovanou alelu genu *CLN6*.

2.2 Cíle práce

Cílem práce je zpracovat literární rešerši zaměřenou na genetické příčiny vzniku neuronální ceroidní lipofuscinózy u psů. Experimentální část práce je zaměřena na navržení genetického markeru pro identifikaci kauzální mutace genu *CLN6* u plemene australský ovčák.

2 Literární rešerše

3.1 Australský ovčák

Australský ovčák je středně velké plemeno psa, které má navzdory svému jménu původ ve Spojených státech. Byl už od počátku pro svoji neúnavnost a pracovitost využíván jako pastevec ovcí na rančích. Existuje mnoho teorií, jak australští ovčáci přišli ke svému jménu. Jednou z teorií je odvození jména od dovážených ovcí, které hnali, nebo podle zbarvení blue merle, ke kterému se přídavné jméno „australský“ přidávalo. (Coile 1999) Populární teorií je také jejich podobnost s baskickými ovčáky, kteří byli importováni do Spojených států právě z Austrálie.

Svým vzhledem jsou velmi podobní border koliím a bývají s nimi často zaměňováni. Uznávané barvy jsou černá, blue merle, červená merle a červená a každá z těchto barev může také obsahovat různé kombinace bílých znaků na krku, na hrudi, končetinách, na spodní straně tlamy a jako lysinka na hlavě. Díky tomu je u toho plemene dostupná široká škála zbarvení srsti. Bílá barva by ale neměla být dominantní (především na hlavě), neboť s sebou nese velká, geneticky podmíněná, zdravotní rizika.

Mezi další typické znaky pro AO patří ocas, který může být přirozeně dlouhý, nebo naopak krátký (nepřesahuje 10 cm), trojúhelníkové, vysoko nasazené uši a hnědé, modré nebo jantarové oči, případně kombinace těchto barev. Často se vyskytuje heterochromie. U blue merle a černých jedinců jsou oči lemovány černou barvou, stejně jako je nos černý, red merle a červení jedinci mají naopak játrový (hnědý) nos a okraje očních víček. (Císařovský 2008)



Obrázek 1: Australský ovčák. Převzato z www.pets4homes.co.uk/

3.1.1 Australský ovčák v canisterapii

Pro canisterapii nejsou vymezena žádná vhodná plemena, vždy záleží na povaze a na kondici jednotlivých psů. Australský ovčák je velmi aktivní plemeno, známé pro svoje nadšení pro práci a rychlou učenlivost. Bývá zároveň velmi přítulný a poslušný a s lidmi se snáší velice dobře. Je proto vhodným kandidátem pro canisterapeutickou činnost.

3.2 Neuronální ceroidní lipofuscinóza

Tato bakalářská práce se zabývá onemocněním neuronální ceroidní lipofuscinózy u člověka i u psa, neboť existuje široká variabilita kauzálních mutací, které můžeme pozorovat u konkrétních plemen. Pes se také jeví jako ideální model pro vývoj nových terapeutických prostředků. Ty by se pak mohly aplikovat i u člověka.

Neuronální ceroidní lipofuscinóza (NCL) je dědičné neurodegenerativní onemocnění charakteristické střádáním autofluorescenčního materiálu lipofuscinového charakteru v neuronech a jiných tkáních, následkem čehož dochází u postiženého jedince k progresivní neurodegeneraci končící předčasným úmrtím. V lidské populaci se jedná o jedno z nejčastějších dětských onemocněním neurogenetického typu, známé též jako Battenova choroba, které se řadí mezi tzv. poliodystrofie. Jedná se o nemoci, které jsou způsobené geneticky podmíněnou poruchou metabolismu a odbourávání lipidů. V případě NCL se jedná o ceroid a lipofuscin, lipopigmenty, které poškozují buňku jak toxicky, tak i mechanicky (Vlachová 2005).

NCL se dědí autozomálně, vyjma jednoho případu recesivně, a v současné době bylo popsáno mnoho forem, které se odlišují kauzativním mutantním genem a dobou nástupu nemoci (viz tabulka 1), přičemž jejich patomorfologické projevy v buňkách zůstávají stejné (viz následující kapitoly).

Ve Spojených státech se prevalence v lidské populaci uvádí 1:12 500 (Zeman 1969; Rider et al., 1988).

Tabulka 1: Přehled kauzálních genů spojených s NCL u člověka (převzato z databáze UCL)
CLN: označení genu pro NCL; PPT: palmitoyl-protein thioestráza 1; TPP1: tripeptidyl peptidáza 1; CSP α : Cystein-string protein alpha; CTSD: cathepsin D; CTSF: cathepsin F

GEN	PROTEIN	NÁSTUP	LOKALIZACE (Rakheja a Bennet 2018)	FUNKCE (Huber, 2016)
<i>CLN1</i>	PPT	INCL	1p32	Lysozomální enzym
<i>CLN2</i>	TPP1	LINCL	11p15.5	Lysozomální enzym
<i>CLN3</i>	CLN3	JNCL	16p12.1	Transmembránový protein
<i>CLN4</i>	CSP α	ANCL	15q21-q23	Membránový protein
<i>CLN5</i>	CLN5	LINCL	13q21.1-q32	Lysozomální protein
<i>CLN6</i>	CLN6	LINCL	15q21-q23	Transmembránový protein
<i>CLN7</i>	MFSD8	LNCL	4q28.1-q28.2	Transmembránový protein
<i>CLN8</i>	CLN8	LNCL	8pter-8p22	Transmembránový protein
<i>CLN9</i>	CLN9	JNCL	neuveдено	neuveдено
<i>CLN10</i>	CTSD	CNCL	11p15.5	Lysozomální enzym
<i>CLN11</i>	PGRN	ANCL	17q21.31	neuveдено
<i>CLN12</i>	ATP13A2	JNCL	1p36.13	Transmembránový protein
<i>CLN13</i>	CTSF	ANCL	11q13.2	Lysozomální enzym
<i>CLN14</i>	KCTD7	INCL	7q11.21	Membránový protein
<i>CLCN6</i>	neuveдено	LINCL	neuveдено	neuveдено

SGSH	neuveдено	ANCL	neuveдено	neuveдено
ARSG	neuveдено	neuveдено	neuveдено	neuveдено

- **CNCL** (kongenitální forma), velmi vzácná, dítě se rodí s abnormálně malou hlavou (mikrocefalií) a se záchvaty, umírá brzy po porodu.
- **INCL** (infantilní forma, též Santavuoriho-Haltiova choroba) nastupuje mezi 6 měsíci a 2 lety a postupuje velmi rychle. Typicky se objevují krátké, ostré svalové kontrakce nazývané myoklonické záchvaty, které spadají do kategorie epileptických záchvatů. Dítě také bývá postiženo mikrocefalií. Úmrtí se udává kolem 5. roku. (Mantel et al. 2004)
- **LNCL** (dětská forma) postihuje děti kolem 2. a 4. roku života, s úmrtím do 12 let.
- **JNCL** (juvenilní forma), též často označována jako Battenova choroba, je způsobena mutací genem CLN3 (ostatní juvenilní formy jsou nazývány CLN9). Nemoc se u dítěte začne projevovat kolem 5.-10. roku, ve vegetativním stavu se může takto postižený člověk dožít i 30 let. Všechny dětské formy NCL jsou klinicky charakterizovány především progresivní deteriorací motorických i kognitivních funkcí, slepotou a epileptickými záchvaty. (Gardiner et al. 1990)
- **ANCL** (adultní forma), NCL která se projevív v dospělosti, se vyznačuje především demencí následkem degenerativních změn v mozkové tkáni (Haltia 2003).

3.2.1 Mechanismus nemoci

3.2.1.1 Endozomálně lysozomální systém

V buňkách savců existuje několik způsobů, jak degradovat nepotřebné či nefunkční proteiny a organely – nejznámější je ubiquitin-proteasový systém a autofagie končící degradací makromolekul v lysozomech. Oba tyto mechanismy se vzájemně doplňují, a udržují tak v buňce homeostázi mezi anabolickými a katabolickými ději (Voges 1999).

Lysozomy jsou součástí endozomálního systému eukaryotických buněk (Dack et al. 2009) a jejich hlavní rolí je degradace endocytovaného nebo intracelulárního materiálu prostřednictvím působení více než 50 rozpustných kyselých hydroláz (např. glykosidázy, proteázy, lipázy, nukleázy, fosfatázy) a více než 120 proteinů v membráně lysozomu (Brulke a Bonifacino 2009). Ultrastrukturálně se v cytosolu jeví jako váčky, jejichž povaha se může různit podle typu buňky a podle aktuálního stavu organely – např. jejich velikost a počet se může drasticky zvýšit následkem nahromadění nestráveného materiálu (Appelqvist et al. 2013). Tvar se pohybuje od sférického po trubkovitý. Velikosti lysozomů se liší v závislosti na typu buňky; ve většině buněk je velikost lysozomů menší než 1 μm (např. hepatocyty, neurony), v některých buňkách (např. makrofágy) mohou přesáhnout i několik mikronů (Lüllmann-Rauch 2005).

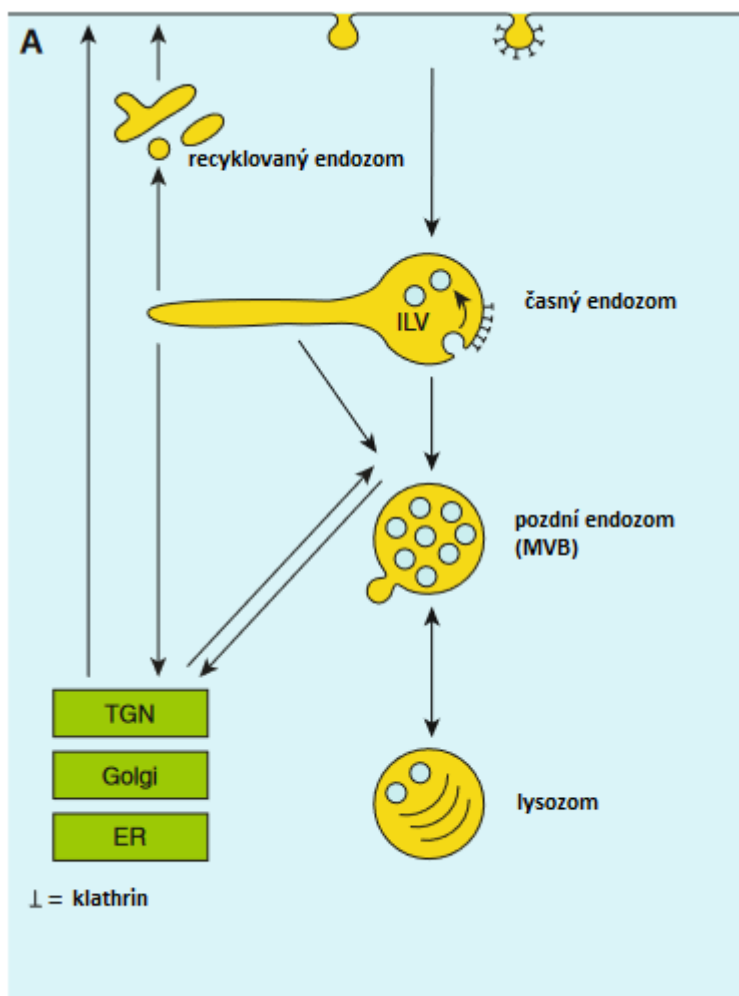
Před degradací ostatních buněčných složek silnými katabolickými enzymy chrání buňku lysozomální membrána – jednoduchá fosfolipidová dvojvrstva o tloušťce 7–10 nm (Saftig et al. 2010). Lysozomální membrána však představuje více než jen mechanické ohraničení, musí totiž plnit velké množství různých funkcí, včetně udržování pH gradientu mezi lysozomálním

lumenem a cytoplazmou buňky. V lysozomu se totiž pH pohybuje mezi hodnotami 4 a 5 a je udržovaná protonovou ATP závislou protonovou pumpou v membráně (Terman et al. 2010; DiCiccio a Steinberg 2011). Membrána lysozomu zároveň zprostředkovává fúzi s endozomy nebo jinými organelami, přičemž řídí průchod materiálu, a zařizuje také transport degradačních produktů do cytoplazmy (Eskelinen et al. 2003).

Prostřednictvím receptoru se primární lysozomy, které obsahují nově vzniklé hydrolázy, fúzí se stravitelným substrátem, a vznikají tak sekundární lysozomy. Nestravitelný substrát se hromadí jako tzv. „pigment stáří“ v terciálních lysozomech. (Cataldo et al. 1994)

Vznik lysozomů

Podle studie van Meel a Klumperman (2008) existuje nejméně pět různých způsobů, jak může v buňce vzniknout vezikul. Nejlépe zdokumentována je „klasická“ endocytóza zprostředkovaná proteinem klathrinem (Obrázek 1). Ta začíná napojením ligandy na receptor zasazený v membráně do tzv. „povlečené jamky“ (angl. coated pit), jež zaktivuje činnost proteinu klathrinu, kterým je jamka povlečena na cytosolové straně. Klathrin na membráně vytvoří síť, která následně odškrucuje část membrány za vzniku transportního váčku.



Obrázek 2: Vznik lysozomů (van Meel a Klumperman 2008)

Tyto nové vezikuly se následně zbavují pláště z klathrinu a vznikají časné endozomy.

Endozomy mají mírně kyselé pH, které způsobuje oddělení některých ligandů (v tomto případě již materiálu zachycenému k degradaci) z jejich receptorů. Vyprázdněné receptory pak putují pomocí recyklačních endozomů zpět na plazmatickou membránu, případně trans-Golgiho síť (TGN).

Během zrání do pozdního endozomu se zvyšuje obsah váčků uvnitř lumenu, tzv. intraluminální váčky (ILV), proto jsou endozomy často označovány jako multivezikulární tělíska (MVB). Ta následně mohou ILV vypustit ven z buňky po fúzi s cytoplazmatickou membránou jako exozomy, nebo se spojit s lysozomy (Edgar 2016).

Postupným zráním v lysozom MVB obsahuje méně endocytovaného materiálu určeného k recyklaci, ale větší množství lysozomálních proteinů. Ty jsou syntetizovány v endoplazmatickém retikulu a Golgiho komplexu a pak vstupují do TGN. Mezi TGN a endozomálním systémem tak vzniká spousta cest, které zprostředkovávají transport esenciálních složek pro správné fungování lysozomů. (van Meel a Klumperman 2008)

Pro lysozomy jsou nezbytné dvě třídy proteinů: rozpustné lysozomální hydrolázy a proteiny lysozomální membrány, které jsou silně glykosylovány. Jejich oligosacharidová složka mannososa-6-fosfát funguje v tomto případě jako adresa pro doručení proteinu z Golgiho komplexu do lysozomu. Nutno podotknout, že tato cesta není jediná, nicméně je nejznámější, a jakékoliv chyby v tomto systému, ať už u transportu či syntéze proteinů, mohou vést k problémům, které postihují fungování celého organismu. (van Meel a Klumperman 2008)

Autofagie

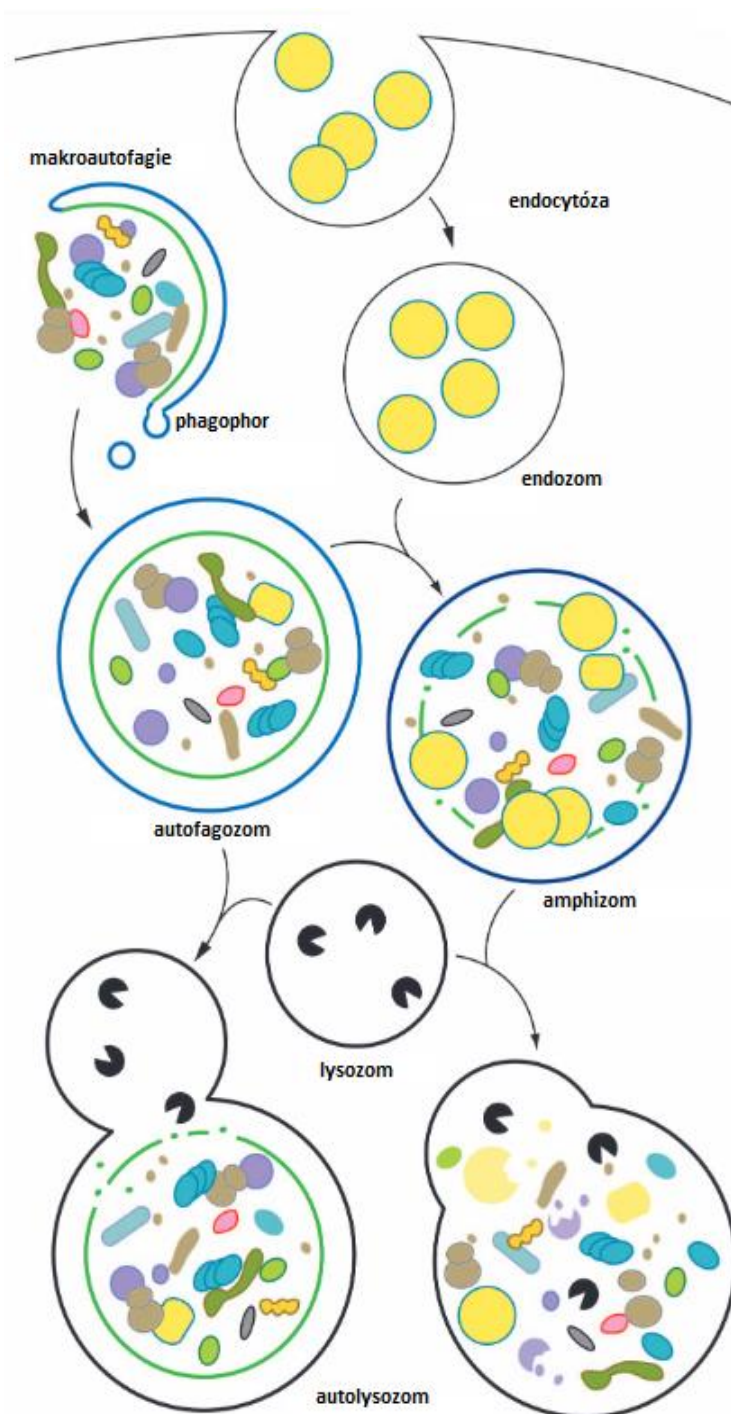
Autofagie je katabolický proces, při kterém dochází k uzavření cytoplazmatického materiálu dovnitř dvojitých membrán autofagozomů a transportu k následné degradaci v lysozomu (Dupont et al. 2017). Uvádí se, že autofagie je aktivována především během stresových podmínek, jako je hladovění buňky nebo virová infekce. Savčí buňky používají autofagii během těchto situací k degradaci nepotřebných buněčných složek, čímž uvolní materiál pro jiné životně důležité biosyntetické reakce. Autofagie také přispívá k vývoji, k regulaci růstu a dlouhověkosti buňky. Při nedostatcích v tomto procesu také dochází k různým onemocněním, např. k rakovině (Eskelinen, 2000-2013) nebo i k neurodegenerativním onemocněním jako je Parkinsonova nemoc (Klionsky a Emr, 2000) nebo právě NCL (Terman et al. 2010).

Makroautofagie

V závislosti na způsobu předání cytoplazmatického materiálu do lysozomálního lumenu se rozlišují tři různé autofagické cesty: 1) makroautofagie nebo jednoduše autofagie, 2) mikroautofagie a 3) autofagie zprostředkovaná chaperonem, z nichž první – makroautofagie – je nejlépe prozkoumaná. (Feng et al. 2014)

U makroautofagie samotné dále rozlišujeme dva poddruhy, které se odvíjí od zpracovávaného materiálu: 1) neselektivní (za stavu nutriční deprivace) a 2) selektivní, která rozlišuje a vede k degradaci konkrétní organely nebo makromolekuly. Mezi nejznámější

selektivní autofagie patří mitofagie (mitochondrie), pexofagie (peroxizomy), nukleofagie (nukleus) nebo xenofagie (patogenní mikroorganismy) a další, které uvádí ve své práci Jin et al. (2013) a Mochida et al. (2015).



Obrázek 3: Vznik autofagozomu a fúze v autolysozom (Klionsky et al. 2014)

Makroautofagii lze jednoduše rozdělit do několika základních kroků: signalizace v buňce, sekvestrace cytoplazmy, tvorba vezikuly kolem cytosolu pomocí membrány - tzv. phagophoru, a přemístění vzniklého autofagozomu k lysozomu (Wang a Klionsky 2003). Autofagozomy samy nejsou schopny degradace, neboť postrádají lysozomální proteiny (Eskelinen 2005), a proto s lysozomy fúzí za vzniku nového útvaru – autolysozomu (Klionsky et al. 2014). V autolysozomu následně proběhne degradační proces.

Lysozomy se tedy spojí s autofagozomy za vzniku autolysozomů, „hybridních“ organel, které obsahují shromážděný materiál pocházející jak z vnějšku, tak i vnitřku buňky. Po dokončení degradace uzavřeného materiálu se tyto lysozomy proměňují v „odpočívající“ organely, které se připravují na další fúze a další degradační procesy. (Klionsky et al. 2014)

3.2.1.2 Mitochondrie

Mitochondrie jsou semiautonómni organely prokaryotického původu. Během evoluce se mitochondrie staly nedílnou součástí eukaryotické buňky, a to díky endosymbióze, která proběhla ve vývoji buněčných organismů před miliardami let. Jejich počet se liší v závislosti na typu buňky, od jedné až po několik tisíc mitochondrií. Přestože mitochondrie obsahují svůj vlastní genom, jejich replikace a jiné vlastní funkce jsou závislé na importu jaderně kódovaných transkriptů. (Palikaras et al. 2017)

Důležitost mitochondrií pro eukaryotickou buňku spočívá hlavně v klíčové roli při produkci adenosintrifosfátu (ATP), hlavního zdroje energie buňky, který se syntetizuje při aerobním dýchání oxidativní fosforylací zprostředkovanou komponenty elektronového transportního řetězce, které se nacházejí ve vnitřní mitochondriální membráně. Kromě toho se mitochondrie podílejí na několika dalších funkcích přispívajících k homeostáze buňky, metabolismu lipidů, nebo také k regulaci apoptotické buněčné smrti, jakož i ke kontrole zánětlivých odpovědí a mechanismů buňky (Nicholls 2005; Tait a Green 2011; Picard et al. 2015; Kim et al. 2016).

Poškození mitochondrie bývá především multifaktoriální a projevuje se nedostatkem výroby ATP a naopak nadměrnou produkcí reaktivních forem kyslíku (angl. *reactive oxygen species* = ROS). Jedním z ROS je například superoxid $O_2^{\cdot-}$, který vede k oxidačnímu poškození buněčných složek, jako jsou mitochondriální a cytoplazmatické proteiny a lipidy, pak ale také mitochondriální DNA, což znovu vede ke zvýšení produkce ROS a k dalšímu poškození organely, čímž se vytváří začarovaný kruh (Tang et al., 2015). Kromě toho může produkce ROS aktivovat tzv. mitochondrial permeability transition pore, neboli protein způsobující náhlý nárůst propustnosti mitochondrie. Tento protein je spojen s dysfunkcí organely, neboť jeho aktivace vede k mitochondriální depolarizaci, zastavení syntézy ATP, uvolnění Ca^{2+} , inhibice respirace a v neposlední řadě k otoku matrixu, který zapříčiňuje rupturu vnější mitochondriální membrány a nakonec i uvolnění proapoptických proteinů, jako je cytochrom c, jehož mobilizace vede k buněčné smrti (Bernardi a Di Lisa 2015).

Mitofagie

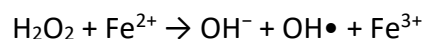
Makroautofagie je nejúčinnějším mechanismem buňky, který zajišťuje úplné odstranění nevratně poškozených mitochondrií (mitofagie) (Li et al. 2012). Reparativní role mitofagie se zvyšuje za stresových podmínek. Podle studie Miwa et al. (2008) se uvádí délka života jedné mitochondrie v játrech myši na 1,83 dne, v případě dietního omezení dokonce 1,16 dne.

Mitofagie je zvláště důležitá pro dlouho žijící postmitotické buňky, jejichž mitochondrie trpí výrazným poškozením způsobené oxidačním stresem. Uvádí se, že dysfunkční mitochondrie mají za následek především urychlení mechanismu stárnutí buňky (Lemasters 2005), které se projevuje akumulací pigmentu lipofuscinu. Dalším projevem defektu mitochondrií může být i například rozvoj Parkinsonovy choroby (Youle a Narendra, 2011). Přesně fungující mitofagie je tedy pro buňku klíčová i z důvodu potenciálního poškození následných autofagických procesů, při kterých je cytosol ohrožen vypuštěním toxických proteinů z lysozomů, což může nakonec vyústit v buněčnou smrt (Todde et al. 2009).

Oxidační stres

Při autofagii dochází uvnitř lysozomu k degradaci makromolekul obsahujících železo, jako jsou například feritinové a mitochondriální komplexy, následkem čehož je pak lumen lysozomu bohatý na železo, které bývá zčásti redoxně aktivní, a může tak reagovat se zbytkem obsahu lysozomu a vyvolat spolu s peroxidem vodíku (H_2O_2) pro organelu fatální oxidační stres. (Kim et al. 2015)

H_2O_2 je přítomen v lumenu buňky především kvůli mitochondriím, ve kterých vzniká v dýchacím řetězci redukcí superoxidu. Pokud se toto okysličovadlo střetne s redoxně aktivním železem, ať už v lysozomu či v mitochondrii, hrozí buňce nebezpečí, neboť peroxid interaguje s kationtem železa za vzniku hydroxylového radikálu, jak je popsáno níže v rovnici:



Tento proces je nazýván též jako Fentonova reakce a hydroxylový radikál ($OH\bullet$) je znám jakožto jedno z nejnebezpečnějších oxidačních činidel, které v buňce mohou vzniknout. Vlastností této molekuly je vysoká reaktivita, která má za následek poškození okolních struktur (Lloyd, 1997).

Přítomnost radikálů v lysozomu má za následek intralysozomální oxidaci, také nazývanou peroxidací, s výsledným poškozením lysozomální membrány a makromolekul podstupujících autofagickou degradaci. Některé oxidační produkty přitom polymerizují (vznikají lipopigmenty, např. lipofuscin), stávají se nedegradovatelnými a hromadí se v lysozomech postmitotických buněk (neurony), protože tyto buňky jej nemohou dále přirozeně rozdělovat buněčným dělením. (Terman et al. 2010)

3.2.1.3 Lipopigmenty

Lipopigmenty jsou nazývána žluto-hnědá granula nacházející se uvnitř buněk, které je možné barvit lipofilními barvivy a jeho fluoreskující struktury zobrazit pomocí UV světla (Di GUardo 2015). Zároveň reagují pozitivně na PAS (Periodic Acid Schiff) reakci, na barvivo Sudan Black B a jsou viditelná pod elektronovou mikroskopií. (Bourne 1973)

Mnoho prací uvádí existenci dvou lipopigmentů: lipofuscinu a ceroidu. Zároveň práce Perrotty et al. (2018) spolu s dalšími upozorňuje na častou záměnu těchto dvou pojmů, která plyne především z nedostatku informací o jejich biogenezi, mechanismu účinku a biologickém významu v metabolismu buněk.

Stárnoucí pigment, lépe známý jako lipofuscin (odvozeno od latinského *lipo* = tuk a *fuscus* = tmavý), je nerozpustný lipidový pigment široce rozšířený v živočišných organismech. Hromadí se v lysozomech jakožto normální součást procesu stárnutí organismu a buněk v něm, především buněk dlouhověkých a postmitotických, jako jsou neurony, srdeční myocyty, epitelální buňky retinálního pigmentu a buňky kosterního svalstva (Perrotta 2018). Poprvé byl objeven roku 1842 v Hannoveru. O jeho progresivní akumulaci v ohledu na stárnutí buňky se ale nevědělo až do konce 19. století. (Salmonowicz a Passos 2017)

Na druhou stranu, ceroid není označován za stárnoucí pigment, ale spíše je považován za patologickou jednotku spojenou s chorobnými stavy souvisejícími s věkem, jako je např.: Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, srdeční selhání a makulární degenerace. Hromadění pigmentu povahy ceroidu se v organismu objevuje i za jiných patologických podmínek, jakými jsou např. neurodegenerativní choroby (NCL), mozkové léze, nutriční cirhóza a nedostatek vitamínu E, který je příčinou tzv. lidského Brown Bowel syndromu, lipofuscinózy střev (Albrecht 2014).

Vzhledem k značně zesíťované terciální struktuře lipofuscinu a jeho nedegradovatelné povaze se uvádí, že hraje rozhodující roli při inhibici proteazomové funkce, mitofagie, autofagie, a zároveň iniciuje nadměrnou tvorbu reaktivních kyslíkových radikálů (Snyder a Crane 2019), jak je popsáno v následující kapitole.

Vznik lipofuscinu

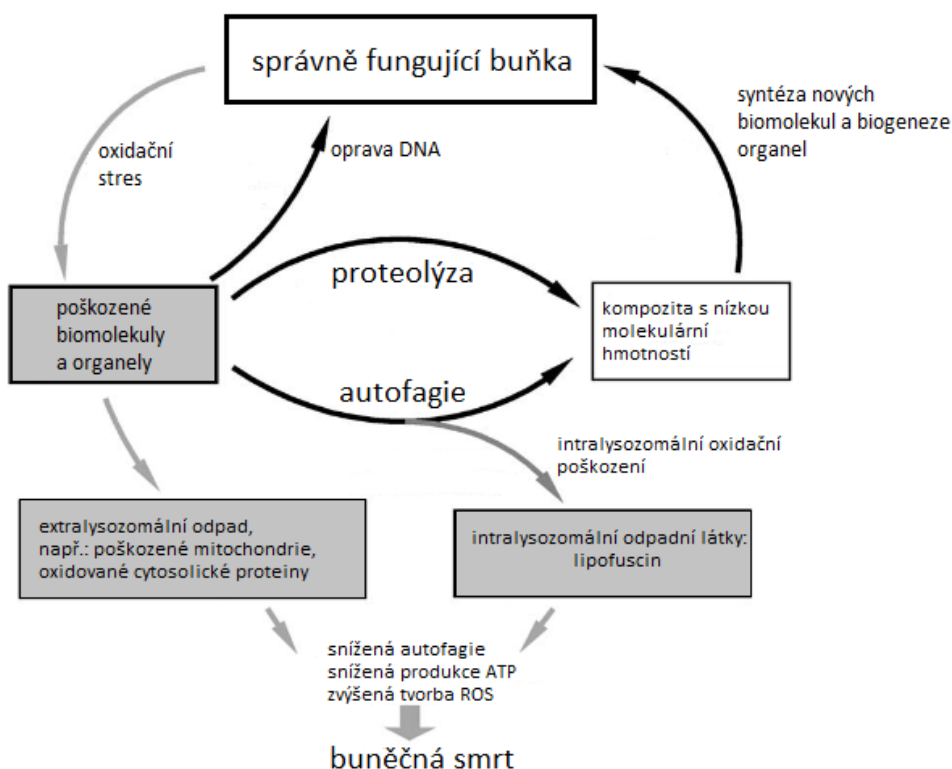
Lipofuscin nepatří mezi inertní materiál – jeho povrch je chemicky velmi reaktivní a může narušovat buněčný metabolismus. Povaha a struktura tohoto lipopigmentu se liší mezi tkáněmi. Studie Moreno-García et al. (2018) uvádí, že lipofuscin vykazuje značnou heterogenitu ve složení oxidovaných proteinů (30-70%), lipidů (20-50%), přičemž jeho toxicita spočívá především ve schopnosti vázat na sebe kovy, jako je železo, měď, zinek, mangan, hliník a vápník, a to do koncentrace až 2% (Jolly et al. 1995, Seehafer a Pearce 2006). Obsah těchto kovů obsažených v lipofuscinu je vysvětlen absorpcí proteinů na kovy bohatých, například mitochondriálních proteinů. Jung et al. ve své práci z roku 2007 dokonce udává, že v případě vrozených neuronálních lipofuscinóz asi 50% obsahu proteinů mohou být zbytky podjednotky c z mitochondriální ATP syntázy, další zdroj (Mole et al. 1999) pak udává u některých typů NCL přítomnost glykoproteinů saposinů A a D.

Takovéto složení vede k redoxně aktivnímu povrchu lipofuscinových částic, což má za

následek zvýšení Fentonovy reakce v buňce, a tím pádem se usnadňuje a urychluje tvorba lipofuscinu kvůli stále se navyšující peroxidaci lipidů a proteinů.

Lipofuscin se následně postupně akumuluje ve stárnoucích postmitotických buňkách, neboť je prakticky nestravitelný a buňky tento materiál nemohou vyloučit exocytózou, postmitotické buňky (neurony) jeho množství nemohou redukovat ani karyokinezí (Höhn a Grune 2013). Není zcela jasné, proč se v lysozomech vyskytují nedegradovatelné látky, nicméně dalším důvodem jeho toxicity je postupné vyplňování cytoplazmatického prostoru v průběhu času, které buňku omezuje mechanicky. Postupně se snižuje funkční buněčná schopnost, což nakonec vede k apoptické smrti buňky. Objem buňky obsazený lipofuscinem může dosáhnout maximálních hodnot asi 40 % z cytoplazmy u starších živočišných buněk, u stoletého člověka až 75 % v motorických neuronech. (Yin 1996)

Dalším z negativních účinků lipofuscinu uvedených v práci Jung et al. (2007) je jeho schopnost snižovat proteazomální a lysozomální degradaci. Tím, že zabírá místo v lysozomálním kompartmentu a enzymy uvnitř organely na něj soustřeďují svoji funkci, snižuje degrační kapacitu.



Obrázek 4: Cyklus oxidačního stresu a autofagie v buňce (Terman a Brunk 2005)

3.3 NCL u psa domácího

V případě lidské NCL bylo zaznamenáno více než 440 genetických variant, přehled variant NCL mutací je dostupný v databázi (<https://www.ucl.ac.uk/ncl-disease/>). Všechny lidské varianty mutací související s NCL se nacházejí na celkem 16 lokusech. Případy NCL byly identifikovány i u dalších druhů, např.: u ovcí, koček, prasat a u skotu a psů (Rossmeisl et al. 2003). Nicméně, pes domácí je pro studie NCL a případné objevení možné terapie důležitý. Většina s NCL spojených mutací byla totiž identifikována na již známých CLN genech, které jsou homologní s lidskými.

Tabulka 2: Přehled genů NCL identifikovaných u plemen psů, typ mutace, nástup nemoci a eutanázie psa

GEN	PROTEIN	MUTACE	PLEMENO	NÁSTUP (měsíce)	EUTANÁZIE (měsíce)	ZDROJ
<i>CLN1</i>	PPT1	c.124+1G>A	Italský corso pes	8	10	Kolicheski et al. (2017)
<i>CLN1</i>	PPT1	C736_737insC	Trpasličí jezevčík	8	14	Sanders et al. (2010)
<i>CLN2</i>	TPP1	c.325delC	Dlouhosrstý jezevčík	7-9	12	Katz et al. (2008)
<i>CLN5</i>	CLN5	c.619C>T	Border Kolie, Australský honácký pes	12-23	15-29	Kolicheski et al. (2016) Melville et al. z roku 2005
<i>CLN5</i>	CLN5	c.934_935delAG	Zlatý retrívr	13-17	30-34	Gilliam et al. (2015)
<i>CLN6</i>	CLN6	c.829T>C	Australský ovčák	18	24	Katz et al. (2011)
<i>CLN7</i>	MFSD8	c.843delT	Chihuahua, Čínský chocholatý pes	12	16-24	Ashwini et al. (2016) Guo et al. (2015)
<i>CLN8</i>	CLN8	delCLN8	Alpský jezevčíkovitý brakýř			Hirz et al. (2017)
<i>CLN8</i>	CLN8	neuveдено	Saluki	10-12	20	Lingaas et al. (2018)
<i>CLN8</i>	CLN8	c.491T>C	Anglický setr	12-14	24-27	Katz et al. (2005)
<i>CLN8</i>	CLN8	c.585G>A	Australský ovčák (+ kříženec)	8	21	Guo et al. (2014)
<i>CLN10</i>	CTSD	c.579G>A	Americký buldog	11-36	42-66	Evans et al. (2005)
<i>CLN12</i>	ATP13A2	c.1623G>A	Tibetský teriér	60-96	do 120	Farias et al. (2011)

Následující kapitoly poskytují informace pro srovnání klinických a fyziologických projevů mutovaného genu u člověka a u psa.

3.3.1 Mutace genu *CLN1* u člověka

Mutace v genu *CLN1* má za následek v infantilní formu, které je mezi takovými NCL u člověka nejčastější (též známá jako Santavuori-Haltiaova choroba). Začne se projevovat ve druhé polovině prvního roku života s do té doby normálním vývojem, pak začne docházet ke ztrátě motorických funkcí vedoucích k hypotonii. Ztráta zraku se objevuje přibližně kolem 1 roku a následují projevy refrakterních záchvatů. U takového jedince je přítomna mikrocefalie a úmrtí bývá obvyklé do věku 7 let. (Bennett et al. 2013)

Protein PPT1

PPT1 je malý glykoprotein, který se svojí enzymatickou funkcí podílí na lysozomální degradaci. Jeho hlavním úkolem je odstranění zbytku palmitové kyseliny z palmitoylovaných proteinů, konkrétně z aminokyseliny cysteinu (Gupta et al. 2001). Díky palmitoylaci totiž získají modifikované proteiny hydrofobní charakter, který podporuje interakci s membránami či jinými hydrofobními proteiny, díky kterým se mohou ukotvit v membránách, či být transportovány ve vezikulách. (Sanders et al. 2010)

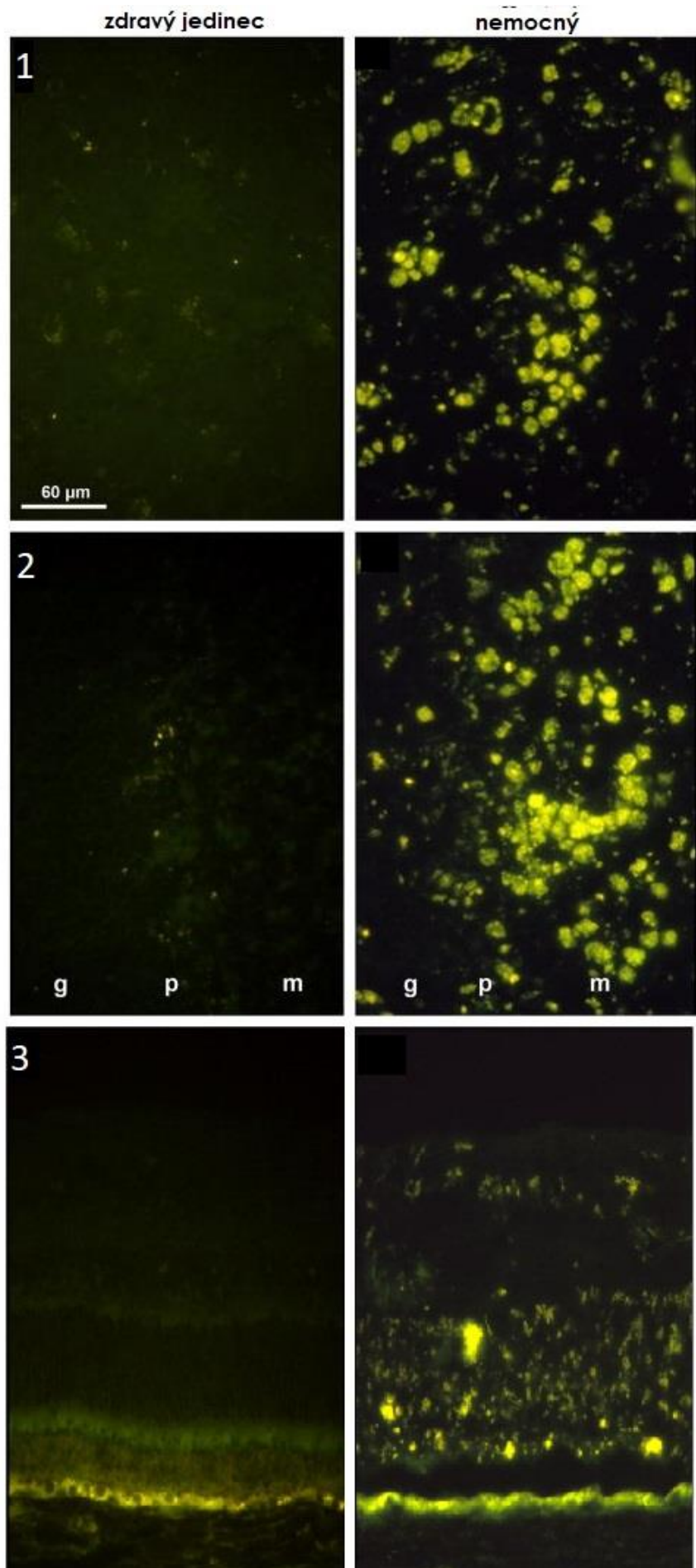
Mutace genu *CLN1* u trpasličího jezevčíka

Sanders et al. (2010) zkoumali případ psa trpasličího jezevčíka, který se narodil po incestím spojení matky/syna. Poté, co po dobu několika měsíců vykazoval progresivní neurologické příznaky (vypsány níže), byl pes vyšetřen ve věku 9 měsíců u veterinářských specialistů v jižní Floridě. Následně byla prováděna pravidelná neurologická a oftalmologická vyšetření po dobu 5 měsíců a na základě klinických příznaků a progresivní povahy byl diagnostikován NCL. V 7 měsících fundoskopie odhalila těžkou degeneraci sítnicových cév a řidnutí celé sítnice. Pes byl utracen ve věku 14 měsíců na žádost majitele a s jeho souhlasem se odebraly vzorky k dalším analýzám.

Projevila se zvýšená nervozita, snížená interakce s jinými psy v domácnosti, závažné ztráty schopnosti rozpoznávat nebo odpovídat na příkazy (na jeho jméno), ztráta schopnosti rozpoznat majitele a jiné osoby v domácnosti, zvýšená citlivost na hlasité zvuky, cyklické chování, zvýšení vokalizace, ztráta schopnosti přelézt překážky (schody), třes, ztráta orientace, těžká ztráta zraku, přetrvávající hlavové pohyby, narážení do překážek.

Během mikroskopické analýzy (Obrázek 4) byla nalezena ložiska autofluorescenčního materiálu v neuronech sítnice (3), cerebella -především v granulární vrstvě (2) a v mozkové kůře (1).

Mutace popsaná v tomto výzkumu je inserce jedné báze, následkem čehož dochází k posunu čtecího rámce. Takovýto posun vede ke ztrátě jedné ze tří aminokyselin jádra, což se pro enzym PPT1 stává fatální hlavně z hlediska možného narušení hydrofobního jádra v případě nesprávné translace, které slouží jako vazebné místo pro substráty enzymu.

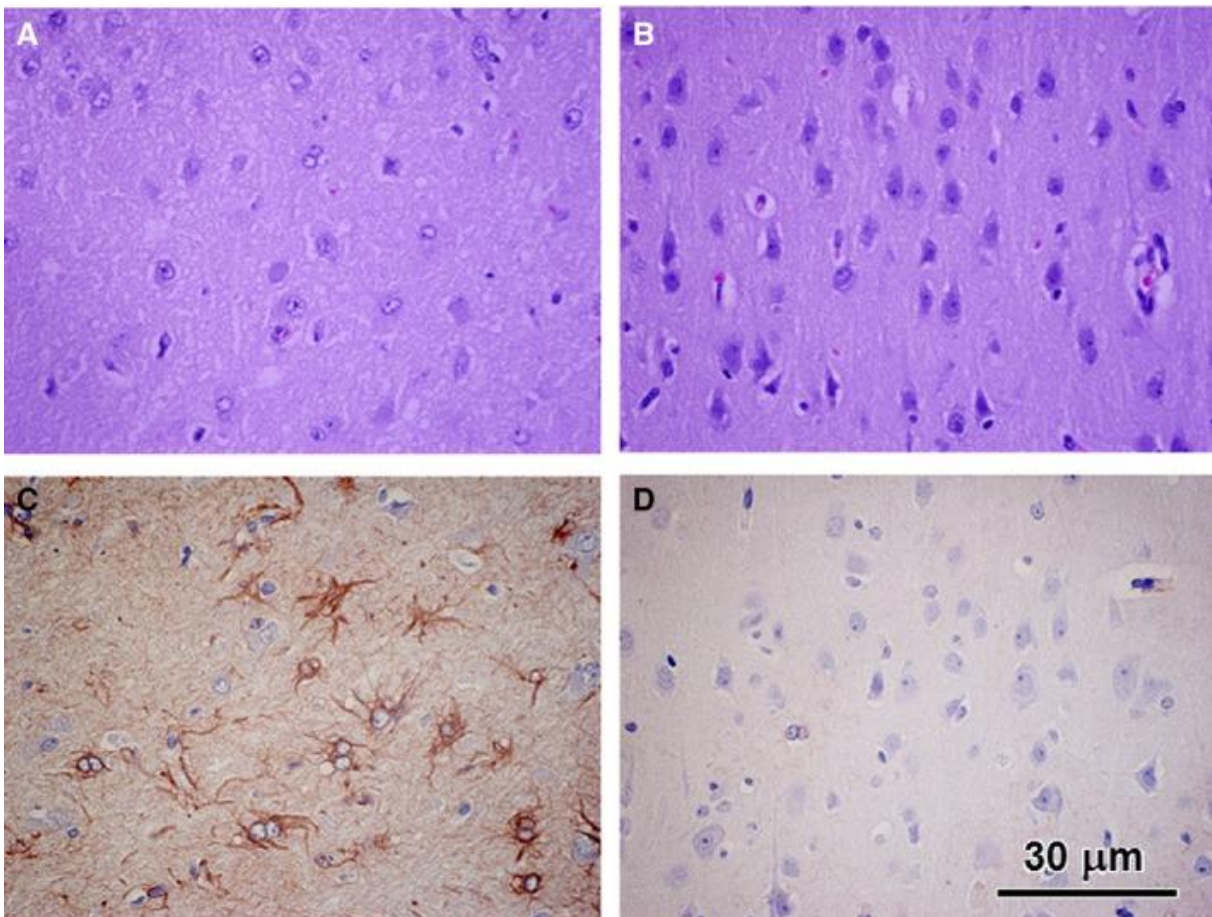


Obrázek 5: Autofluorescenční materiál v neuronech sítnice u trpasličího jezevčíka (Sanders et al. 2010)

Mutace genu *CLN1* u italského corso psa

Ve věku 10 měsíců byla přijata fena na Univerzitu ve Wisconsinu (Kolicheski et al. 2017). Přibližně dva měsíce před příjmem začala fena vykazovat známky letargie, ataxie a šerosleposti, do dvou měsíců přišla o zrak úplně. Během neurologického vyšetření ve škole veterinární medicíny se přišlo na absenci pupilárního reflexu, strabismus, absenci reakce levé pánevní končetiny při posturální zkoušce (tzv. *hopping*), mírnou ataxii a hypermetrii všech končetin. Jelikož docházelo k neustálému zhoršování stavu, byla provedena eutanázie feny.

Na snímcích pořízených během mikroskopické analýzy (Obrázek 5) je patrné, že fena vykazovala výrazně nižší hustotu buněk ve vnější granulózní vrstvě mozkové kůry (A) ve srovnání se zdravým jedincem (B a D), stejně tak je tomu u mozečku. Ve všech vrstvách mozkové kůry byla prokázána reaktivní astroglióza - reparační reakce astrocytů (C). (Kolichesky et al. 2016)



Obrázek 6: Mikroskopická analýza mozkové kůry (Kolichesky et al. 2016)

3.3.2 Mutace genu *CLN2* u člověka

Onemocnění typu *CLN2* se nejčastěji vyskytuje se záchvaty a s ataxií s pozdním infantilním obdobím (věk 2–4 let), často v kombinaci se spožděním vývoje řeči následováno progresivní dětskou demencí, motorickým a zrakovým zhoršením a předčasnou smrtí. Atypicky se objevují fenotypy s pozdějším nástupem nemoci a v některých případech delší délkou života. (Fietz et al. 2016)

Protein TPP1

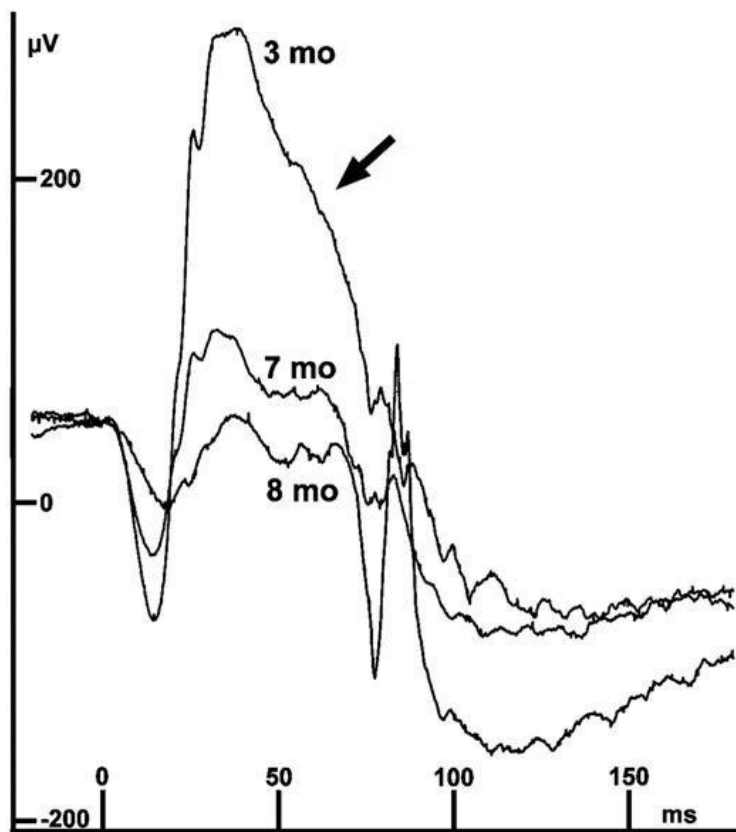
Tripeptidyl-peptidáza 1 patří mezi lyzozomální proteázy, enzymy štěpící proteiny, s převahující exoproteolytickou aktivitou (odděluje aminokyseliny od terminálního konce proteinu). U *CLN2* pacientů je inaktivní, u *CLN5* případů byla naopak pozorována jeho zvýšená aktivita u fibroblastů, což by mohlo indikovat funkční propojení mezi těmito dvěma proteiny. (Getty a Pearce 2010)

Na základě skutečnosti, že je tento protein rozpustný, a díky tomu může být exogenně transportován deficientním buňkám, se provádějí studie o potenciální účinnosti genových a kmenových buněčných terapií pro léčbu této poruchy. (Katz et al. 2008)

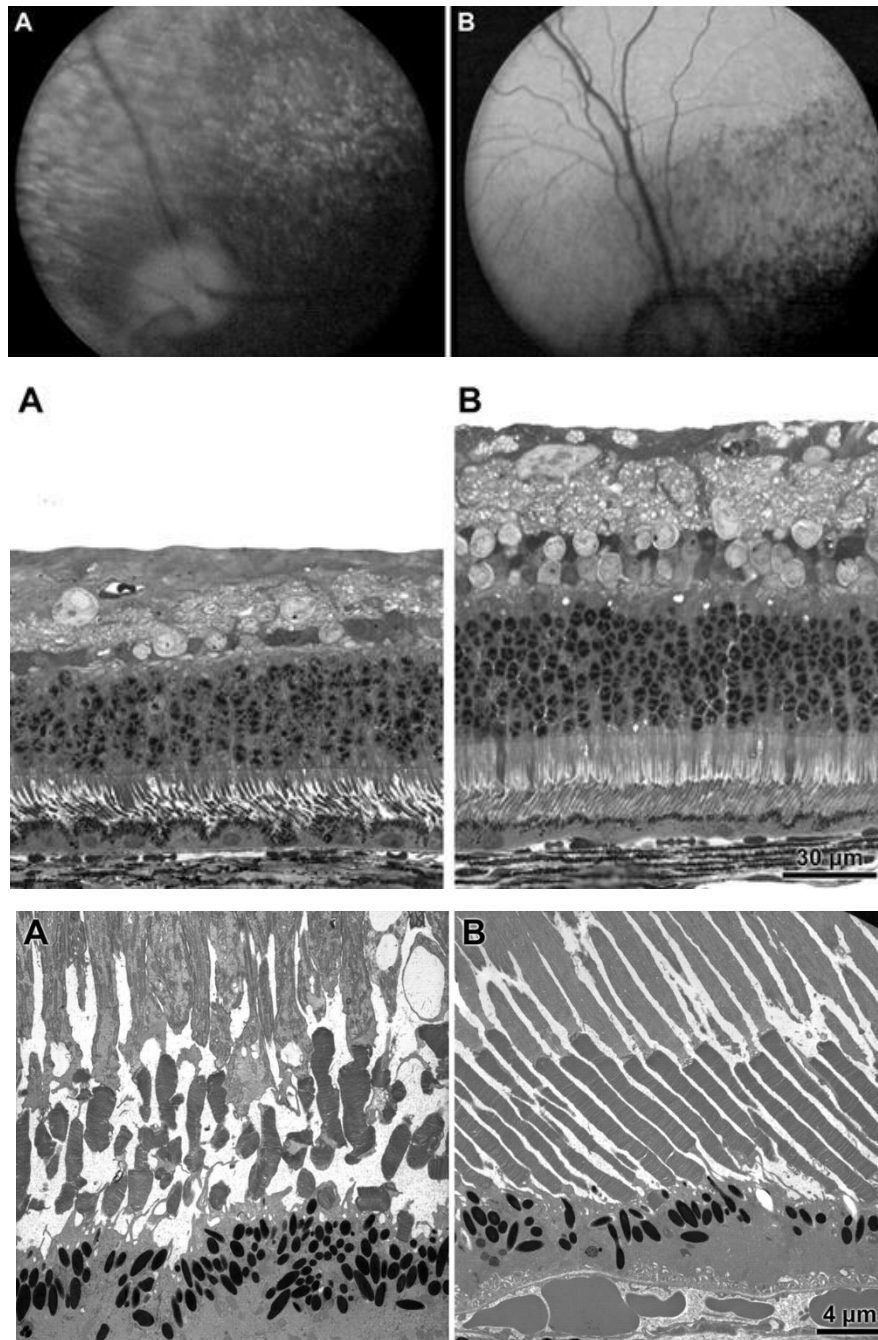
Mutace genu *CLN2* u dlouhosrstého jezevčíka

Následující práce Katz et al. (2008) obsahuje rozsáhlý výzkum o deterioraci sítnice vlivem nemoci způsobené mutací genu *CLN2*. Zkoumal se vrh 4 štěňat jezevčíků, jedna homozygotně zdravá fena, dva heterozygotní psi a jeden homozygotně nemocný pes, a to po dobu 10 měsíců. Následně byli oba homozygoti a jeden heterozygot utraceni, aby jejich sítnice mohly být studovány z morfologického hlediska.

Nemocný pes vykazoval ve věku 3 měsíců normální výsledky zrakových vyšetření, ovšem v 7 měsících bylo na výsledcích elektroretinografu (ERG) jasně vidět zhoršení, konkrétně došlo k výraznému propadu hlavní vlny b, který se i nadále prohluboval. U psa vymizel rohovkový reflex, pupilární reflex, v 8 měsících byl funkčně slepý. V 10 měsících byla v obou očích pozorovatelná klidová mydriáza (rozšíření zornic).



Obrázek 7: Výsledky ERG, šipka vyznačuje vlnu b, zkratka mo vyjadřuje věk v měsících (Katz et al. 2008)



Obrázek 8: Mikroskopická analýza sítnice (nahore celá sítnice, níže buněčné vrstvy). A vyznačuje viditelnou deterioraci, B označuje snímky z prvních vyšetření. (Katz et al. 2008)

3.3.3 Mutace genu *CLN3* u člověka

Deficit v genu *CLN3* má za následek chorobu zvanou jako Battenova nemoc, která je u lidí v rámci všech NCL nejčastější formou onemocnění. Obvykle začíná v dětství (JNCL) a prvním příznakem bývá progresivní ztráta zraku u dříve zdravého dítěte následována změnami osobnosti, problémy s chováním a pomalým učením. Záchvaty se většinou objevují do 2-4 let od ztráty zraku, mohou se však objevit kdykoli v průběhu nemoci. Postupná ztráta motorických funkcí se začne projevat nemotorností, klopýtáním a symptomy podobným Parkinsonově chorobě. Postižený jsou obvykle odkázáni na invalidní vozík, či připoutaní na lůžku a umírají předčasně. (Mirza et al. 2019)

V žádném plemeni psa nebyla mutace tohoto genu dosud evidována.

Protein CLN3

CLN3 kóduje transmembránový protein (též Batten, Battenin) s 438 aminokyselinami, který se skládá ze 6 segmentů přesahujících membránu. Tento protein může hrát důležitou roli při zrání a fúzi autofagozomů, endolysozomálních kompartmentů a případně axonálních váčků. Také ovlivňuje stav a motilitu pozdních endozomů/lysozomů a spolu s dalšími komplexy se účastní endocytické kaskády. (Kollmann et al. 2013)

3.3.4 Mutace genu *CLN4* u člověka

CLN4 byl původně používán k popisu všech adultních forem nemoci NCL: autozomálně dominantní forma, Parryho choroba, nebo recesivně dědičná Kufsova choroba. Ovšem u Kufsovy choroby s projevy progresivní myoklonální epilepsie (typ A) byly zjištěny především mutace v genu *CLN6*, zatímco u Kufsovy choroby s demencí a motorickými poruchami (typ B) byly popsány mutace v genu *CTSF* (popsáno v kapitole *CLN13*). Parryho choroba je identifikována dvěma mutacemi způsobujícími defekt v genu *DNAJC5*, a právě u této formy se používá genový symbol *CLN4*. (Kollmann et al. 2013)

V žádném plemeni psa nebyla mutace tohoto genu dosud evidována.

Protein CSP α

Gen *DNAJC5* kóduje cysteinový řetězec proteinu α (CSP α), chaperon, který zajišťuje skládání proteinů a byl nalezen na synaptických váčcích v neuronech a na sekrečních granulích v různých endokrinních, neurokrinních a exokrinních buňkách. K mutacím v genu dochází ve vysoce konzervované oblasti řetězce cysteinu, která je zodpovědná za vazbu/zacílení na membránu a oligomerizaci. (Cárcel-Trullols et al. 2015)

3.3.5 Mutace genu *CLN5* u člověka

Původně bylo *CLN5* známo jako vzácná forma NCL omezená na finskou či jinou severoevropskou populaci (též známá jako tzv. Finská varianta). Podle novějších studií jsou ale mutace v tomto genu mnohem častější, než bylo dříve pozorováno. Práce Xin et al. (2010), kde pozorovali skupinu 10 nemocných pacientů, poukazuje na variabilitu věku nástupu nemoci (4-17 let). Nejčastěji (70%) se nemoc projevila jako LINCL, průměrný věk nástupu byl 5,6 let. Dva pacienti nejevili známky záchvatů, ztráta zraku byla prvním rozpoznávaným symptomem u 2 pacientů. Ostatní příznaky typické pro NCL byly zaznamenány do 1-8 let po prvním klinickém projevu.

Protein CLN5

Funkce proteinu není v současné době dosud známá. Předpokládá se, že se jedná o rozpustný lyzozomální protein, u něž byla dokázána interakce s dalšími NCL proteiny, CLN2 a CLN3. (Vesa et al. 2002)

Mutace genu *CLN5* u border kolie

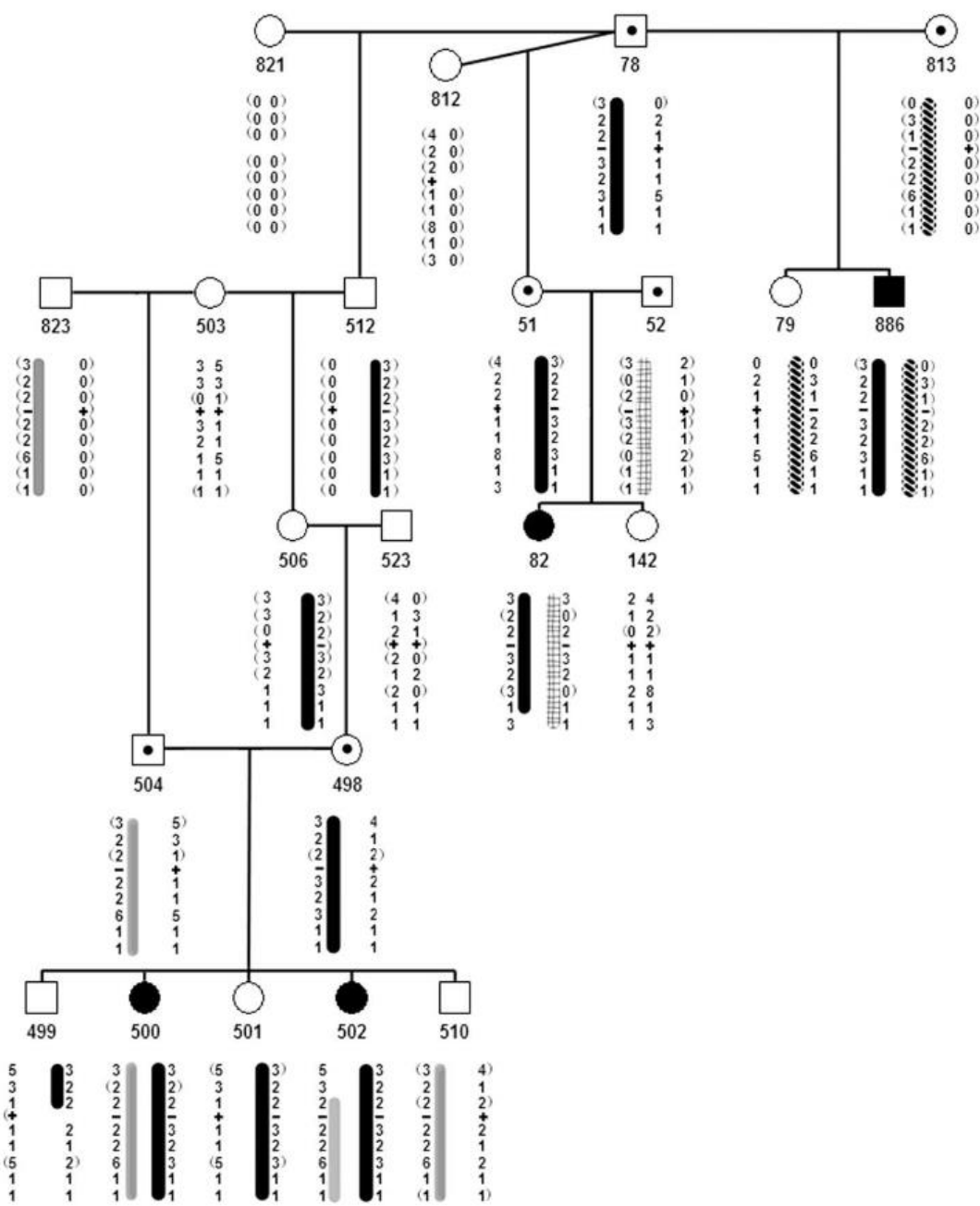
U plemene border kolie se nemoc projevuje později, mezi 16-21 měsíci věku a stejně jako bylo již zmíněno u případu *CLN1*, byla nemoc doprovázena změnou chování (hyperaktivita, bázlivost, agrese, cyklické chování, ztráta paměti), postupnou ztrátou koordinace těla a epileptickými záchvaty. Později se u nich rozvinulo zrakové postižení, ne vždy následováno slepotou (Tabulka 3). V práci Studdert a Mitten (1991) se předpokládá, že si většina psů zachovala určité zbytky zraku až do konce. Eutanázie následovala mezi 18.-28. měsícem věku.

Tabulka 3: Rozvoj symptomů u plemene border kolie (Studdert a Mitten 1991)

Klinické příznaky	věk (měsíc)	
	rozsah	průměr
Změny chování	16-23	19,5
Motorické abnormality	16-24	20,8
Ztráta zraku	17-24	21,2

V další práci Melville et al. z roku 2005 zkoumali vzorky 96 zástupců plemene border kolie, z nichž 24 bylo nemocných NCL a 27 jedinců bylo heterozygotních. Další zástupci byli přidáni pro kontrolní účely výzkumu. Cílem bylo lokalizovat pomocí srovnávací genomiky a genetické metody vazbové analýzy gen *CLN5* a vyvinout jednoduchý test pro zjištění mutace v exonu 4, který by umožnil screening populace border kolí jakožto preventivní opatření proti šíření mutovaného genu v populaci.

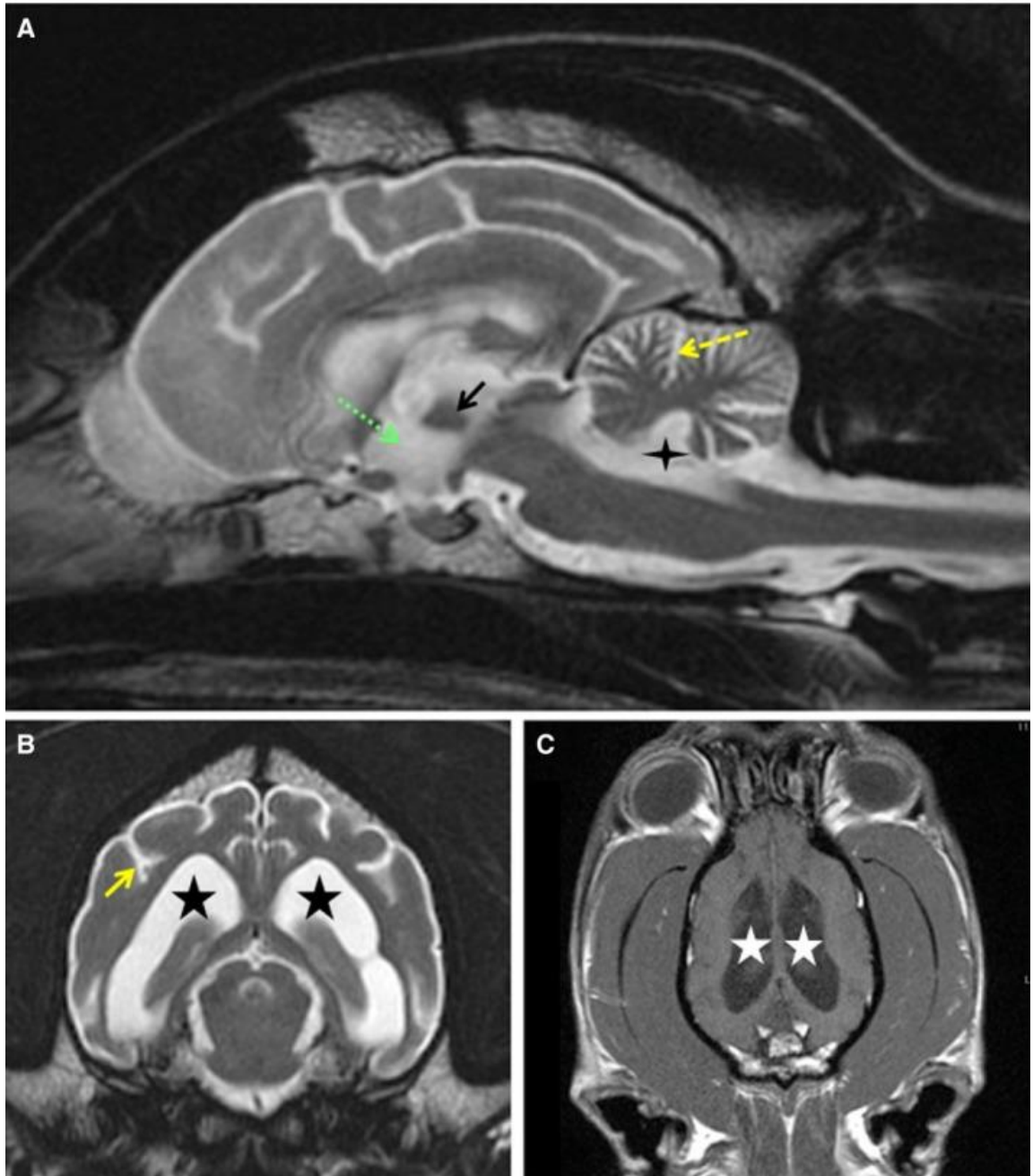
Melville et al. (2005) ve své studii také zveřejnili rodokmen, který zobrazuje rozšíření mutace na *CLN5* u border kolií na základě shromážděných dat. Černě vyplněné obrazce jsou jedinci nemocní NCL, známí přenašeči jsou vyznačeni tečkou v symbolu. Pod symboly jsou také vyznačené a zmapované jednotlivé haplotypy, které byly zděděny od rodičů.



Obrázek 9: Rodokmen border kolií s vyznačenými nositeli mutace v genu *CLN5* (Melville et al. 2005)

Mutace genu *CLN5* u australského honáckého psa

O stejném typu mutace, totiž substituci C za T, se zmiňuje ve své práci Kolicheski et al. (2016), věnované případu mladého australského honáckého psa, který vykazoval příznaky typické pro NCL.



Obrázek 10: MRI australského honáckého psa s mutací v genu *CLN5* (Kolicheski et al. 2016)

Snímky mozku z magnetické rezonance (MRI), rovina sagitální (A), rovina transverzální (B), T1-vážený obraz po dodání kontrastních látek v dorzální oblasti (C). Mozkomíšní mok (CSF) je bílý a mozkový parenchym šedý v T2-vážených obrazech (A a B). Černá šipka (A) vyznačuje postupující atrofii v oblasti talamu, dilatace mozkových komor (snímek A: 3. mozková komora = zelená šipka, 4. mozková komora = čtyřcípá hvězda; snímek B a C: postranní

mozkové komory = pěticípé hvězdy), žlutá šipka (B) upozorňuje na rozšiřování mozkových rýh a žlutá šipka (A) na zvýšený CSF obklopující mozeček.

Mutace genu *CLN5* u zlatého retrívra

Ve své práci Gilliam et al. (2015) zjistili z DNA nemocného psa, že mutace c.934_935delAG v genu *CLN5* způsobuje posun celého rámce, který je následkem vzniku předčasného stop kodónu. Takto vzniká jiná varianta proteinu, která následkem přerušené translace postrádá 39 C-koncových aminokyselin, čímž přichází o svoji funkčnost.

3.3.6 Mutace genu *CLN6* u člověka

Pacienti s LINCL způsobenou mutacemi v genu *CLN6* byli hlášeni v České republice, Chorvatsku, Portugalsku, ve střední a jižní Americe, vzácně také v severní Evropě. Obvykle se u nemocí postižených jedinců objevují poruchy zraku v dětství postupující ke slepotě. Očekávaná délka života se často pohybuje kolem věku 20-25 let. Sato et al. (2016) ve své práci uvádí první případ mutace *CLN6* v Japonsku.

Protein *CLN6*

Funkce proteinu *CLN6* není dosud známa, a proto zatím není zcela jasné, jaké následky mají defekty v tomto ER proteinu na lyzozomální funkci. Zatím se ví, že syntéza, třídění a funkce enzymů byly srovnatelné s těmi v nemutovaných buňkách, defekt se ale projevoval v degradaci exogenního proteinu arylsulfatázy A, konkrétně v jeho endocytóze. (Heine et al., 2004).

Mutace genu *CLN6* u australského ovčáka

Ve věku 18 měsíců začala fena australského ovčáka vykazovat zhoršení zrakových funkcí, v 19 měsících o zrak přišla úplně. Současně začala vykazovat známky úzkosti, zacykleného chování a ztráty koordinace, které se postupně zhoršovaly. Úzkost se stupňovala při hlasitých zvucích a fena přestala chtít chodit ven. Zároveň ztratila schopnost reagovat na hlasy svých majitelů, nakonec pro ni bylo i obtížné najít vodu a jídlo. Fena byla uspána ve věku 24 měsíců. (Katz et al. 2011)

3.3.7 Mutace genu *CLN7* u člověka

Začátek průběhu nemoci povahy LNCL se uvádí mezi 2-11 lety (průměrný nástup v 5 letech), následně dochází k progresivní ztrátě kognitivních a pohybových dovedností, s progresivní mikrocefálií a rozvojem záchvatů a různých neurologických příznaků včetně ataxie. (Craiu et al. 2015)

Protein MFSD8

Se svým názvem MFSD8 (=Major facilitator superfamily domain-containing protein 8) se protein řadí do rodiny MFS membránových proteinů. MFS je velmi rozsáhlá rodina proteinů, která je přítomná ve všech třídách živých organismů. Jsou to jednoduché polypeptidy, které jsou schopny transportu malých molekul přes membránu na základě chemiosmotického gradientu, který je přímo spjat s buněčným dýcháním. (Morelli et al. 2019)

MFSD8 patří mezi polytopické (transmembránové) proteiny s 12 membránovými doménami a měl by se nacházet v lysozomální membráně. Zatím se neví, jaký materiál konkrétně protein přes membránu transportuje. (Siintola et al. 2007)

Mutace genu *CLN7* u čivavy

U plemene čivavy byla identifikována homozygotní delece jednoho páru bází a posun rámce v MFSD8, což má za následek předčasný stop kodón. Předpokládá se, že posun nastává v rámci 7. transmembránové domény, čímž ztrácí svoji funkčnost. Guo et al. (2015)

Ve studii (Ashwini et al. 2016) byly zkoumány čtyři čivavy, které vykazovaly podobné progresivní neurologické příznaky. Dvě z nich byli nepříbuzní, dlouhosrstí psi z Japonska, pak dvě krátkosrsté čivavy, z Itálie a z Anglie, u kterých byla progresse velmi podobné té psům z Japonska. Co je zajímavé, mezi postiženými čivavami nebyly nalezené žádné příbuzenské vztahy.

Rozsáhlé rozšíření nemoci a skutečnost, že se vyskytuje jak u dlouhosrstých, tak i krátkosrstých plemen, svědčí o tom, že kauzální alela může být mezi čivavami relativně běžná, ale bylo by zapotřebí rozsáhlého screeningu nepříbuzných čivav k potvrzení této hypotézy.

Tabulka 4: Porovnání výskytu symptomu u člověka, myši domácí a plemene čivavy (Faller et al. 2016)

Neuropatologické jevy	<i>Homo sapiens</i>	<i>Mus musculus</i>	<i>Canis familiaris</i>
Retinální degenerace	Ano	Ano	Ano
Akumulace ceroidního lipopigmentu	Ano	Ano	Ano
Akumulace PCMAS	Ano	Ano	Neprokázáno
Reaktivní astroglóza	Ano	Mírně	Ano
Generalizované epileptické záchvaty	Ano	Ne	Ne
Myoklonus/ataxie	Ano	Ano	Ano
Atrofie CNS	Ano	Ne	Ano
Předčasná smrt	Ano (11,5 let)	Ne	Ano (eutanázie v 1,5-2 letech)

Mutace genu CLN7 u čínského chocholátého psa

Stejná mutace genu MFSD8 byla nalezena i u plemena čínského chocholátého psa. Je pravděpodobné, že mutace vznikla u jednoho z těchto plemen a byla do druhého plemena přenesena úmyslným, či náhodným křížením. Přestože byl dosud identifikován jen jediný zástupce plemene nemocný NCL, v návaznosti na předešlé plemeno čivavy by se neměl výskyt mutace u toho plemene opomíjet. (Ashwini et al. 2016)

3.3.8 Mutace genu CLN8 u člověka

U člověka je gen CLN8 mutován do dvou různých klinických fenotypů: 1) progresivní epilepsie s mentální retardací (EPMR) s juvenilním nástupem a 2) LINCL. Identifikovalo se nejméně 24 různých mutací, typu delece a missense, které stojí právě za nemocí NCL.

Protein CLN8

CLN8 je všudepřítomně exprimovaný ER membránový protein neznámé funkce, pravděpodobně se podílí na vezikulárním transportu. CLN8 interagoval dle práce Di Ronza et al. (2018) se dvěma třetinami lysozomálních enzymů, jeho nedostatek vede k vyčerpání rozpustných enzymů v lysozomu, čímž se narušuje biogeneze lysozomu. Mutace by měla způsobovat neschopnost vazby proteinu na lysozomální enzymy.

Mutace genu CLN8 u saluki

V práci Lingaase et al. (2018) byla zkoumána fena, která ve věku 22 měsíců vykazovala progresivní změny v chování a na žádost majitele byla usmrcena. První klinické příznaky se objevily kolem 10-12 měsíců, fena začala být neklidná a úzkostlivá. Následující měsíce se přidalo poškození zraku a sluchu, celková dezorientace a bázlivost feny. V 20. měsíci měla velké obtíže vidět za šera a začaly se také objevovat pravidelné epizody epileptických záchvatů, které rozhodly o eutanázii feny.

Mutace genu *CLN8* u anglického setra

Zpočátku se u plemene NCL neprojevuje, stejně jako u jiných LINCL případů. Mezi 1-2 lety však ve své práci Katz et al. (2005) pozoruje typické symptomy pro NCL – záchvaty, progresivní pokles motorických i kognitivních funkcí a poškození zraku. Takto postižený pes plemene anglický setr umírá přibližně ve věku 2 let, a to následkem nezvratitelných záchvatů.

Mutace genu *CLN8* u alpského jezevčíkovitého brakýře

Ve své práci Hirz et al. (2017) pozoruje případ dvou polosourozenců nemocných NCL. Zveřejňuje vyšetření z magnetické rezonance, histologie, elektroretinografie, fluorescenční a transmisní elektronové mikroskopie, které jsou odrazem typických symptomů pro NCL.

Mutace genu *CLN8* u australského ovčáka a křížence

Kříženec australského ovčáka a australského honáckého psa začal vykazovat známky NCL ve věku 8 měsíců. Eutanázie proběhla v 21. měsíci. Guo et al. (2014) zjistili, že mutací v genu je tranzice c.585G>A, stejně jako je tomu u australského ovčáka v případě NCL8. Ve stejné práci také identifikovali heterozygotnost 4 australských ovčáků z celkových 1481 vzorků.

3.3.9 Mutace genu *CLN9* u člověka

Schulz et al. (2004) ve své práci popisují případ 2 srbských sester a 2 německých bratrů, kteří vykazují známky JNCL. Uvádějí, že buňky s nedostatečnou expresí genu *CLN9* vynikají svým fenotypem – buněčná těla jsou zaoblená, jádra jsou výrazná, špatně se kultivují, přičemž jejich růst je zvýšený. Byla pozorována změna v expresi genů zapojených do apoptózy a buněčné adhezi. Rovněž byl v buňkách narušen metabolismus sfingolipidů, vycházející ze snížené hladiny ceramidu a zvýšené aktivity palmitoyltransferázy.

V žádném plemeni psa nebyla mutace tohoto genu evidována.

3.3.10 Mutace genu *CLN10* u člověka

Onemocnění způsobené mutací v genu *CLN10* se začne projevovat v raném školním věku. Steinfeld et al. (2006) uvádí, že u pozorované pacientky byla v počátcích sledována ataxie a poruchy zraku, MRI odhalilo atrofii koncového mozku i mozečku. Později došlo i k atrofii sítnice, poklesu kognitivních schopností, ke ztrátě řeči a motorických funkcí. Ve věku 17 let pacientka musela zůstat uvázaná v invalidním vozíku.

Protein CTSD

Katepsin D, translatován genem *CTSD*, je exprimován téměř ve všech buňkách v ER, odkud je transportován do endozomů a lyzozomů, kde slouží jako hlavní proteáza v intracelulárním rozkladu bílkovin. Funkčně je spojen s řadou mechanismů podílejících se s jeho zvýšenou expresí na progresi rakoviny, včetně proliferace, invaze, metastázování a angiogeneze. (Radisky 2010) Zároveň bylo zjištěno, že vedle enzymatické aktivity katepsin také ovlivňuje buněčnou signalizaci a ztráta jeho funkce vede k apoptóze buňky. (Benes et al. 2008)

Mutace genu *CLN10* u amerického buldoka

U amerických buldoků se NCL projevuje v rané dospělosti. Postižení psi obvykle vykazují hypermetrii a ataxii před dosažením věku 2 let. Zhoršení psychomotorických schopností postupuje pomaleji, pes umírá většinou do věku 7 let. Evans et al. (2005) dokonce uvádí po sledování průběhu nemoci u 9 psů průměrný věk eutanázie 4,9 let (3,5-5,5 let).

Stejně jako u jiných případů NCL, i u tohoto plemene se vyskytuje nahromaděný autofluorescenční materiál uvnitř v neuronech a v sítnicových gangliových buňkách. Navíc při svém zkoumání Awano et al. (2006) našli tyto inkluze i ve fotoreceptorových buňkách, čímž vyvstává hypotéza, že katepsin D je nezbytnou proteázou právě ve fotoreceptorech.

3.3.11 Mutace genu *CLN11* u člověka

Progranulin (PGRN) je glykoprotein kódovaný u lidí genem *GRN*. Přesná funkce sice dosud nebyla zjištěna, ale ví se, že je zapojen do četných fyziologických a patologických procesů, včetně regulace zánětů, hojení ran a tumorigeneze. Zároveň působí jako neurotrofický faktor.

Mutace v tomto genu je spojena se dvěma neurodegenerativními nemocemi. Heterozygotní mutace, nedostatečné množství PGRN, způsobuje degeneraci frontotemporálního laloku (FTLD), která vede k časnému nástupu demence. Homozygotní mutace má za následek úplnou ztrátu PGRN a je příčinou NCL. Ačkoliv se jedná o jiné nemoci, fenotypy obou mutací se překrývají, což naznačuje společný mechanismus obou chorob. (Zhou et al. 2019)

V žádném plemeni psa nebyla mutace tohoto genu evidována.

3.3.12 Mutace genu *CLN12* u člověka

ATP13A2 (ATPase cation transporting 13A2) je endolysozomální transportér kationtů kovů (Mn, Zn), který je geneticky zapojen do spektra neurodegenerativních poruch, včetně Kufor-Rakebova syndromu (KRS) – parkinsonismus s demencí – a Parkinsonovou chorobou s časným nástupem (van Veen et al. 2020). ATP13A2 se účastní mitochondriální bioenergetiky a autofagolysosomálních cest, zároveň podporuje buněčnou endocytózu polyaminů. Při vysokých koncentracích polyaminu indukují buněčnou toxicitu, která se zhoršuje ztrátou proteinu v důsledku lysosomální dysfunkce. (Park et al. 2015)

Mutace genu *CLN12* u tibetského teriéra

Mutace v tomto genu způsobuje u plemene delecí jedné báze, která má za následek předčasný stop kodón a NCL u tibetského teriéra. V případě lidského genu mutace způsobuje KRS. Tato zjištění tedy naznačují, že KRS u lidí a NCL u tibetských teriérů je jedna a tatáž nemoc. U obou dochází k atrofii mozku, změnám chování a ztrátě kognitivních funkcí, jiné klinické příznaky se však liší - u psa se rozvíjí cerebrální ataxie, která u pacientů KRS nebyla hlášena, a naopak KRS vykazuje symptomy parkinsonismu a pyramidální dysfunkce, která nebyla u psů pozorována. (Farias et al. 2011)

3.3.13 Mutace genu *CLN13* u člověka

Kufsova choroba, NCL u dospělých jedinců, je nemoc náročná na diagnostiku. Mutace v genu *CLN6* je známou příčinou Kufsovy choroby typu A, typickou progresivní myoklonusovou epilepsií, zatímco molekulární příčina typu B, projevující se demencí a motorickou deteriorací, zůstala dlouho neodhalená. Smith et al. (2013) zjistili, že za druhým typem tohoto onemocnění stojí právě mutace v genu *CLN13* způsobující defekt v proteinu katepsinu F.

V žádném plemeni psa nebyla mutace tohoto genu evidována.

Protein CTSF

Cysteinový katepsin F (CTSF) hraje důležitou roli při zpracování MHC glykoproteinů II. třídy (MHCII) bílých krvinek, což má za následek potlačení imunitní odpovědi, neboť tyto glykoproteiny mají za úkol aktivovat T-lymfocyty, které právě slouží jako imunitní odpověď proti antigenu. CTSF je se svými 251 aminokyselinami nejdelším lidským katepsinem. (Turk et al. 2012, Somoza et al. 2002)

3.3.14 Mutace genu *CLN14* u člověka

Mutace v genu *CLN14* způsobuje u lidí progresivní myoklonickou epilepsii (PME), heterogenní skupinu převážně autozomálně recesivně zděděných generalizovaných epilepsií, které jsou charakteristické myoklonem, tonicko-klonickými záchvaty, neurodegenerací a psychomotorickým poklesem, cerebelární ataxií a časnou smrtí (Kousi et al. 2012). Existuje několik typů tohoto onemocnění, např.: Unverricht-Lundborgova choroba, Laforova choroba, nebo právě NCL. (Horák 2016)

V žádném plemeni psa nebyla mutace tohoto genu evidována.

Protein KCTD7

Protein KCTD7 (Potassium channel tetramerisation domain containing 7) svoji funkcí ovlivňuje draselné kanály buněk, iontové kanály, které jsou u neuronů klíčové k regulaci polarizace buňky (Azizieh et al. 2011). Zároveň se zjistilo, že KCTD7 odpovídá za rozvoj vaskulatury v konkrétních regionech sítnice. Alevy et al. (2019) ve své studii píše, že ztráta proteinu způsobila zvýšení větvení cév a že vznik hluboké vaskulární vrstvy byl opožděn. Funkce proteinu je tedy neurovaskulární – jeho nízká exprese byla doprovázena zvýšeným počtem bipolárních buněk v prvním postnatálním týdnu, což mělo za následek pokles funkce sítnice.

3.3.15 Jiné mutované geny u člověka související s NCL

CLCN6 a SGSH

Podle databáze schraňující data o NCL u lidí (UCL) byly nalezeny ještě další dva mutované geny u pacientů s NCL. Mutace v genu *CLCN6* byla identifikována u dvou pacientů NCL s pozdním nástupem, dvě mutace v genu *SGSH* u pacienta s ANCL. Defekt v genu *SGSH* obvykle způsobuje nemoc známou jako mukopolysacharidóza III. Typu (Sanfilipův syndrom), která má velmi podobný klinický průběh jako NCL. (Meyer et al. 2008)

ARSG

V práci Abitbol et al. (2010) došly ke zjištění mutace c.296G>A v genu arylsulfatázy G (ARSG), která byla v této studii přímo spojena s NCL u plemene amerického stafordširského teriéra. ARSG totiž patří mezi enzymy obsažené v lysozomech a mutace v tomto genu se projevila až 75% snížením jeho aktivity v buňkách postižených psů.

3.3.16 Další plemena s nálezem NCL

Tabulka 5: Plemena s nepotvrzenou kauzální mutací NCL genu

PLEMENO	NÁSTUP (měsíce)	EUTANÁZIE (měsíce)	ZDROJ
Polský nížinný pes	6 36-48	3-8 let	Narfström et al. (2007)
Dalmatin	6	7-8 let	Goebel a Dahme (1986)
Knírač malý	48?	N	Jolly et al. (1997)
Kokršpaněl	18	N	Wilkie a Hudson (1982)
Labradorský retrívr	N	8 let	Rossmeisl et al. (2003)

3.4 Léčba a terapie

U většiny psích NCL se jedná o velmi vzácné poruchy, a proto může být velmi obtížné je odlišit od ostatních progresivních neurologických onemocnění. To z NCL činí skupinu poruch náročnou k diagnóze pro lékaře, neboť je pravděpodobné, že většina postižených psů je utracena kvůli progresi nemoci, aniž by byla diagnóza stanovena. Pokud byla u plemene identifikována kauzální mutace, může to diagnostiku značně ulehčit, nicméně absence mutace v již známých alelách nevylučuje nemoc jako takovou. Z minulé kapitoly je vidno, že i u jednoho plemene existuje více kauzálních mutací, zároveň může dojít k situaci, že pes trpí jinou formou NCL, u které dosud nebyla mutace v kauzálním genu identifikována. (Katz et al. 2017)

I tak jsou psi s různými formami NCL potenciálně vynikajícími modely pro výzkum možných terapií, které mohou být následně použity na lidské pacienty.

Například studie na miniaturních jezevčících s mutací v TPP1, kteří se chovají a udržují na University of Missouri od roku 2006, pozorovala pozitivní výsledky enzymové substituční terapie. Infúze rekombinantního lidského proteinu TPP1 do mozkomíšního moku vedla k dramatickému zpoždění nástupu nemoci a její progresi, došlo k zachování kognitivních funkcí a významné prodloužení délky života (Katz et al. 2014).

Lu et al. (2015) ve své studii zase podávali lidský rekombinantní PPT1 do mozkomíšního moku lumbální injekcí, ve třech po sobě následujících dnech, myším ve věku šesti týdnů s deficitem PPT1. Tato terapie prodloužila jejich přežití o sedm týdnů bez zjevné nepřiměřené toxicity.

Další formy NCL, které jsou způsobeny nedostatečnou enzymatickou aktivitou, budou pravděpodobně také odpovídat pozitivně na podobné terapeutické postupy, které byly vyvinuty pro geny *CLN1* a *CLN2*. Bohužel, NCL způsobené defekty v membránových proteinech budou vyžadovat mnohem více výzkumu, aby mohla být navržena účinná terapie. (Hawkins-Salsbury et al. 2013) Momentálně se vedle terapie nahrazením enzymů léčba zaměřuje především na genovou terapii nebo terapii kmenovými buňkami.

V dubnu 2017 byla FDA (Ústav pro kontrolu potravin a léčiv) schválena první a v současné době jediná terapie pro NCL typu 2 pomocí rekombinantní lidské TPP1 – cerliponázy alfa. (Lewis et al. 2020)

Milasen

Zásadního milníku ve výzkumu se také povedlo dosáhnout týmu Kim et al. (2019), kdy vytvořili pod záštitou Boston Children's Hospital lék Milasen - antisense oligonukleotid speciálně navržený pro 6 letou dívku trpící mutací v genu *CLN7*. Antisense oligonukleotidy jsou navrženy tak, aby zakryly mutovaný úsek mRNA, a znemožnili tak translaci daného mutovaného genu. Díky tomu se nevytvoří patologická bílkovina, která by v tělních buňkách spustila nechtěný řetězec patofyziologických reakcí. Pomocí genové terapie byla do pacienta vpraveny molekuly DNA obsahující správně fungující alelu tohoto genu.

Milasen byl dívce zprvu podáván injekčně každé 2 týdny, přičemž dávka byla postupně zvyšována z 3,5 mg na 42 mg. Po uplynutí 4 měsíců Milasen dostávala každé 3 měsíce. Za tu dobu bylo možné pozorovat zlepšení symptomů typických pro nemoc, především se o 63 % snížil počet záchvatů (z 31,5 na 11,7), kterými dívka trpěla denně i několik minut, doba trvání klesla o 52 % (ze 108 s, na 52 s).

Bohužel, protože je tento lék vyvinut podle mutované alely od konkrétního pacienta, nedá se použít k léčbě a terapii jiných pacientů NCL.

3.5 Genetické testování

3.5.1 Molekulární markery

Molekulární marker je v genetice důležitým vodítkem pro sledování určitého znaku v rámci taxonomických a populačně genetických studií. Dá se jimi hodnotit biodiverzita, konstruovat genové mapy a používají se pro markerovou selekci u šlechtění jak zvířat, tak i rostlin, a k diagnostice autosomálních recesivních genetických poruch. Molekulárním markerem může být například opakující se pořadí nukleotidů v DNA (mikrosatelity), izoenzymy (stejná funkce, ale jiné geny), alloenzymy (alternativní varianty enzymu ze stejné alely), restrikční fragmenty založené na polymorfismu DNA – RFLP (polymorfismus délky restrikčních fragmentů) nebo i jednonukleotidový polymorfismus (SNP). (Schlötterer 2004)

Podle Tanskley (1983) jsou DNA markery charakterizovány následovně:

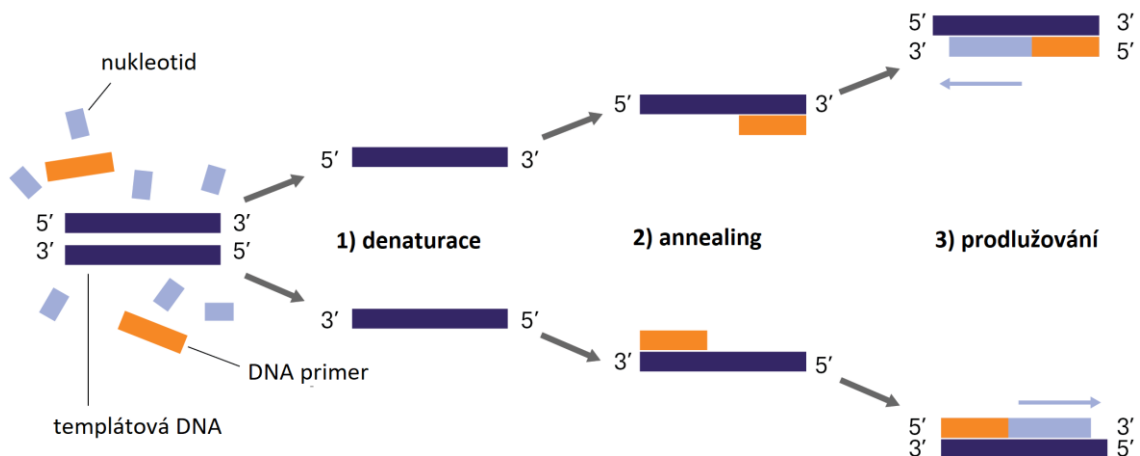
- jejich exprese není závislá na podmínkách prostředí
- lze je aplikovat i při minimálním množství biologického materiálu
- vhodná elektroforetická a detekční technika

3.5.2 PCR

Hlavní průlom molekulárních markerů byl podnícen vynálezem polymerázové řetězové reakce (PCR). Poprvé mohl být jakýkoliv genomický region amplifikován a analyzován, aniž by bylo zapotřebí izolace velkého množství čisté genomické DNA. PCR je jednoduchá technika sloužící k exponenciálnímu naklonování úseku DNA, v několika hodinách je možné vytvořit až miliardy kopií (Obrázek 11). (Mullis 1990)

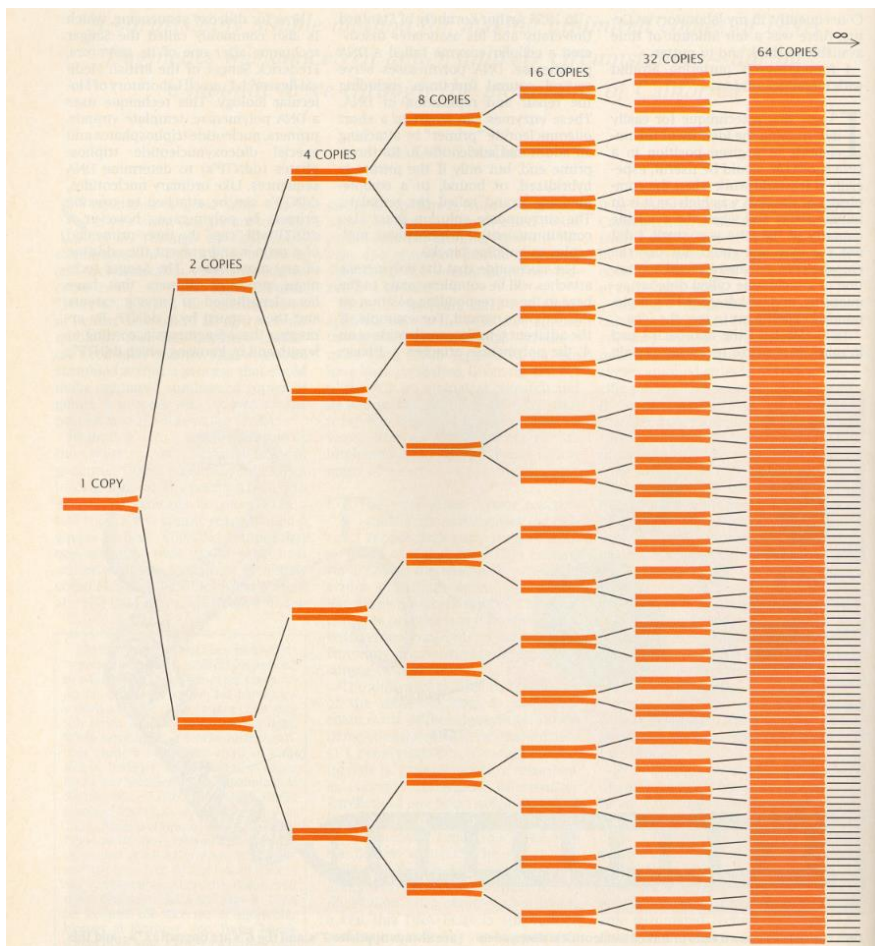
PCR probíhá v následujících krocích (Obrázek 10):

- 1) Denaturace templátové DNA. S vysokou teplotou (94-95 °C) se rozštěpí vodíkové můstky mezi nukleotidy. Díky tomu vzniknou jednořetězcové molekuly DNA, na které mohou následně nasednout DNA polymerázy.
- 2) Annealing. Vytvořený primer, krátký fragment jednořetězcové DNA, komplementární k části templátové DNA, umožní vytvoření krátkého dvouřetězcového úseku. K tomuto kroku je potřeba „annelační teplota“.
- 3) Prodlužování. Polymerázy zahájí svoji enzymatickou reakci a dokončí za zvýšené teploty (obvykle 72 °C) replikaci DNA. Z jedné templátové DNA vznikají dvě kopie. (Kaunitz 2015)



Obrázek 11: Průběh PCR

(převzato z <https://blog.labtag.com/a-brief-history-of-pcr-and-its-derivatives/>)



Obrázek 12: Princip exponenciálního klonování DNA u PCR (Mullis 1990)

3 Materiál a metody

4.1 Hodnocení psi

K experimentální části bakalářské práce bylo odebráno 20 vzorků k izolaci DNA a k následné analýze. Tučně vyznačení jedinci byli vybráni na základě informací z databáze KCHBO, vzorek č. 1 nese heterozygotní mutaci, u vzorku č. 20 se heterozygota předpokládá. Vybraní jedinci mají stejného předka.

Tabulka 6: Přehled odebraných vzorků se základní charakteristikou psů

Č.	Barva	Rok narození	Pohlaví
1	Blue-merle s bílými znaky a hnědým pálením	2010	pes
2	Červená s bílými znaky	2012	pes
3	Černá s bílými znaky	2017	pes
4	Blue-merle s bílými znaky a hnědým pálením	2019	pes
5	Černá s bílými znaky a hnědým pálením	2018	fena
6	Červená s bílými znaky a hnědým pálením	2017	pes
7	Černá s bílými znaky a hnědým pálením	2018	fena
8	Černá s bílými znaky a hnědým pálením	2017	fena
9	Červená s bílými znaky a hnědým pálením	2018	fena
10	Červená s bílými znaky a hnědým pálením	2018	pes
11	Červený-merle s bílými znaky a hnědým pálením	2019	fena
12	Červený-merle s bílými znaky a hnědým pálením	2019	fena
13	Červený-merle s bílými znaky a hnědým pálením	2017	pes
14	Černá s bílými znaky a hnědým pálením	2014	fena
15	Červená s bílými znaky a hnědým pálením	2017	pes
16	Černá s bílými znaky a hnědým pálením	2018	fena
17	Blue-merle s bílými znaky a hnědým pálením	2017	fena
18	Červený-merle	2017	fena
19	Blue-merle s bílými znaky a hnědým pálením	2008	fena
20	Blue-merle s bílými znaky a hnědým pálením	2006	fena

4.2 Izolace DNA

DNA byla odebrána metodou bukálních stěrů ze sliznice psa pomocí sterilních cytologických kartáčků. Kartáčky se nechaly vysušit ve sterilním prostředí. Následně byla část kartáčku s odebraným vzorkem odstřižena do mikrozkušavky. Izolace DNA ze stěrů proběhla pomocí NucleoSpin® Tissue Kitu od firmy Macherey-Nagel a dle jejich uvedeného postupu.

- 1) Ke každému vzorku se přidalo 180 μl T1 pufru a 25 μl Proteinázy K. Vzorky byly promíchány ve vortexu a inkubovány po dobu 30 minut při teplotě 56 °C s průběžným promícháním.
- 2) Následně se do vzorků přidaly 4 μl RNAzy a 200 μl B3 pufru. Vzorky byly znovu promíchány a inkubovány 10 minut při 70 °C.
- 3) Kartáčky byly z mikrozkušavek vyjmuty a přidalo se ke vzorkům 210 μl 96% etanolu. Následovalo promíchání.
- 4) Obsah mikrozkušavek byl pomocí mikropipet přesunut do zkumavky se silikátovým filtrem.
- 5) Zkumavky byly odstředěny 1 minutu centrifugou při 11 000 x g, díky čemuž se DNA zachytila na filtru. Zbylá tekutiny protekla skrz a byla následně vylita.
- 6) Do každého filtru se přidalo 500 μl BW a vzorky se daly znovu odstředit na centrifugu se stejnými podmínkami. Následně se přidalo 600 μl pufru B5 a znovu proběhla centrifugace.
- 7) Nepotřebná tekutina byla vylita a po dalším cyklu na centrifuze se tento krok opakoval.
- 8) Pro uvolnění DNA ze silikátového filtru se přidalo 100 μl pufru BE, následováno centrifugací 2 minuty při 11 000 x g.
- 9) Uvolněný obsah z filtru se znovu přepipetoval na filtr a vzorky se daly odstředit na 30 sekund do centrifugy.
- 10) Získané vzorky DNA se následně skladovaly v mrazicím boxu při teplotě -20 °C.

4.3 Navržení PCR-RFLP markeru pro identifikaci kauzální mutace genu *CLN6* popsané Katz et al. (2011)

4.3.1 PCR amplifikace fragmentu genu *CLN6* s kauzální mutací

V mezinárodní nukleotidové databázi ensembl

(https://www.ensembl.org/Canis_familiaris/Gene/Sequence?db=core;g=ENSCAFG00000017473;r=30:32246411-32264240) byla identifikována pozice kauzální mutace (c.829T>C v exonu 7). Pomocí programu Primer 3 Input 0.4.0 Program (Rozen&Skaletsky 2000) byla navržena dvojice primerů ohraničující místo kauzální mutace a amplifikující produkt o velikosti 332 bp. Pro amplifikaci bylo použito složení PCR reakce uvedené v Tabulce 7.

Tabulka 7: Složení premixu pro PCR amplifikaci primerů

Složka	Koncentrace
DNA	50 µg/12,5 µl
Taq Buffer with KCl (Thermo Scientific)	50 mM
MgCl ₂	1,5 mM
dNTP	200 µM
DOGCLN6-F	0,4 µM
DOGCLN6-R	0,4 µM
Enhancer (TOP-BIO)	2 mM
BSA	5 µg/ 12,5 µl
Taq polymeráza (Thermo Scientific)	0,7 U/ 12,5 µl

Pro amplifikaci byl použit termocykler C1000™ Thermal Cycler (BioRad).

Optimální teplota annealingu byla stanovena na základě teplotního gradientu*. Jako optimální pro specifickou amplifikaci byla vybrána teplota 62°C. Teplotní a časový profil použité amplifikace je uveden v následující tabulce (Tabulka 8).

Tabulka 8: Časový a teplotní gradient PCR amplifikace

Fáze	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	180	1
Denaturace	95	30	30
Annealing	Grad*	30	30
Elongace	72	40	30
Závěrečná elongace	72	420	1
Chlazení	12	∞	

*T₁=55,0, T₂=55,8, T₃=56,9, T₄=58,2, T₅=60,0, T₅=61,5, T₆=62,5, T₆=63,0

Následovala amplifikace po dobu 1 hodiny a 48 minut. Poté byly PCR produkty detekovány pomocí horizontální gelové elektroforézy SubCell (BioRad). Následně proběhly

všechny cykly (Tabulka 8) a poté byly ke každému vzorku přidány 2 μ l nanášejícího pufru s barvivem.

Amplifikované fragmenty gradientové PCR byly separovány ve 2% agarózovém gelu s ethidium bromidem v roztoku pufru TBE po dobu 40 minut a při napětí 120 V. Pomocí ethidium bromidu byla následně výsledná DNA vizualizována v systému GelDoc (BioRad) a elektroforeogramy archivovány v počítači.

4.3.2 Detekce alel genu *CLN6* pomocí restrikčního štěpení

Pomocí programu NEBcutter v2.0 (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>) a programu RestrictionMapper (<http://www.restrictionmapper.org/>) byl identifikován restrikční enzym *FauI*, který štěpí amplikon mutované alely na 2 fragmenty o velikosti 195 a 137 bp. Pro štěpení byl použit enzym *FauI* dodaný výrobcem New England BioLabs® Inc. Pro štěpení bylo použito 10 μ l PCR amplikonu. Štěpení probíhalo 1x CutSmart® pufru, který byl přiložen k enzymu. Štěpení probíhalo při teplotě 55 °C po dobu 60 minut. Aktivita enzymu byla inaktivována zahřátím vzorku na 65 °C po dobu 20 minut. Tyto procedury byly provedeny ve shodném termocykleru, jako probíhala amplifikace. Detekce alel pomocí restrikčního štěpení byla provedena elektroforeticky v 4% agarózovém gelu.

5 Výsledky

5.1 Izolace DNA

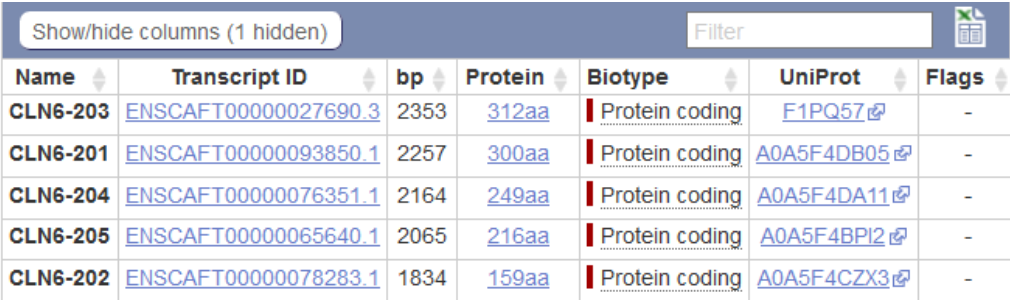
Vzorky DNA byly získány metodou bukálních stěrů od 20 čistokrevných zástupců plemene australský ovčák. Někteří zástupci byli vybráni náhodně, 2 z nich (vyznačení tučně v Tabulce 6) podle rodokmenové databáze dostupné <http://kchbo.com>. Vzorek číslo jedna byl odebrán jako již otestovaný 100% heterozygot a v rámci této práce byl tento výsledek potvrzen.

Průměrná výtěžnost DNA z jednoho bukálního stěru byla rovna 1,4 µg DNA. Čistota charakterizovaná parametrem A260/A280 byla rovna 1,97. Tyto výsledky svědčí o dostatečném množství kvalitní genomické DNA vhodné pro následující analýzy. Tyto výsledky platí pro všechny vzorky s výjimkou psa č. 20, u kterého byla zjištěna vysoká výtěžnost DNA 5,8 µg z jednoho stěru. U tohoto vzorku však amplifikace neprobíhala. Následně elektroforetickou separací této genomické DNA bylo zjištěno, že se nejedná o vysokomolekulární DNA. Zřejmě v průběhu skladování a expedice vzorku došlo k jeho kontaminaci mikroorganismy způsobujícími degradaci odebrané genomické DNA.

5.2 Bioinformatická analýza kauzální mutace genu *CLN6* a navrhování PCR-RFLP markeru

5.2.1 Bioinformatická analýza genu *CLN6*

Gen *CLN6* je lokalizovaný na 35. páru chromozomu psa domácího. Bylo popsáno celkem 5 variant sestřihů tohoto genu, které se liší počtem aminokyselin kódovaného proteinu. Varianty sestřihu jsou charakterizovány na Obrázku 13.



Name	Transcript ID	bp	Protein	Biotype	UniProt	Flags
CLN6-203	ENSCAFT00000027690.3	2353	312aa	Protein coding	F1PQ57	-
CLN6-201	ENSCAFT00000093850.1	2257	300aa	Protein coding	A0A5F4DB05	-
CLN6-204	ENSCAFT00000076351.1	2164	249aa	Protein coding	A0A5F4DA11	-
CLN6-205	ENSCAFT00000065640.1	2065	216aa	Protein coding	A0A5F4BPI2	-
CLN6-202	ENSCAFT00000078283.1	1834	159aa	Protein coding	A0A5F4CZX3	-

Obrázek 13: Varianty sestřihu genu *CLN6* u psa domácího v databázi ensembl

Grafické vyjádření jednotlivých exonů a intronů u jednotlivých variant sestřihu u genu *CLN6* je uvedeno na Obrázku 14.



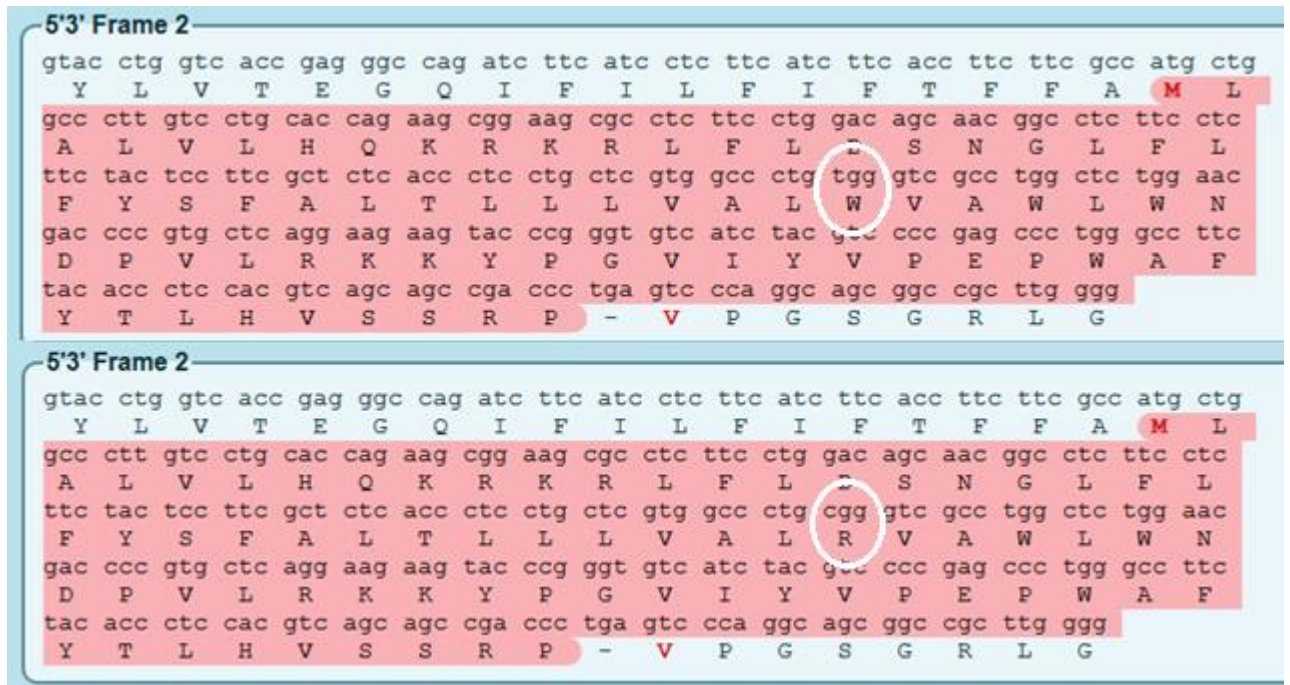
Obrázek 14: Grafické znázornění exonů a intronů u jednotlivých variant sestřihu genu *CLN6*

PCR-RFLP marker byl navržen na základě 1. transkripční varianty. Sekvence intronů a exonů je znázorněna na dalším obrázku. Kauzální bodová mutace T>C je lokalizovaná v 7. exonu. Na tomto obrázku je znázorněna sekvence původní nemutované alely a nukleotid, který může být mutací postižen, je na obrázku znázorněn červeným oválem. (Obrázek 15)

Exons/ Introns	Translated sequence	Flanking sequence	Intron sequence	UTR
5' upstream sequence				
1	ENSCAFE00000262023	32 264 240	32 264 095	146
	Intron 1-2	32 264 094	32 257 425	6,670
2	ENSCAFE00000190060	32 257 424	32 257 310	115
	Intron 2-3	32 257 309	32 252 178	5,132
3	ENSCAFE00000190062	32 252 177	32 252 079	99
	Intron 3-4	32 252 078	32 250 997	1,082
4	ENSCAFE00000190063	32 250 996	32 250 808	189
	Intron 4-5	32 250 807	32 250 595	213
5	ENSCAFE00000190064	32 250 594	32 250 539	56
	Intron 5-6	32 250 538	32 249 709	830
6	ENSCAFE00000190065	32 249 708	32 249 586	123
	Intron 6-7	32 249 585	32 248 036	1,550
7	ENSCAFE00000190066	32 248 035	32 246 411	1,625

Obrázek 15: Sekvence nemutované alely s vyznačeným nukleotidem, který je u nemoci postižen mutací

Na následujícím obrázku je znázorněna část proteinu kódovaného mutovanou a nemutovanou alelou. Z tohoto obrázku je patrné, že v případě nemutované alely se do polypeptidového řetězce zabudovává aminokyselina arginin (R) místo původního tryptofanu (W).



Obrázek 16: Substituce aminokyseliny tryptofan na arginin vlivem mutace



Obrázek 18: Restrikční enzym u mutované alely (FauI)

Pro určení velikosti produktu restrikčního štěpení byl použit program RestrictionMapper. Jeho výstup u mutované alely znázorňuje Obrázek 19. Z tohoto obrázku je patrné, že produktem restrikčního štěpení jsou dva fragmenty velikosti 196 a 137 bp.

Enzymes: FauI

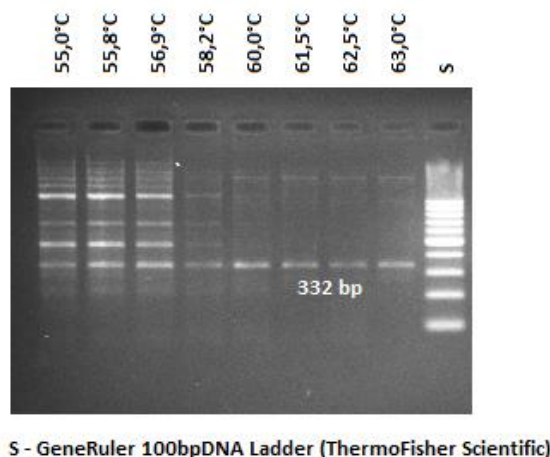
Length	5' Enzyme	5' Base	3' Enzyme	3' Base	Sequence
195	FauI	138	none	332	GGCCCTGCGG GTCGCCTGGC TCTGGAACGA CCCCCTGCTC AGGAAGAAGT ACCCGGGTGT CATCTACGTC CCCGAGCCCT GGCCTTCTA CACCCTCCAC GTCAGCAGCC GACCCTGAGT CCCAGGCAGC GGCCGCTTGG GGCCTGCCT GGAGGGAGAT GAGCTGTAGC GAGTGTGTGA GTGTGGGATG TGTGT
137	none	1	FauI	137	GGCCAGATCT TCATCCTCTT CATCTTACC TTCTTCGCCA TGCTGGCCCT TGTCTGCAC CAGAAGCGGA AGCGCCTCTT CCTGGACAGC AACGGCCTCT TCCTTTCTA CTCCTTCGCT CTCACCCTCC TGCTCGT

Obrázek 19: Velikost produktu restričního štěpení (195 a 137 bp)

5.3 Genotypizace vybraných zástupců plemene australský ovčák

5.3.1 Elektroforeogramy použité pro identifikaci genotypu

Z metodické části bakalářské práce je patrné, že pro navržení funkčního markeru bylo nezbytné zvolit správnou annealační teplotu, která bude poskytovat pouze předpokládaný fragment o velikosti 332 bp. Na následujícím obrázku je uveden elektroforeogram, který odpovídá teplotnímu gradientu použitému pro stanovení optimální annealační teploty. (Obrázek 20)



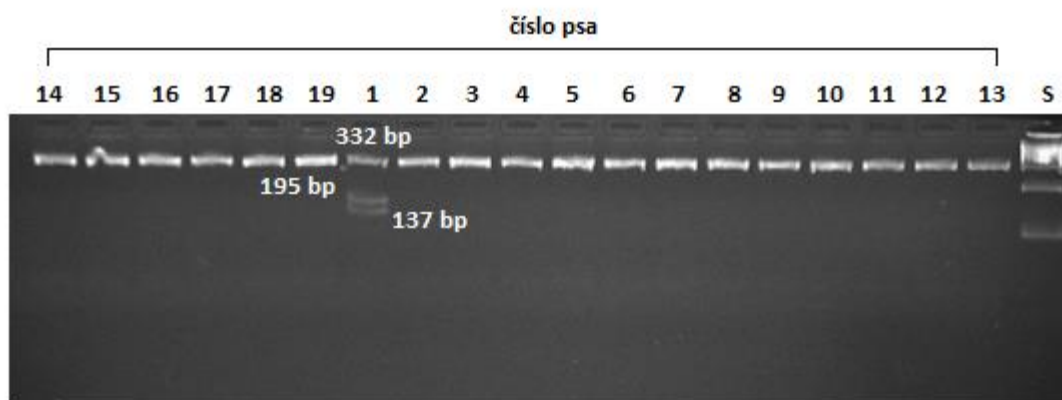
Obrázek 20: Elektroforeogram gradientové PCR

Každý z hodnocených psů byl elektroforeticky hodnocen dvakrát. Nejprve byl elektroforeticky separován PCR amplikon před restričním štěpením (Obrázek 21) a následně byla provedena elektroforetická separace restričně štěpeného amplikonu. (Obrázek 22)



S - GeneRuler 100bpDNA Ladder (ThermoFisher Scientific)

Obrázek 21: Elektroforeogram amplikovaného PCR markeru před restrikčním štěpením



S - GeneRuler 100bpDNA Ladder (ThermoFisher Scientific)

Obrázek 22: Elektroforeogram amplikovaného PCR markeru po restrikčním štěpení

Z druhého obrázku je patrné, že k restrikčnímu štěpení docházelo pouze u 1 jedince (pes č. 1), kdy produktem restrikčního štěpení byl původní produkt o velikosti 332 bp a dva fragmenty o velikosti 137 a 195 bp. Takovýto profil odpovídá heterozygotnímu jedinci.

5.3.2 Přehled výsledků genotypizace vybraných zástupců plemene australský ovčák

V Tabulce 20 jsou sumarizované výsledky provedené genotypizace jako genotypy charakterizované formou nukleotidů, které se v hodnocené pozici genu *CLN6* nachází. Zápis C/T představuje heterozygota neboli přenašeče onemocnění NCL. Zápis T/T představuje jedince, kteří mají obě dvě nemutované alely, a jedná se tudíž o zdravé jedince, kteří mutovanou alelu nemohou předávat na potomky.

Problematika psa č. 20 byla již zmíněna ve výsledkové části práci zaměřené na kvalitu izolované DNA. Degradace genomické DNA u tohoto psa způsobila, že PCR amplifikace neprobíhala, a tudíž nemohlo být provedeno ani restriční štěpení. U tohoto psa se nepodařilo stanovit jeho genotyp.

Tabulka 9: Výsledné genotypy vybraných zástupců plemene AO

č.	genotyp
1	C/T
2	T/T
3	T/T
4	T/T
5	T/T
6	T/T
7	T/T
8	T/T
9	T/T
10	T/T
11	T/T
12	T/T
13	T/T
14	T/T
15	T/T
16	T/T
17	T/T
18	T/T
19	T/T
20	nestanoveno

6 Diskuze

Výsledky experimentální části se ztotožňují s těmi ve studii Katz et al. (2011), podle které byl navržen PCR-RFLP marker. Přestože funkce proteinu *CLN6* není dodnes jasně definována, je zřejmé, že bodová substituční mutace T>C, která má za následek záměnu tryptofanu (TGG) za arginin (CGG), je známou kauzální mutací způsobující neuronální ceroidní lipofuscinózu u australského ovčáka.

Katz et al. (2011) provedli odběr tkání od utracených psů a na základě fluorescenční mikroskopie vyhodnocovali změny v buňkách sítnice a mozku s neurologickými příznaky. Navrhli primery, které amplifikovaly různé oblasti všech 7 exonů. V nich identifikovali potencionální mutace, u kterých vyhodnocovali jejich korelaci s příznaky nemoci. Ve své studii zjistili více mutací v genu *CLN6*. Současně provedli také bioinformatickou analýzu, ve které porovnávali gen *CLN6* u dalších savců, např.: u člověka, šimpanze, makaka, u skotu, ptakopyska, potkana, myši, ale i u ptáků (kur domácí) a obojživelníků (drápatka vodní). Zjistili, že australský ovčák má podobnou strukturu genu (resp. kódované proteinu), a díky tomu by pes mohl být dobrým modelem pro vývoj metod terapie, která by se dala aplikovat na člověka.

Použité vzorky byly získány ve spolupráci s Univerzitou v Missouri, DNA izolovaná z krve od psů, kteří nejevili známky nemoci. Bohužel se jim nepodařilo ani u jednoho prokázat přítomnost mutované alely. Pozorovaná nemocná fena byla z domácího chovu, která od 18. měsíce vykazovala první symptomy onemocnění, další měsíc byla úplně slepá. Kvůli zhoršujícím se příznakům byla usmrcena.

Heterozygot v naší práci byl již před odebráním vzorku testován v jiné laboratoři, a posloužil tak jako kontrolní vzorek pro otestování naší metody. Metoda navržené genetické analýzy byla provedena na 20 vzorcích čistokrevných zástupců plemene australský ovčák, jen u jednoho zástupce nebyla analýza dokončena z důvodu degradace genomické DNA.

Ostatní zástupci byli podle této metody hodnoceni jako zdraví, neboť u nich nebyla zjištěna mutovaná alela. Bohužel, u této nemoci není absence mutované alely jistotou, že pes nepřenáší jinou kauzální mutaci způsobující NCL. Udává se ale, že tato substituční mutace u plemene AO bývá velmi vzácná. Katz et al. (2011) provedli analýzu u 637 zástupců plemene a ani jeden ze vzorků nenesl mutovanou alelu. Ke zmapování výskytu a k populační analýze NCL v Česku u australských ovčáků by tedy bylo zapotřebí odebrat desítky až stovky vzorků.

Problém u takto vzácné nemoci nastává tehdy, pokud dochází k výraznému navýšení chovu u málopočetných plemen, jako tomu je právě u plemene australský ovčák. Dva jedinci (pes č. 1 a pes č. 20) byli vybráni na základě příbuzenského vztahu z databáze KCHBO, který se odvíjí od společného předka. Protože pes č. 1 nese heterozygotní mutaci a pes č. 20 má potomka heterozygota, vznikla pro tuto práci hypotéza, že společný předek, který byl do České republiky importován z Ameriky, je původcem mutované alely.

Genetická analýza psa č. 20 měla tuto hypotézu potvrdit, bohužel se tak kvůli znehodnocení vzorku nepodařilo. K novému testu by bylo za potřebí zajištění dalšího vzorku, zároveň byla analýza omezena množstvím enzymu potřebného ke štěpení a jeho cenou.

7 Závěr

Výsledky vyplývající ze studia vědecké literatury, a i z vlastních experimentů, je možné shrnout do následujících bodů:

- 1) Příčiny NCL jsou u různých plemen způsobeny kauzálními mutacemi různých genů. Byla zjištěna velká podobnost, jak na úrovni symptomů, tak i na úrovni kauzálních genů, mezi psem a člověkem. Pes domácí se tudíž může stát vhodným genetickým modelem pro studium onemocnění. Na základě bioinformatické analýzy bylo potvrzeno, že mutace typu substituce v 7. exonu genu *CLN6* je kauzální pro vznik tohoto onemocnění u plmene australský ovčák. První vědecká hypotéza tak byla zcela potvrzena.
- 2) Během řešení bakalářské práce byl navržen kodominantní PCR-RFLP marker, který je schopen rozlišit mutovanou a nemutovanou alelu genu *CLN6* (substituce T>C) u AO. Výsledky experimentální části práce potvrdily, že enzym *FauI* je schopen specificky štěpit v místě kauzální mutace. Je možné konstatovat, že i druhá vědecká hypotéza byla jednoznačně potvrzena.

Z literární rešerše a následné diskuze výsledků experimentální část vyplývá, že plemena, která se v této době těší velké oblibě, jsou ohrožena zavlečením alel se vzácnými mutacemi importem ze zahraničí. Tento problém představuje riziko především pro málopočetná plemena, u kterých se navíc z důvodu nízkého počtu zástupců zároveň zvyšuje míra inbreedingu, a tudíž i šance křížení dvou heterozygotních psů.

Přestože se NCL u psů uvádí jako vzácné onemocnění, v České republice je mutovaná alela u plemene australský ovčák přítomna, podle databáze KCHBO dokonce u dvou psů. Je možné, že v celém rodokmenu by našlo více heterozygotů, neboť počet nových vrhů se s každým rokem zvyšuje díky atraktivitě plemene pro člověka.

Předpokládá se, že mutovaná alela byla do Česka zavlečena importem zástupce AO z Ameriky. U čistokrevných plemen psů bývá obvyklé, že se pro křížení vybírají příbuzensky vzdálení zástupci plemene ze zahraničí, s čímž také roste riziko zavlečení mutovaných alel.

Testování NCL není v Česku u plemene australský ovčák povinné, z hlediska udržitelnosti chovu ovšem doporučuji před uchovněním nechat testovat.

Cílem této bakalářské práce bylo vyvinutí markeru, který se dá použít pro detekci mutované alely. Experimenty byly provedeny na malém rozsahu populace AO, a proto je nemělo smysl vyhodnocovat z hlediska populační genetiky. Pro budoucí studie doporučuji rozsáhlejší analýzu plemene AO, která bude zahrnovat desítky až stovky jedinců s cílem vyhodnotit strukturu populace a riziko onemocnění v ČR.

8 Seznam obrázků a tabulek

8.1 Seznam obrázků

Obrázek 1: Australský ovčák. Převzato z www.pets4homes.co.uk/	10
Obrázek 2: Vznik lysozomů (Meel a Klumperman 2008)	14
Obrázek 3: Vznik autofagozomu a fúze v autolysozom (Klionsky et al. 2014)	16
Obrázek 4: Cyklus oxidačního stresu a autofagie v buňce (CITACE)	20
Obrázek 5: Autofluorescenční materiál v neuronech sítnice u trpasličího jezevčíka (Sanders et al. 2010)	23
Obrázek 6: Mikroskopická analýza mozkové kůry (Kolichesky et al. 2016)	24
Obrázek 7: Výsledky ERG, šipka vyznačuje vlnu b, zkratka mo vyjadřuje věk v měsících (Katz et al. 2008)	26
Obrázek 8: Mikroskopická analýza sítnice (nahore celá sítnice, níže buněčné vrstvy). A vyznačuje viditelnou deterioraci, B označuje snímky z prvních vyšetření. (Katz et al. 2008)	27
Obrázek 9: Rodokmen border kolí s vyznačenými nositeli mutace v genu <i>CLN5</i> (Melville et al. 2005)	30
Obrázek 10: MRI australského honáckého psa s mutací v genu <i>CNL5</i> (Kolicheski et al. 2016)	31
Obrázek 11: Průběh PCR	42
Obrázek 12: Princip exponenciálního klonování DNA u PCR (Mullis 1990)	42
Obrázek 13: Varianty sestřihu genu <i>CLN6</i> u psa domácího v databázi ensembl	47
Obrázek 14: Grafické znázornění exonů a intronů u jednotlivých variant sestřihu genu <i>CLN6</i>	48
Obrázek 15: Sekvence nemutované alely s vyznačeným nukleotidem, který je u nemoci postížen mutací	48
Obrázek 16: Substituce aminokyseliny tryptofan na arginin vlivem mutace	49
Obrázek 17: Navržená dvojice primerů	50
Obrázek 18: Restrikční enzym u mutované alely (Faul)	51
Obrázek 19: Velikost produktu restrikčního štěpení (195 a 137 bp)	52
Obrázek 20: elektroforeogram gradientové PCR	52
Obrázek 21: elektroforeogram amplikovaného PCR markeru před restrikčním štěpením	53
Obrázek 22: elektroforeogram amplikovaného PCR markeru po restrikčním štěpení	53

8.2 Seznam tabulek

Tabulka 1: Přehled kauzálních genů spojených s NCL u člověka (převzato z databáze https://www.ucl.ac.uk/ncl-disease/)	12
Tabulka 2: Přehled genů NCL identifikovaných u plemen psů, typ mutace, nástup nemoci a eutanázie psa	21
Tabulka 3: Rozvoj symptomů u plemene border kolie (Studdert a Mitten 1991)	29
Tabulka 4: Porovnání výskytu symptomu u člověka, myši domácí a plemene čivavy (Faller et al. 2016)	34
Tabulka 5: Plemena s nepotvrzenou kauzální mutací NCL genu	38
Tabulka 6: Přehled odebraných vzorků se základní charakteristikou psů	43
Tabulka 7: Složení premixu pro PCR amplifikaci primerů	45
Tabulka 8: Časový a teplotní gradient PCR amplifikace	45
Tabulka 9: Výsledné genotypy vybraných zástupců plemene AO	54

9 Literární zdroje

Abitbol M et al. 2010. A canine Arylsulfatase G (ARSG) mutation leading to a sulfatase deficiency is associated with neuronal ceroid lipofuscinosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**(33): 14775-14780

Albrecht H, Hagel A, De Rossi T, Rau TT, Kirchner T, Neurath MF, Raithel M. 2014. Brown bowel syndrome: A rare complication in diseases associated with long-standing malabsorption. *Digestion* **89**(2): 105-109

Alevy J, Burger CA, Albrecht NE, Jiang D, Samuel MA. 2019. Progressive myoclonic epilepsy-associated gene Kctd7 regulates retinal neurovascular patterning and function. *Neurochemistry International* **129**: 104486

Appelqvist H, Wäster P, Kågedal K, Öllinger K. 2013. The lysosome: From waste bag to potential therapeutic target. *Journal of molecular cell biology* **5**(4): 214-226

Ashwini A, D'Angelo A, Yamato O, Giordano C, Cagnotti G, Harcourt-Brown T, Mhlanga-Mutangadura T, Guo J, Johnson GS, Katz ML. 2016. Neuronal ceroid lipofuscinosis associated with an MFSD8 mutation in Chihuahuas. *Molecular Genetics and Metabolism* **118**(4): 326-332

Awano T, Katz ML, O'Brien DP, Taylor JF, Evans J, Khan S, Sohar I, Lobel P, Johnson GS. 2006. A mutation in the cathepsin D gene (CTSD) in American Bulldogs with neuronal ceroid lipofuscinosis. *Molecular Genetics and Metabolism* **87**(4): 341-348

Benes P, Vetvicka V, Fusek M. 2008. Cathepsin D-Many functions of one aspartic protease. *Critical reviews in oncology/hematology* **68**(1): 12-28

Bernardi P, Di Lisa F. 2015. The mitochondrial permeability transition pore: Molecular nature and role as a target in cardioprotection. *Journal of molecular and cellular cardiology* **78**: 100-106

Braulke T, Bonifacino JS. 2009. Sorting of lysosomal proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* **1793**(4): 605-614

Cárcel-Trullols J, Kovács AD, Pearce DA. 2015. Cell biology of the NCL proteins: What they do and don't do. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* **1852**(10): 2242-2255

Cataldo AM, Hamilton DJ, Nixon RA. 1994. Lysosomal abnormalities in degenerating neurons link neuronal compromise to senile plaque development in Alzheimer disease. *Brain Research* **640**(1-2): 68-80

Císařovský, M. 2008. *Pes: nekonečný příběh od pravěku do třetího tisíciletí*. Altercan s.r.o. Praha. 902 s. ISBN: 978-80-900820-1-4.

Craiu D et al. 2015. Rett-like onset in late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis (CLN7) caused by compound heterozygous mutation in the MFSD8 gene and review of the literature data on clinical onset signs. *European Journal of Paediatric Neurology* **19**(1): 78-86

Di Guardo G. 2015. Lipofuscin, lipofuscin-like pigments and autofluorescence. *European Journal of Histochemistry EJM* **59**(1)

di Ronza A et al. 2018. CLN8 is an endoplasmic reticulum cargo receptor that regulates lysosome biogenesis. *Nature cell biology* **20**(12): 1370-1377

DiCiccio JE, Steinberg BE. 2011. Lysosomal pH and analysis of the counter ion pathways that support acidification. *Journal of General Physiology* **137**(4): 385-390

Dupont N, Nascimbeni AC, Morel E, Codogno P. 2017. Molecular Mechanisms of Noncanonical Autophagy. *Page International Review of Cell and Molecular Biology* **328**: 1-23

Edgar JR. 2016. Q & A: What are exosomes, exactly? *BMC Biology* **14**(1): 46

Eskelinen EL. 2005. Maturation of autophagic vacuoles in Mammalian cells. *Autophagy* **1**(1): 1-10

Eskelinen EL, Tanaka Y, Saftig P. 2003. At the acidic edge: Emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends in cell biology* **13**(3): 137-145

Evans J, Katz ML, Levesque D, Shelton GD, De Lahunta A, O'Brien D. 2005. A variant form of neuronal ceroid lipofuscinosis in American Bulldogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **19**(1): 44-51

Farias FHG et al. 2011. A truncating mutation in ATP13A2 is responsible for adult-onset neuronal ceroid lipofuscinosis in Tibetan terriers. *Neurobiology of Disease* **42**(3): 468-474

Feng Y, He D, Yao Z, Klionsky DJ. 2014. The machinery of macroautophagy. *Cell research* **24**(1): 24-41

Fietz M et al. 2016. Diagnosis of neuronal ceroid lipofuscinosis type 2 (CLN2 disease): Expert recommendations for early detection and laboratory diagnosis. *Molecular Genetics and Metabolism* **119**(1-2): 160-167

Gardiner M, Sandford A, Deadman M, Poulton J, Cookson W, Reeders S, Jokiahio I, Peltonen L, Eiberg H, Julier C. 1990. Batten disease (Spielmeyer-Vogt disease, juvenile onset neuronal ceroid-lipofuscinosis) gene (CLN3) maps to human chromosome 16. *Genomics* **8**(2): 387-390

Getty AL, Pearce DA. 2011. Interactions of the proteins of neuronal ceroid lipofuscinosis: Clues to function. *Cellular and molecular life sciences* **68**(3): 453-474

Gilliam D, Kolicheski A, Johnson GS, Mhlanga-Mutangadura T, Taylor JF, Schnabel RD, Katz ML. 2015. Golden Retriever dogs with neuronal ceroid lipofuscinosis have a two-base-pair deletion and frameshift in CLN5. *Molecular Genetics and Metabolism* **115**(2-3): 101-109

Goebel HH, Dahme E. 1986. Ultrastructure of retinal pigment epithelial and neural cells in the neuronal ceroid-lipofuscinosis affected dalmatian dog. *Retina* **6**(3): 179-187

Guo J, Johnson GS, Brown HA, Provencher ML, da Costa RC, Mhlanga-Mutangadura T, Taylor JF, Schnabel RD, O'Brien DP, Katz ML. 2014a. A CLN8 nonsense mutation in the whole genome sequence of a mixed breed dog with neuronal ceroid lipofuscinosis and Australian shepherd ancestry. *Molecular Genetics and Metabolism* **112**(4): 302-309

Guo J, O'Brien DP, Mhlanga-Mutangadura T, Olby NJ, Taylor JF, Schnabel RD, Katz ML, Johnson GS. 2014b. A rare homozygous MFSD8 single-base-pair deletion and frameshift in the whole genome sequence of a Chinese Crested dog with neuronal ceroid lipofuscinosis. *BMC Veterinary Research* **10**(1): 960

Gupta P, Soyombo AA, Atashband A, Wisniewski KE, Shelton JM, Richardson JA, Hammer RE, Hofmann SL. 2001. Disruption of PPT1 or PPT2 causes neuronal ceroid lipofuscinosis in knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**(24): 13566-13571

Haltia M. 2003. The neuronal ceroid-lipofuscinoses. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* **62**(1): 1-13

Hawkins-Salsbury JA, Cooper JD, Sands MS. 2013. Pathogenesis and therapies for infantile neuronal ceroid lipofuscinosis (infantile CLN1 disease). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* **1832**(11): 1906-1909

Heine C, Koch B, Storch S, Kohlschütter A, Palmer DN, Braulke T. 2004. Defective endoplasmic reticulum-resident membrane protein CLN6 affects lysosomal degradation of endocytosed arylsulfatase A. *Journal of Biological Chemistry* **279**(21): 22347-22352

Hirz M et al. 2017. Neuronal ceroid lipofuscinosis (NCL) is caused by the entire deletion of CLN8 in the Alpenländische Dachsbracke dog. *Molecular Genetics and Metabolism* **120**(3): 269-277

Höhn A, Grune T. 2013. Lipofuscin: Formation, effects and role of macroautophagy. *Redox biology* **1**(1): 140-144

Huber RJ. 2016. Using the social amoeba *Dictyostelium* to study the functions of proteins linked to neuronal ceroid lipofuscinosis. *Journal of biomedical science* **23**(1): 83

Jin M, Liu X, Klionsky DJ. 2013. SnapShot: Selective autophagy. *Cell* **152**(1): 368

Jolly RD, Douglas B V., Davey PM, Roiri JE. 1995. Lipofuscin in bovine muscle and brain: A model for studying age pigment. *Gerontology* **41**(Suppl. 2): 283-296

Jolly RD, Sutton RH, Smith RI, Palmer DN. 1997. Ceroid-lipofuscinosis in miniature Schnauzer dogs. *Australian veterinary journal* **75**(1): 67

Jung T, Bader N, Grune T. 2007. Lipofuscin: Formation, distribution, and metabolic consequences. *Page Annals of the New York Academy of Sciences* **1119**(1): 97-111

Faller, Kiterie ME, et al. 2016. The Chihuahua dog: A new animal model for neuronal ceroid lipofuscinosis CLN7 disease? *Journal of Neuroscience Research* **94**(4): 339-347

Katz ML, Coates JR, Sibigtroth CM, Taylor JD, Carpentier M, Young WM, Winingar FA, Kennedy D, Vuillemenot BR, O'Neill CA. 2014. Enzyme replacement therapy attenuates disease progression in a canine model of late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis (CLN2 disease). *Journal of Neuroscience Research* **92**(11): 1591-1598

Katz ML, Farias FH, Sanders DN, Zeng R, Khan S, Johnson GS, O'Brien DP. 2011. A missense mutation in canine CLN6 in an Australian Shepherd with neuronal ceroid lipofuscinosis. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2011**: 19802

Katz ML, Khan S, Awano T, Shahid SA, Siakotos AN, Johnson GS. 2005. A mutation in the CLN8 gene in English Setter dogs with neuronal ceroid-lipofuscinosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **327**(2): 541-547

Katz ML, Rustad E, Robinson GO, Whiting REH, Student JT, Coates JR, Narfstrom K. 2017. Canine neuronal ceroid lipofuscinoses: Promising models for preclinical testing of therapeutic interventions. *Neurobiology of disease* **108**: 277-287

Kaunitz JD. 2015. The Discovery of PCR: ProCuRement of Divine Power. *Digestive diseases and sciences* **60**(8): 2230-2231

Kim D, Kim G, Nam SJ, Yin J, Yoon J. 2015. Visualization of endogenous and exogenous hydrogen peroxide using a lysosome-targetable fluorescent probe. *Scientific Reports* **5**: 8488

Kim HE et al. 2016. Lipid Biosynthesis Coordinates a Mitochondrial-to-Cytosolic Stress Response. *Cell* **166**(6): 1539-1552

Kim J et al. 2019. Patient-customized oligonucleotide therapy for a rare genetic disease. *New England Journal of Medicine* **381**(17): 1644-1652

Klionsky DJ & Emr SD. 2000. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* **290**(5497): 1717-1721

Klionsky DJ, Eskelinen EL, Deretic V. 2014. Autophagosomes, phagosomes, autolysosomes, phagolysosomes, autophagolysosomes... Wait, I'm confused. *Autophagy* **10**(4): 549-551

Kolicheski A et al. 2016. Australian Cattle Dogs with Neuronal Ceroid Lipofuscinosis are Homozygous for a CLN5 Nonsense Mutation Previously Identified in Border Collies. *Journal of veterinary internal medicine* **30**(4): 1149-1158

Kolicheski A et al. 2017. Homozygous PPT1 Splice Donor Mutation in a Cane Corso Dog With Neuronal Ceroid Lipofuscinosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **31**(1): 149-157

Kollmann K, Uusi-Rauva K, Scifo E, Tyynelä J, Jalanko A, Bräulke T. 2013. Cell biology and function of neuronal ceroid lipofuscinosis-related proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* **1832**(11): 1866-1881

Kousi M et al. 2012. Novel mutations consolidate KCTD7 as a progressive myoclonus epilepsy gene. *Journal of Medical Genetics* **49**(6): 391-399

Lemasters JJ. 2005. Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Rejuvenation research* **8**(1): 3-5

Lewis G, Morrill AM, Conway-Allen SL, Kim B. 2020. Review of Cerliponase Alfa: Recombinant Human Enzyme Replacement Therapy for Late-Infantile Neuronal Ceroid Lipofuscinosis Type 2. *Journal of Child Neurology* **35**(5): 348-353

Li WW, Li J, Bao JK. 2012. Microautophagy: Lesser-known self-eating. *Cellular and molecular life sciences* **69**(7): 1125-1136

Lingaas F, Guttersrud OA, Arnet E, Espenes A. 2018. Neuronal ceroid lipofuscinosis in Salukis is caused by a single base pair insertion in CLN8. *Animal Genetics* **49**(1): 52-58

Lloyd R V., Hanna PM, Mason RP. 1997. The origin of the hydroxyl radical oxygen in the fenton reaction. *Free Radical Biology and Medicine* **22**(5): 885-888

Lu JY, Nelvagal HR, Wang L, Birnbaum SG, Cooper JD, Hofmann SL. 2015. Intrathecal enzyme replacement therapy improves motor function and survival in a preclinical mouse model of infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Molecular Genetics and Metabolism* **116**(1-2): 98-105

Lüllmann-Rauch R. 2007. *History and Morphology of the Lysosome*. Springer, Boston, MA. p 1-16

Mantel I, Brantley MA, Bellmann C, Robson AG, Holder GE, Taylor A, Anderson G, Moore AT. 2004. Juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis (Batten disease) CLN3 mutation (chrom 16p11.2) with different phenotypes in a sibling pair and low intensity in vivo autofluorescence. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde* **221**(05): 427-430

Melville SA, Wilson CL, Chiang CS, Studdert VP, Lingaas F, Wilton AN. 2005. A mutation in canine CLN5 causes neuronal ceroid lipofuscinosis in Border collie dogs. *Genomics* **86**(3): 287-294

Meyer A, Kossow K, Gal A, Steglich C, Mühlhausen C, Ullrich K, Braulke T, Muschol N. 2008. The Mutation p.Ser298Pro in the sulphamidase gene (SGSH) is associated with a slowly progressive clinical phenotype in mucopolysaccharidosis type IIIA (Sanfilippo A Syndrome). *Human Mutation* **29**(5): 770

Mirza M et al. 2019. The CLN3 gene and protein: What we know. *Molecular genetics & genomic medicine* **7**(12): e859

Miwa S, Lawless C, Von Zglinicki T. 2008. Mitochondrial turnover in liver is fast in vivo and is accelerated by dietary restriction: Application of a simple dynamic model. *Aging Cell* **7**(6): 920-923

Mochida K, Oikawa Y, Kimura Y, Kirisako H, Hirano H, Ohsumi Y, Nakatogawa H. 2015. Receptor-mediated selective autophagy degrades the endoplasmic reticulum and the nucleus. *Nature* **522**(7556): 359-362

Mole SE, Mitchison HM, Munroe PB. 1999. Molecular basis of the neuronal ceroid lipofuscinoses: Mutations in CLN1, CLN2, CLN3, and CLN5. *Human mutation* **14**(3): 199-215

Morelli AM, Ravera S, Calzia D, Panfoli I. 2019. An update of the chemiosmotic theory as suggested by possible proton currents inside the coupling membrane. *Open biology* **9**(4): 180221

Moreno-García A, Kun A, Calero O, Medina M, Calero M. 2018. An overview of the role of lipofuscin in age-related neurodegeneration. *Frontiers in Neuroscience* **12**: 464

Mullis KB. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American* **262**(4): 56-65

Narfström K, Wrigstad A, Ekestén B, Berg AL. 2007. Neuronal ceroid lipofuscinosis: Clinical and morphologic findings in nine affected Polish Owczarek Nizinny (PON) dogs. *Veterinary Ophthalmology* **10**(2): 111-120

Nicholls DG. 2005. Mitochondria and calcium signaling. *Cell Calcium* **38**(3-4): 311-317

Palikaras K, Daskalaki I, Markaki M, Tavernarakis N. 2017. Mitophagy and age-related pathologies: Development of new therapeutics by targeting mitochondrial turnover. *Pharmacology & therapeutics* **178**: 157-174

Park JS, Blair NF, Sue CM. 2015. The role of ATP13A2 in Parkinson's disease: Clinical phenotypes and molecular mechanisms. *Movement Disorders* **30**(6): 770-779

Perrotta I. 2018. Occurrence and characterization of lipofuscin and ceroid in human atherosclerotic plaque. *Ultrastructural Pathology* **42**(6): 477-488

Picard M, McManus MJ, Gray JD, Nasca C, Moffat C, Kopinski PK, Seifert EL, McEwen BS, Wallace DC. 2015. Mitochondrial functions modulate neuroendocrine, metabolic, inflammatory, and transcriptional responses to acute psychological stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**(48): E6614-E6623

Radisky ES. 2010. Cathepsin D: Regulation in mammary gland remodeling, misregulation in breast cancer. *cancer Biology & therapy* **10**(5): 467-470

Rider JA, Rider DL. 1988. Batten disease: past, present, and future. *American journal of medical genetics* **31**(S5): 21-26

Rossmesl JH, Duncan R, Fox J, Herring ES, Inzana KD. 2003. Neuronal ceroid-lipofuscinosis in a Labrador Retriever. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **15**(5): 457-460

Saftig P, Schröder B, Blanz J. 2010. Lysosomal membrane proteins: Life between acid and neutral conditions. *Page Biochemical Society Transactions* **38**(6): 1420-1423

Salmonowicz H, Passos JF. 2017. Detecting senescence: a new method for an old pigment. *Aging Cell* **16**(3): 432-434

Sanders DN, Farias FH, Johnson GS, Chiang V, Cook JR, O'Brien DP, Hofmann SL, Lu JY, Katz ML. 2010. A mutation in canine PPT1 causes early onset neuronal ceroid lipofuscinosis in a Dachshund. *Molecular Genetics and Metabolism* **100**(4): 349-356

Sato R, Inui T, Endo W, Okubo Y, Takezawa Y, Anzai M, Morita H, Saitsu H, Matsumoto N, Hagiya K. 2016. First Japanese variant of late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis caused by novel CLN6 mutations. *Brain and Development* **38**(9): 852-856

Schlötterer C. 2004. The evolution of molecular markers - Just a matter of fashion? *Nature reviews genetics* **5**(1): 63-69

Schulz A, Dhar S, Rylova S, Dbaibo G, Alroy J, Hagel C, Artacho I, Kohlschütter A, Lin S, Boustany RM. 2004. Impaired cell adhesion and apoptosis in a novel CLN9 Batten disease variant. *Annals of Neurology* **56**(3): 342-350

Seehafer SS, Pearce DA. 2006. You say lipofuscin, we say ceroid: Defining autofluorescent storage material. *Neurobiology of aging* **27**(4): 576-588

Siintola E et al. 2007. The novel neuronal ceroid lipofuscinosis gene MFSD8 encodes a putative lysosomal transporter. *American Journal of Human Genetics* **81**(1): 136-146

Smith KR et al. 2013. Cathepsin F mutations cause Type B Kufs disease, an adult-onset neuronal ceroid lipofuscinosis. *Human Molecular Genetics* **22**(7): 1417-1423

Snyder AN & Crane JS. 2019. *Histology, Lipofuscin*. StatPearls Publishing.

Somoza JR, Palmer JT, Ho JD. 2002. The crystal structure of human cathepsin F and its implications for the development of novel immunomodulators. *Journal of Molecular Biology* **322**(3): 559-568

Steinfeld R, Reinhardt K, Schreiber K, Hillebrand M, Kraetzner R, Brück W, Saftig P, Gärtner J. 2006. Cathepsin D deficiency is associated with a human neurodegenerative disorder. *American Journal of Human Genetics* **78**(6): 988-998

Studdert VP, Mitten RW. 1991. Clinical features of ceroid lipofuscinosis in border collie dogs. *Australian veterinary journal* **68**(4): 137-140

Tait SWG, Green DR. 2010. Mitochondria and cell death: Outer membrane permeabilization and beyond. *Nature reviews Molecular cell biology* **11**(9): 621-632

Tang C, He L, Liu J, Dong Z. 2015. Mitophagy: Basic Mechanism and Potential Role in Kidney Diseases. *Kidney Diseases* **1**(1): 71-79

Tanksley SD. 1983. Molecular markers in plant breeding. *Plant Molecular Biology Reporter* **1**(1): 3-8

Terman, A, & Brunk, UT. 2005. The Aging Myocardium: Roles of Mitochondrial Damage and Lysosomal Degradation. *Heart, Lung and Circulation*, **14**(2): 107–114.

Terman A, Kurz T, Navratil M, Arriaga EA, Brunk UT. 2010. Mitochondrial Turnover and aging of long-lived postmitotic cells: The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging. *Antioxidants & redox signaling* **12**(4): 503-535

Todde V, Veenhuis M, van der Klei IJ. 2009. Autophagy: Principles and significance in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* **1792**(1): 3-13

Turk V, Stoka V, Vasiljeva O, Renko M, Sun T, Turk B, Turk D. 2012. Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and proteomics* **1824**(1): 68-88

Van Meel E, Klumperman J. 2008. Imaging and imagination: Understanding the endo-lysosomal system. *Histochemistry and cell biology* **129**(3): 253-266

van Veen S et al. 2020. ATP13A2 deficiency disrupts lysosomal polyamine export. *Nature* **578**(7795): 419-424

Vesa J, Chin MH, Oelgeschläger K, Isosomppi J, DellAngelica EC, Jalanko A, Peltonen L. 2002. Neuronal ceroid lipofuscinoses are connected at molecular level: Interaction of CLN5 protein with CLN2 and CLN3. *Molecular Biology of the Cell* **13**(7): 2410-2420

Voges D, Zwickl P, Baumeister W. 1999. The 26S Proteasome: A Molecular Machine Designed for Controlled Proteolysis. *Annual Review of Biochemistry* **68**(1): 1015-1068

Wang CW, Klionsky DJ. 2003. The molecular mechanism of autophagy. *Molecular medicine* **9**(3-4): 65-76

Wilkie JSN, Hudson EB. 1982. Neuronal and Generalized Ceroid-Lipofuscinosis in a Cocker Spaniel. *Veterinary Pathology* **19**(6): 623-628

Xin W et al. 2010. CLN5 mutations are frequent in juvenile and late-onset non-finnish patients with NCL. *Neurology* **74**(7): 565-571

Yin D. 1996. Biochemical basis of lipofuscin, ceroid, and age pigment-like fluorophores. *Free radical biology and medicine* **21**(6): 871-888

Youle RJ, Narendra DP. 2011. Mechanisms of mitophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **12**(1): 9-14

Zeman W, Dyken P. 1969. Neuronal ceroid-lipofuscinosis (Batten's disease): relationship to amaurotic family idiocy? *Pediatrics* **44**(4): 570-583

Zhou X, Paushter DH, Pagan MD, Kim D, Santos MN, Lieberman RL, Overkleeft HS, Sun Y, Smolka MB, Hu F. 2019. Progranulin deficiency leads to reduced glucocerebrosidase activity. *PLoS ONE* **14**(7): e0212382