

**Česká zemědělská univerzita v Praze**  
**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**  
**Katedra veterinárních disciplín**



# **Zvířecí modely Huntingtonovy nemoci**

## **Bakalářská práce**

Vedoucí práce: doc. MVDr. Radko Rajmon, Ph.D.

Konzultant práce: prof. MVDr. Jan Motlík, DrSc.

Autor práce: Štěpán Hladký

2012

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma „Zvířecí modely Huntingtonovy nemoci“ vypracoval samostatně a použil jen pramenů, které cituji a uvádím v příložené bibliografii.

V Praze dne: .....

.....

podpis autora práce

## **Poděkování**

Chtěl bych poděkovat vedoucímu své práce doc. MVDr. Radko Rajmonovi, Ph.D., za odborné vedení, cenné rady a připomínky v průběhu zpracování této bakalářské práce.

Kolektivu laboratoře buněčné regenerace a plasticity prof. MVDr. Jana Motlíka, DrSc. z Ústavu živočišné fyziologie a genetiky, Akademie věd ČR, v.v.i. v Liběchově, za zasvěcení do problematiky a pomoc při vypracování této práce.

Svoji rodině, která byla mou oporou po celou dobu studia.

## Souhrn

Huntingtonova nemoc (HN) je vážné dědičné neurodegenerativní onemocnění lidí s psychickými a fyzickými příznaky s počátkem ve středním věku, obvykle mezi 35. až 50. rokem. Typické jsou zejména neovladatelné svalové záškuby s motorickým efektem, poruchy chůze a příjmu potravy. Nemoc má za následek také psychický rozklad osobnosti, vznik demence a v současnosti je nevyléčitelná.

Tato bakalářská práce popisuje Huntingtonovu nemoc se zaměřením na možnosti experimentálního studia jejího průběhu na zvířecích modelech. Jelikož přesné patofyziologické mechanismy HN nejsou zcela objasněné a možnosti výzkumu u postižených lidí jsou omezené víceméně jen na vzorky *post mortem*, je výzkum do značné míry závislý na těchto zvířecích modelech.

Po obecném popisu Huntingtonovy nemoci, příčiny, příznaků, vyšetření a současných možností léčby, nabízí tato práce přehled technik genetické modifikace zvířat, které umožnily vznik modelů HN a souhrn dosavadních druhů zvířecích modelů.

Pro expresi mutace HN byla geneticky upravená široká škála druhů od bezobratlých, přes nižší obratlovce, až po savce. Různé druhy zvířecích modelů nám dávají příležitost studovat vývoj patogenních procesů od počátku onemocnění, s postupující progresí pak sledovat chronické příznaky, změny fenotypu a v neposlední řadě nabízejí prostor pro rozvoj účinné léčby, využití nových farmakologických či chirurgických postupů.

Poslední kapitola se zabývá patogenezí HN v samčích pohlavních orgánech. Mezi periferními orgány v těle, vykazují samčí pohlavní orgány velmi podobné příznaky exprese genů jako v mozku. Pochopení patogeneze HN ve varlatech tak může odhalit společné kritické cesty, které vedou k degeneraci jak v mozku, tak v samčích pohlavních orgánech.

Ze závěru vyplývá, že jsou k dispozici mnohé modely Huntingtonovy nemoci, ale model, který tvoří charakteristický neuropatologický fenotyp pozorován u lidí s HN, stále chybí. Užitečnost zvířecích genetických modelů je však neocenitelná pro pochopení patologických mechanismů HN a pro možnost navrhnout nové způsoby léčby.

**Klíčová slova:** Huntingtonova nemoc, huntingtin, neurodegenerace, transgenní zvířecí model, testikulární degenerace

## Summary

Huntington's Disease (HD) is a devastating neurodegenerative disorder of people connected with physical and psychical symptoms starting in the middle age usually between 35 and 50 year. The typical symptoms are involuntary movements, walk and food intake disturbances. HD also caused personality destruction, progressive dementia and at present time is fatal.

This bachelor thesis describes Huntington's Disease relating to possibilities its experimental study in animal models. The exact pathophysiological mechanisms of HD are still unclear and possibilities of human studies are more or less restricted into the using of *post mortem* samples. Therefore the study of HD considerably depends on animal models.

Firstly the bachelor thesis describes the cause, symptoms, examination and actual therapy of HD. Secondly the thesis reviews the genetic modification techniques of animals, which have enabled the production of HD models. Next the bachelor thesis serves as an actual overview of HD animal models.

A wide variety of species, including the invertebrate, nonmammalian and mammals have also been genetically engineered to express the HD mutation. The various animal models of HD offer us an opportunity to study the progress of pathological processes at different time points and also serve for the development of effective therapy or utilization of new pharmacological and surgical procedures.

The last paragraph of the thesis dealt with the HD pathogenesis in male reproductive apparatus. Among the peripheral organs in the body, the testis shows the most similar pattern of gene expression to the brain. Understanding the pathogenesis of HD in the testis may reveal common critical pathways which lead to degeneration in both the brain and testis.

Finally it seems there are many animal models of Huntington's disease but the model which displays the characteristic neuropathological phenotype observed in human is still missing. Usefulness of animal genetic models is invaluable for the understanding of pathological mechanisms of HD and for the opportunity to create new therapeutic approaches.

**Keywords:** Huntington's disease, huntingtin, neurodegeneration, transgenic animal model, testicular degeneration

## Obsah:

1.	<b>Úvod</b> .....	2
2.	<b>Cíl</b> .....	2
3.	<b>Popis Huntingtonovy nemoci</b> .....	3
3.1	Historické pozadí .....	3
3.2	Příčiny vzniku Huntingtonovy nemoci .....	4
3.3	Příznaky Huntingtonovy nemoci .....	5
3.4	Vyšetření Huntingtonovy nemoci .....	7
3.5	Možnosti léčby Huntingtonovy nemoci .....	7
4.	<b>Transgenní zvířata – základ zvířecích modelů Huntingtonovy nemoci</b> .....	9
4.1	Metody přenosu genu .....	10
4.1.1	DNA mikroinjekce .....	10
4.1.2	Lentivirová transgeneze .....	11
4.1.3	Přenos genů prostřednictvím spermií (SMGT) .....	11
4.1.4	Přenos jader (SCNT) .....	12
4.2	Knockout a knockin modely s využitím embryonálních kmenových buněk .....	13
4.3	Knockout a knockin modely prostřednictvím nukleáz zinkového prstu (zinc-finger nucleases) .....	14
4.4	Indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSCs) .....	14
5.	<b>Zvířecí modely Huntingtonovy nemoci</b> .....	16
5.1	Chemické modely .....	16
5.2	Genetické modely .....	17
5.2.1	Modely hlodavců .....	18
5.2.1.1	Transgenní myši .....	18
5.2.1.2	Knock-in myši .....	22
5.2.1.3	Modely potkanů .....	23
5.2.2	Velké zvířecí modely .....	24
5.2.2.1	Primáti .....	24
5.2.2.2	Ovce .....	25
5.2.2.3	Prase – miniaturní prase .....	26
5.2.3	„Ne-savčí“ modely .....	27
6.	<b>Patogeneze Huntingtonovy nemoci v samčích pohlavních orgánech</b> .....	29
7.	<b>Závěr</b> .....	33
8.	<b>Seznam literatury</b> .....	34

## 1. Úvod

Huntingtonova nemoc (HN) je vážné dědičné neurodegenerativní onemocnění lidí s psychickými a fyzickými příznaky s počátkem ve středním věku, obvykle mezi 35. až 50. rokem (Roth a kol., 2008). Typické jsou zejména neovladatelné svalové záškuby s motorickým efektem, poruchy chůze a příjmu potravy. Nemoc má za následek také psychický rozklad osobnosti a vznik demence. Onemocnění je poměrně vzácné (vyskytuje se v poměru cca 1: 15 000) a je autozomálně dominantní. To znamená, že onemocnění vzniká již při přítomnosti mutace na jednom ze dvou párových chromozomů. Statistické riziko předání vloh pro nemoc přímým potomkům je tedy 50% (Roth a kol., 2006). Samotná nemoc není smrtelná, ale výrazně oslabuje imunitní systém a zdraví člověka, a tak snižuje průměrnou délku života (Walker, 2007).

Jelikož přesné patofyziologické mechanismy HN nejsou zcela objasněné a možnosti výzkumu u postižených lidí jsou omezené víceméně jen na vzorky *post mortem*, je výzkum do značné míry závislý na zvířecích modelech. Výzkum onemocnění na transgenních zvířecích modelech umožnil pokrok v pochopení molekulární patogeneze HN a nabídl prostor pro rozvoj nových farmakologických či chirurgických postupů.

## 2. Cíl

Cílem této práce je zpracovat literární rešerši o problematice Huntingtonovy nemoci se zaměřením na možnosti jejího experimentálního studia na zvířecích modelech. Nabídnout souhrn dosavadních zvířecích modelů a popsat jejich důležitost, výhody i omezení v základním výzkumu Huntingtonovy nemoci.

### 3. Popis Huntingtonovy nemoci

#### 3.1 Historické pozadí

Epidemie taneční mánie byla popsána v roce 1374, ale byl to Paracelsus (1493-1541), který jako první použil termín chorea pro mimovolné svalové záškuby a domníval se, že je CNS původu. V následujících letech, až do 17. století, zůstala nemoc tajemná a její povaha nebyla chápána. V roce 1600 angličtí kolonisté nazývali nemoc "that disorder" (ten nepořádek), nebo "San Vitus dance" (tanec Svatého Víta). V této době byli lidé s choreou považováni za posedlé děblem. První pokus o lékařský popis HN pod názvem "chronická dědičná chorea" byl zaznamenán o dvě století později, v roce 1840, lékaři ve Spojených státech, Anglii a Norsku. Nicméně, první přesný popis této nemoci sepsal v roce 1872 americký lékař George Huntington, po němž získala nemoc své titulní označení. Během následujících několik desítek let byly popsány různé formy nemoci a výzkum byl zaměřen na hledání příčiny. V roce 1983 objevil tým Josepha Martina genetický marker signalizující tuto nemoc a o desetiletí později skupina vědců pod vedením Jima Gusella a několik dalších zjistili, že HN vzniká mutací jediného genu. (Walker, 2007; Zuccato a kol., 2010).

Historie Huntingtonovy nemoci (Walker, 2007):

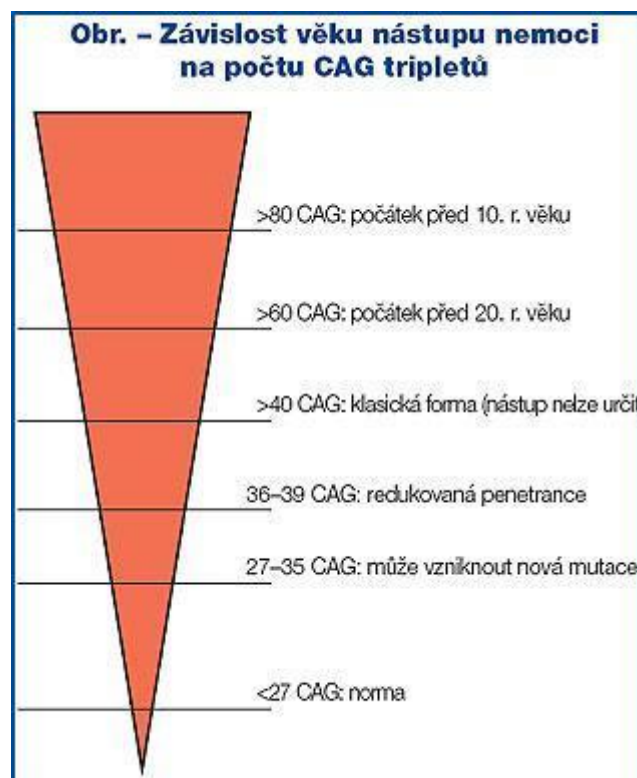
Rok	událost	publikace
1374	popsána epidemie taneční mánie	-
1500	Paracelsus se domnívá, že chorea je CNS původu	-
1686	Thomas Sydenham popisuje post-infekční choreu	-
1832	John Elliotson určuje dědičnou formu chorey	-
1872	George Huntington charakterizuje Huntingtonovu nemoc	-
1953	objasněna struktura DNA	5
1955	Huntingtonova nemoc popsána v oblasti Lake Maracaibo ve Venezuele	13
1967	konference Světové federace neurologie o Huntingtonově nemoci	38
1976	popsán první zvířecí model Huntingtonovy nemoci (kyselinou kainovou)	100
1983	objeven genetický marker Huntingtonovy nemoci	138
1993	identifikován gen HN; vytvořena studijní skupina pro klinické zkoušky	172
1996	vytvořena transgenní myš	242
2000	efektivnost léků prověřována na transgenních zvířatech	344



### 3.2 Příčiny vzniku Huntingtonovy nemoci

Huntingtonova nemoc vzniká mutací jediného genu IT 15 na krátkém raménku 4. chromosomu (Zuccato a kol., 2010). Podkladem mutace je zmnožení tripletu CAG (Cytosin-Adenin-Guanin) nad určitý počet. Normální stav je do 35 CAG tripletů. U některých lidí se však příslušná trojice písmen genetického kódu namnoží víckrát. Vznikne pak bílkovinná molekula, v které po sobě následuje 36 až 180 glutaminů. Při počtu opakování 41 a více tripletů daný jedinec onemocní HN (pokud se dožije věku projevu nemoci) zcela jistě, při počtu 36-40 tripletů je prognóza nejistá (Walker, 2007).

Čím více je CAG tripletů přítomno, tím dříve nemoc vypukne – počet CAG tripletů ale není jediný faktor rozhodující o věku propuknutí HN. Tato závislost platí především pro extrémní počty tripletů, osoby s množstvím tripletů nad 60 se obvykle manifestují již v dětství či dospívání (Obr 1.). Častěji jsou to lidé, kteří zdělili mutaci po svém otci – v průběhu vývoje spermie může totiž dojít ke zmnožení počtu CAG tripletů. Při vývoji mateřského vajíčka ke zmnožení obvykle nedochází (Roth a kol., 2006).



**Obr. 1.** Závislost věku nástupu nemoci na počtu CAG tripletů. (Roth a kol., 2006).

Zdravý gen IT 15, obsahující menší počet tripletů než 36, vyrábí bílkovinu zvanou huntingtin (HTT). Huntingtin se u savců vyskytuje ve všech buňkách, přičemž nejvyšší koncentrace jsou v mozku a varlatech, střední množství je pak přítomno v plicích, játrech, slezině, a nízká koncentrace se vyskytuje v srdci a ledvinách (Van Raamsdonk a kol., 2006; Walker, 2007). Všechny funkce huntingtinu nejsou ještě podrobně prozkoumány, ale je např. esenciální pro fyziologický embryonální vývoj mozku a krvetvorbu. Pokud by gen pro huntingtin chyběl, nepřítomnost této bílkoviny by byla fatální - organismus by neměl naději se vyvinout, odumřel by ještě před narozením. Pokud je gen pro výrobu huntingtinu změněn – mutován zvýšením počtu tripletů CAG, bílkovina získá díky odlišnému utváření jinou strukturu (obsahuje abnormálně dlouhý řetězec tzv. polyglutaminu), což vede ke změnám její funkce. Tato bílkovina se pak hromadí v nervové tkáni a působí patologicky. Současně, to také zhoršuje schopnost normálního proteinu HTT vyvinout molekulární činnosti, které jsou zásadní pro přežití a fungování neuronů, které v nemoci degenerují (Roth a kol., 2006, Zuccato a kol., 2010).

### ***3.3 Příznaky Huntingtonovy nemoci***

Příznaky se nejčastěji objevují mezi 35. a 50. rokem. Nemoc se postupně dramaticky zhoršuje v důsledku poškození mozku. Při HN odumírají jako první GABAergní, tzv. středně velké ostnité nervové buňky, které jsou přítomny v oblasti mozku nazývané striatum (součást bazálních ganglií) (Roth a kol., 2008). Proč mutovaný huntingtin způsobuje degeneraci právě těchto neuronů a jiné části mozku nechává relativně nedotčeny (alespoň na počátku nemoci) není dosud zcela jasné (Zuccato a kol., 2010). Dosavadní poznatky naznačují, že mutovaný huntingtin v neuronech mění mitochondriální funkce, které následně aktivují apoptotické dráhy (Brouillet a kol., 1999). Postupně dochází k degenerativním změnám i v dalších částech mozku až dojde k jeho celkové atrofii.

Počáteční příznaky HN jsou obvykle nespecifické emoční, psychiatrické a kognitivní poruchy. Běžné příznaky HN jsou progresivní ztráta tělesné hmotnosti, změny v sexuálním chování a poruchy spánkového režimu, které částečně můžou být vysvětleny dysfunkcí hypotalamu (Zuccato a kol., 2010). Charakteristické hybné poruchy, především choreatické dyskineze, které vedou ke stanovení správné diagnózy, se mohou objevit až za několik let. Výskyt a intenzita neurologických, kognitivních a behaviorálních změn může být značně

variabilní a jejich průběh nerovnoměrný (Roth a kol., 2006). Zpočátku dochází k drobným svalovým záškubům a stálému přemísťování končetin. Později dochází k plnému rozvíjení chorey (mimovolní nepravidelné „háživé či škubavé“ pohyby v obličeji, na končetinách i na trupu) (Roth a kol., 2008). Chorea nejdříve postihuje horní končetiny a hlavu, postižený dělá různé grimasy a otevírá ústa. Tyto mimovolní pohyby se výrazně zvětšují při stresu, naopak během spánku se neobjevují vůbec. Chorea se v průběhu nemoci po řadu let zesiluje, často těžce postihuje základní hybné aktivity, v pozdních fázích nemoci se choreatické pohyby zpomalují a mění v kroutivé, pomalé stereotypní pohyby, tzv. dystonii. V konečných fázích HN již mimovolní pohyby nemusí být patrné, svalstvo je ztuhlé a nemocný je obtížně pohyblivý či nehybný. U juvenilní formy HN (viz níže) chorea obvykle není přítomná v žádném stadiu nemoci (Roth a kol., 2006).

Dalšími velmi častými příznaky jsou porucha řeči (dysartrie), kdy se řeč postupně stává zcela nesrozumitelnou a porucha polykání (dysfagie), která vzniká nekoordinovaným pohybem hltanového svalstva a vede až k závažným poruchám příjmu potravy, následnému hubnutí až kachektizaci. Naprostá většina pacientů s HN v pokročilém stadiu nemoci trpí inkontinencí – pomočováním (Roth a kol., 2008).

Výrazným jevem HN jsou psychické problémy. Zpočátku dochází k drobnému podráždění, agresi, apatii, bezcitnému chování, ztrátě náhledu, kritičnosti vůči sobě, soustředění na sebe a svoje potřeby, sníženému zájmu o zevnějšek, náladovosti a celkově ke změně osobnosti. Pro postižení bazálních ganglií jsou typické poruchy procedurální paměti (nevědomé učení motorickým dovednostem - řízení auta, chůze apod.). S progresí HN se objevuje demence - globální úbytek kognitivních funkcí nepřiměřený věku. Člověk přestává být schopen konat běžné pracovní úkony, nemůže se soustředit a zapomíná (Walker, 2007). V současné době nejsou k dispozici terapeutické postupy dávající naději zpomalit či zastavit progresivní ztrátu kognitivních schopností. Omezená pohyblivost a demence patří mezi nejsmutnější projevy, protože bere člověku soběstačnost, a v podstatě jeho celý život.

Podle věku nástupu příznaků se HN dělí na 3 základní formy: forma juvenilní, klasická a s pozdním počátkem (Roth a kol., 2006, Roth a kol., 2008).

**Forma juvenilní** se začne projevovat do 20. roku a vzniká u cca 5 % všech případů Huntingtonovy nemoci. U tohoto typu dochází k rychlejší progresi onemocnění. Většinou se neobjeví mimovolní pohyby, ale naopak svalová ztuhlost a zpomalenost. Dochází k rychlému rozvoji demence, poruchám osobnosti a poruchám výslovnosti. Doba přežití je kratší než u klasické formy.

**Forma klasická** se projevuje mezi 35. – 50. rokem a objevuje se u 90% případů. Dochází k typickému průběhu HN popsaného výše. Člověk se po 10-15 letech nemoci (průběh však bývá individuální) stává závislým na péči okolí a umírá většinou na sekundární komplikace, zejména infekce.

**Forma s pozdním počátkem** se objeví po 60. roku věku. Jedná se o cca 5 % všech případů HN. Ze všech tří forem patří mezi nejmírnější, protože její průběh je pomalý. Obvykle nepůsobí závažné postižení základních denních aktivit a nemocní jsou po motorické stránce soběstační. Výraznější demence se obvykle nerozvíjí.

### ***3.4 Vyšetření Huntingtonovy nemoci***

Vyšetření se provádí v případě důvodného klinického podezření na HN genetickým testem z krve pacienta. Test klinickou diagnózu potvrdí či vyloučí, a to s jistotou téměř 100% (Roth a kol., 2008). Tento test, ale neznamená diagnózu HN, pouze potvrzuje přítomnost mutace a přítomnost vloh pro nemoc. A zde nastává velký etický problém. Každý člověk má právo vědět a právo nevědět svůj genetický stav, a pokud se ocitne v podezření na HN, rozhodnutí o provedení testu je velice problematické. Na jedné straně sdělení výsledku testu ukončí jeho nejistotu a umožní lépe se rozhodovat o své budoucnosti (uzavření manželství, plánování rodičovství, finanční zabezpečení atd.), na druhé straně však při pozitivitě výsledku ztrácí naději na zdravý život, je konfrontován s mnoha nepříznivými psychosociálními dopady na svou existenci a s pravděpodobností předání vloh pro nemoc svým potomkům (Roth a kol., 2006). Proto byl zaveden protokolární postup, který má za úkol získat informace a utřídit si svoje možnosti. Tento protokol, který trvá přibližně 10-12 týdnů, má několik kroků a sníží počet původních žadatelů až o 80%. Lidé si uvědomí, že mohou přijít o naději, a že by se neustále sledovali. Nevědomost je však mučivá a způsobuje depresivní stavy.

Z důvodu odpovědnosti není prováděno presymptomatické testování u osob mladších 18 let.

### ***3.5 Možnosti léčby Huntingtonovy nemoci***

Poznání tajů Huntingtonovy nemoci a vývoj účinné léčby naráží na řadu problémů. Mutace postihující gen je dominantní. Defektní huntingtin stačí napáchat zlo, i když se vedle něj vyskytují molekuly normálního proteinu syntetizované podle „zdravého“ genu. Ani když

se dodá další kopie nepoškozeného genu (což bývá podstatou genové terapie mnoha dědičných chorob vyvolaných recesivní mutací), není to nic platné, a proto je v současnosti Huntingtonova nemoc uváděna jako nevléčitelná. Přesto však lze alespoň přechodně řadu projevů zlepšit. Při opravdu závažných případech mimovolních pohybů se využívají antipsychotika neboli neuroleptika. Užívají se i v případech bludů, halucinací, agresivitě a neklidu. Mají však mnoho vedlejších účinků jako nadměrné utlumení, proto je nutné zvážit jejich použití. Je nezbytné bojovat proti ztrátě tělesné hmotnosti přijímáním vysokokalorické stravy nad 5000 kalorií. Antidepresiva mohou být vysoce účinná proti depresím. Bohužel neexistují žádné léčebné postupy dávající naději zpomalit či zastavit nejzávažnější projev Huntingtonovy nemoci – demenci (Roth a kol., 2006).

Velkou nadějí jsou nové terapeutické přístupy, které jsou v různých stádiích výzkumu, od základního výzkumu a preklinických studiích přes klinické zkoušky po schválená léčiva. Tyto látky působí přes inhibici excitotoxicity, zvýšení BDNF (*Brain derived neurotrophic factor*), inhibici kaspáz, potlačení vzniku huntingtonových agregátů, stimulaci vylučování mutovaného huntingtinu z buněk, inhibici mitochondriální dysfunkce, ovlivnění genové transkripce nebo potlačení RNA a proteinu mutovaného huntingtinu. V úvahu přichází také náhrada degenerovaných nervových buněk pomocí kmenových (embryonálních) buněk (Zuccato a kol., 2010).

## 4. Transgenní zvířata – základ zvířecích modelů Huntingtonovy nemoci

Rozvoj molekulární genetiky v posledních desetiletích umožnil prorazit mezidruhovou bariéru pro využití genů. Nejčastěji jsou geneticky modifikované organismy (GMO) připravovány tak, že se do určitého organismu uměle vnese gen izolovaný z organismu jiného druhu. Takový způsob změny genetické informace se označuje jako transgenóza a organismy tímto způsobem modifikované se nazývají transgenní. Transgenní organismy mohou být využity i jako modely mnoha lidských onemocnění jako je právě Huntingtonova nemoc, ale i řady dalších např. Alzheimerova choroba, kardiovaskulární choroby, cystická fibróza, diabetes mellitus (Aigner a kol., 2010). Tyto modely umožňují rozšířený pohled do molekulární patogeneze onemocnění a nabízejí možnost pro vývoj nových inovativních léčebných postupů.

Přípravou transgenních organismů se zabývá genové inženýrství, které je dnes, coby exaktní vědní disciplína, nedílnou součástí genetiky a molekulární biologie. Tato kapitola nabízí přehled technik genetické modifikace zvířat, které se neustále vyvíjejí, a další vylepšení transgenní technologie lze očekávat novými metodami cílení genů. Např. cílenou delecí, případně modifikací určitého genu pomocí nukleáz (*zinc-finger nucleases*) v kombinaci s homologní rekombinací (HR) (Rémy a kol., 2010) nebo technologie indukovaných pluripotentních buněk (West a kol., 2011).

### Genový konstrukt

Genový konstrukt je laboratorně připravený úsek dědičné informace ve formě DNA. Aby gen, který má být dopraven do organismu, fungoval správně, je potřeba ho smísit s dalšími sekvencemi DNA. Genový konstrukt se tedy skládá ze sekvence strukturního genu a regulační sekvence (Petr, 2003). Strukturní gen určuje, co se bude podle genového konstruktů v těle transgenního zvířete „vyrábět“. Volba strukturního genu proto závisí bezprostředně na požadavku na nově získanou vlastnost transgenního organismu. Volba regulační sekvence je velmi důležitá, protože určuje kde, kdy a za jakých podmínek se přenášený gen uplatní. Dále musí být genový konstrukt vybaven promotorem. Sekvence promotoru se přidává k transgenu z důvodu správné exprese genu neboli překladu do proteinového produktu. Terminální sekvence signalizuje buňce zakončení sekvence genu.

Někdy se do genového konstruktů přidává i "markerový" gen. Ten slouží jako jakási značka, která umožní snazší objevení genového konstruktů v těle živočicha. Používají se například markery, které umožní obarvení buněk. Např. zeleně fluoreskující protein (GFP – green fluorescent protein) vyvolává po osvětlení buněk ultrafialovým světlem typické zelené fluoreskování, a proto je možné přímo vidět, které buňky a která zvířata genový konstrukt přijala (Petr, 2003).

#### **4.1 Metody přenosu genu**

Rejstřík metod, jimiž lze do dědičné informace živočichů vpravit cizí gen, je široký (Aigner a kol., 2010). Současné techniky pro vytvoření geneticky modifikovaných zvířat jsou dnes především:

- DNA mikroinjekce do prvojader oplozených oocytů (DNA-MI, *DNA microinjection*)
- lentivirová transgeneze (LV- GT, *lentiviral transgenesis*)
- přenos genů prostřednictvím spermií (SMGT, *sperm mediated gene transfer*)
- přenos jader (SCNT, *somatic cell nuclear transfer*)

##### **4.1.1 DNA mikroinjekce**

Pro tyto účely se obvykle využívá oplozených oocytů - zygot, v nichž se mateřská a otcovská dědičná informace dosud nespojila, ale tvoří oddělená prvojádra. Jemnou skleněnou kapilárou se genový konstrukt vstříkne do prvojádra vzniklého ze spermie. Účinnost integrace genů po mikroinjekci je však velmi malá (dosahuje nanejvýš několika procent), a tak je nutné použít velká množství embryí, řádově stovky až tisíce (Petr, 2000). Proto je tato metoda s úspěchem používána převážně u myši, kde lze poměrně snadno a opakovaně získat velké množství embryí. U velkých zvířat, kde je odběr embryí z těla samic náročnější, drahý a nespolehlivý, je situace podstatně složitější. Embrya se po mikroinjekčním zákroku přenášejí do těla náhradním matkám, ale většina zárodků svůj vývoj neukončí. Ba ani narození mláďat ještě nezajišťuje úspěch. Požadovaný gen totiž nemusí být u všech zárodků úspěšně zabudován do mateřské DNA. Pronukleární injekce DNA do zygot je dnes i přes svoji náročnost a poměrně nízkou úspěšnost nejrozšířenější technikou používanou pro generování transgenních myši. U prasat a skotu však tato metoda není příliš efektivní (Aigner a kol., 2010).

### 4.1.2 Lentivirová transgeneze

Protože mikroinjekce DNA naráží u vyšších savců na spoustu technických problémů a náklady na takto vyrobená transgenní zvířata jsou obrovské, je metoda virové transgeneze jednou z alternativních možností (Hofmann a kol., 2003).

Metoda využívá vrozených vlastností a schopností virů ze skupiny tzv. retrovirů. Svou genetickou informaci, zapsanou v ribonukleové kyselině (RNA), nejprve zpětně přepíše do kyseliny deoxyribonukleové (DNA), jež se pak zařadí do genomu hostitelské buňky. Tuto vlastnost retrovirů lze využít k tvorbě transgenních zvířat.

Retroviry jsou schopny atakovat pouze dělící se buňky, jež se nacházejí ve stádiu buněčného cyklu označovaného jako metafáze. V jiných stádiích cyklu nemají na zabudování šanci, protože neprochází kompaktní jadernou membránou. Proto byly vyvinuty techniky, při nichž je retrovirový vektor vstříknut do zralých oocytů, a ty jsou následně oplozeny *in vitro* (Petr, 2000).

Retrovirové vektory vznikají tak, že jsou nahrazeny vlastní geny retrovirů cizorodými geny. Takto upravený retrovirus dokáže proniknout do buňky a zabudovat tam cizí DNA, ale už neumí vytvářet nové virové částice, a buňku tak nemá šanci vážněji poškodit. Příprava virových vektorů je náročná, a navíc je výrazně omezena velikost genu, který lze do nitra viru vměstnat. Obvykle nepřesahuje délku 10 kb (kilobází, tj. 10 000 „písmen“ genetického kódu). Tím je výrazně omezen rejstřík genů, jež lze přenášet retrovirovými vektory (Petr, 2003; Aigner et al., 2010).

Lentiviry také patří do čeledi retrovirů, jsou však schopné infikovat i nedělící se buňky. To umožňuje integraci vektoru genomu do oplozených embryí - zygot, což snižuje riziko spojené s přenosem v dřívějších stádiích (Hofmann a kol., 2003).

Lentivirový přenos genů do genomů prasat a skotu vykazuje vyšší účinnost transgeneze než je tomu u pronukleární injekce DNA, což výrazně snižuje výrobní náklady na produkci transgenních zvířat. Nízké výrobní náklady jsou nezbytné pro široké využití transgenních zvířat nejen jako modelů nemocí, ale i dárcovských zvířat pro xenotransplantace, nebo pro genetické zlepšování zemědělských populací (Hofmann a kol., 2003).

### 4.1.3 Přenos genů prostřednictvím spermií (SMGT)

Metoda SMGT (*sperm mediated gene transfer*) je založena na skutečných schopnostech spermií vázat exogenní DNA a přenést ji do vajíčka. Metoda byla popsána



v osmdesátých letech italským týmem vědců a postup je na první pohled velmi jednoduchý. Genový konstrukt je přimíchán do kultivačního média, v němž jsou uchovávány spermie, které na sebe během několika minut cizí gen navážou. Při oplození oocytů in vitro těmito spermii je genový konstrukt vnesen do dědičné informace jedince vzniklého oplozením. Metoda využívající spermii jako vektor cizí dědičné informace překvapovala neuvěřitelně vysokou účinností. Cizí gen nesla asi jedna třetina narozených myší. Bohužel se však tyto experimenty dlouho nedařilo zopakovat a metoda byla většinou autorů odmítána jako nespolehlivá (Petr, 2003; Aigner a kol., 2010). Příčiny této nespolehlivosti nejsou známy. Důležitým faktorem pro úspěch této metody se zdá být výběr vhodného spermatu od dárcovských zvířat. V současnosti se zdá, že spermie mohou při oplození in vitro cizí geny skutečně přenášet, chovají se ale velice nevypočitatelně. Zvýšit účinnost se vědci snaží novými modifikacemi metody, např. poškozením membrány spermií pro lepší navázání s cizí DNA, nebo intracytoplazmatickou injekcí spermií s navázanou DNA do oocytů. I když účinnost může v jednotlivých případech dosahovat až 85%, ve většině případů je však nulová (Petr, 2000; Aigner a kol., 2010).

#### **4.1.4 Přenos jader (SCNT)**

Přenos jader (SCNT, *somatic cell nuclear transfer*), známější pod označením klonování, se stal během několika málo let jedním z hlavních postupů pro produkci transgenních zvířat, především pak hospodářských. Transgeneze metodou SCNT zahrnuje následující kroky: (1) genetická modifikace a výběr dárcovských buněk, (2) enukleace zralých oocytů v metafázi II, (3) vpravení jádra dárce do cytoplasmu pomocí elektrických impulzů, (4) in vitro kultivace rekonstruovaných embryí a (5) přenos embryí do synchronizovaných příjemkyň (Fulka a kol., 2000; Aigner a kol., 2010). Takto vzniklý jedinec je geneticky totožný se zvířetem, z kterého byla odebrána dárcovská buňka.

Hlavní výhodou produkce transgenních zvířat pomocí klonování spočívá v tom, že lze provést výběr buněk, do kterých byl genový konstrukt úspěšně vpraven. Proto se účinnost postupů klonování v současnosti blíží až 10% narozených mláďat z celkového počtu klonovaných zárodků přenesených náhradním matkám. Při postupu pomocí mikroinjekce DNA je ověřován úspěch celého složitějšího postupu často až u narozených mláďat nebo u vyvíjejících se zárodků. Gen je úspěšně zabudován obvykle jen u malé části zvířat narozených ze zárodků podrobených mikroinjekci genů. Proto je produkce transgenních zvířat mikroinjekcí ve srovnání s produkcí těchto zvířat klonováním asi třikrát dražší.

Klonování bylo úspěšně zvládnuto u řady druhů hospodářských i volně žijících zvířat. (Petr, 2000; Aigner a kol., 2010)

#### ***4.2 Knockout a knockin modely s využitím embryonálních kmenových buněk***

Dostupné techniky pro modifikaci genomu jsou buď náhodné, nebo cílené. Exogenní gen vpravený náhodně, znamená riziko interference s činností jiných genů, což může vést k neočekávanému fenotypu (Zuccato a kol., 2010). I když byly tyto metody použity pro výrobu užitečných mutací u různých živočišných druhů, jsou technicky náročné, nákladné a neumožňují cílenou modifikaci specifických genů. Existují ale i techniky umožňující přenášení nových genů na konkrétní místo v genomu, nebo vytváření mutací na konkrétním lokusu. Této metodě se říká cílení genů.

Cílenou modifikaci lze dosáhnout homologní rekombinací použitím embryonálních kmenových buněk (ES). Velmi často je tato technika používána u myši, když je v embryonálních kmenových buňkách cíleně inaktivován určený gen v rámci genomu. Dochází tak k tzv. genetickému knockoutu. Embryonální kmenové buňky se zablokovaným genem jsou následně vstříknuty do nitra myšního zárodku, a ten je přenesen do těla náhradní matky. Vědci začali používat tuto techniku k poznávání neznámých funkcí nově objevených genů. Genetický knockout vyřadí z činnosti přesně určený gen. Na základě toho, co jedincům s vyřazeným genem chybělo, si pak vědci vytvářejí představu, jaké funkce daný gen v těle myši plnil. Mario Capecchi, Martin Evans a Oliver Smithies za rozvoj metody genového knockoutu obdrželi v roce 2007 Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu (Petr, 2007).

Umlčení genu však není jediným využitím této technologie. Lze postupovat i opačným směrem, např. vyměňovat genové varianty za původní verze. V tomto uspořádání se cílový gen neumlčuje, ale vyměňuje, jedná se tedy o knock-in. Tak se podařilo připravit více než 500 různých myších modelů lidských chorob, včetně neurodegenerativních, kardiovaskulárních, cukrovky nebo jednotlivých typů nádorů. (Černý, 2008)

### ***4.3 Knockout a knockin modely prostřednictvím nukleáz zinkového prstu (zinc-finger nucleases)***

Cílené modifikace dosažené knockout a knockin metodami na embryonálních kmenových buňkách, nebo klonováním (SCNT), jsou limitovány na živočišné druhy, u kterých jsou dostupné vhodné buňky (myš, prase nebo skot). Proto u některých živočišných druhů byla produkce transgenních jedinců s cílenou modifikací nemožná (potkan). Přestože na potkanech byly uskutečněny metodiky jako SCNT nebo produkce ES, indukovaných pluripotentních buněk nebo spermatogoniálních kmenových buněk (SSC), nebylo na těchto buňkách dosaženo cílené genetické modifikace. Vytvoření prvního transgenního potkana s cílenou modifikací (knockout) bylo dosaženo až pomocí nově vyvinuté techniky použitím ZFNs (*zinc-finger nucleases*) u potkaních embryí (Geurts a kol., 2009). Termín zinkový prst je součástí celé řady bílkovin, umožňuje jejich vazbu na DNA. Nukleáza je enzym, který rozkládá vazby nukleových kyselin (DNA, RNA). Výzkumníky vytvořený ZFNs byl přizpůsobený k vyhledání konkrétního místa genu. V kombinaci s homologní rekombinací je tato metodika vhodná jak pro cílenou delecí, tak pro modifikaci.

Vytváření GMO živočichů s cílenou delecí, případně modifikací přináší nové možnosti pro analýzu funkcí jednotlivých genů, studium onemocnění a produkci organismů pro ekonomické účely. Mikroinjekce plazmidu nebo mRNA pro ZFNs do potkaních embryí umožnila cílenou, rychlou, kompletní, permanentní a vrozenou disrupci endogenních lokusů. Aplikace ZFNs je vhodná pro produkci cílených knockoutů živočišných druhů, u kterých nejsou dostupné ES buňky nebo klonovací techniky. Touto technikou se bude moci najít odpověď na základní biologické otázky a vyvinout ekonomicky zajímavé modely pro produkci humanizovaných protilátek (Rémy a kol., 2010).

### ***4.4 Indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSCs)***

Jelikož získávání embryonálních kmenových (ES) buněk naráží u mnoha druhů na technické a etické problémy, byly vytvořeny „umělé“ kmenové buňky, tzv. indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSCs), vytvořené ze somatických buněk získaných z těla dospělého (Takahashi a Yamanaka, 2006).

Současný vývoj prasečích indukovaných pluripotentních buněk (piPSCs) umožňuje vytvoření chimérických zvířat. Tato chimérická zvířata vytvořená technikou iPSCs otevírají cestu pro hlubší studium iPSCs tumorigenicity, autologních transplantací a jiné klíčové aspekty pro bezpečné použití iPSCs v klinické praxi. Studium tumorigenicity iPSCs je kritické, protože ve studiích na myších iPSC derivované chiméry měly velký počet tumorů. Navíc, piPSCs schopné generovat chiméry by mohly umožnit komplexní genetické manipulace (knockout nebo knockin genů) a produkovat biomedicínsky důležité modely velkých zvířat nebo zlepšit produkci zvířat. West a kol. (2011) poprvé mimo hlodavců uskutečnili zárodeční přenos iPSCs s narozením transgenních selat, která měla v genomu lidské geny (POU5F1 a NANOG). Mimo jiné velkou histologickou analýzou těchto prasečích chimér ve věku 2, 7 a 9 měsíců dokázali absenci tumorů a demonstrovali normální vývoj. Vzorky tkání pozitivních na lidskou POU5F1 DNA nevykazovali expresi C-MYC genu, který je spojován s příčinou tumorigenicity. Vyvinutí prasečích iPSCs, které nezpůsobují vznik tumorů u chimérických zvířat, představuje atraktivní a účinný model pro studium účinnosti a bezpečnosti terapie kmenovými buňkami, a možná také produkci komplexních transgenních zvířat (West a kol., 2011).

## 5. Zvířecí modely Huntingtonovy nemoci

Jelikož přesné patofyziologické mechanismy HN nejsou zcela objasněné a možnosti výzkumu u postižených lidí jsou omezené víceméně jen na vzorky *post mortem*, je výzkum do značné míry závislý na zvířecích modelech. Vzhledem k tomu, že HN je způsobena mutací jediného genu, tak zavedení tohoto mutovaného genu do genomů různých druhů zvířat umožnilo vznik řadě zvířecích modelů. Vznik těchto modelů znamenal velký pokrok ve výzkumu HN. Zvířecí modely nám dávají příležitost studovat vývoj patogenních procesů od počátku onemocnění, s postupující progresí pak sledovat chronické příznaky, změny fenotypu, a v neposlední řadě nabízejí prostor pro rozvoj účinné léčby, využití nových farmakologických či chirurgických postupů. V této sekci nabízíme přehled široké škály zvířecích modelů HN.

### 5.1 Chemické modely

Před identifikací genu způsobujícího HN, byly zvířecí modely vytvářeny vstříkáním neurotoxinů do striata. Počáteční výsledky demonstrující, že přímá intrastriální injekce kyseliny kainové a jejích solí by mohla napodobit u potkanů léze striata pozorované u lidí s HN, představují začátek mnoha prací používajících analogy glutamátu k vytvoření selektivní neurodegenerace ve striátu u hlodavců (McGeer a McGeer, 1976). Kyselina chinolinová a kainová byly dvě nejčastěji používané látky pro vytváření modelů HN u hlodavců a nehumánních primátů, což naznačuje, že excitotoxicita by se mohla podílet na buněčné smrti pozorované u HN. Pozdější studie ukázaly, že injekce mitochondriálních toxinů, jako je 3-nitropropionová a malonová kyselina, byly schopné napodobit některé behaviorální aspekty HN u potkanů, což naznačuje, že mitochondriální dysfunkce se mohou účastnit patogeneze HN (Brouillet a kol., 1999).

Tyto chemické modely byly vítány i proto, že napodobovaly regionální selektivitu neuropatologie HN. Nicméně, nejsou schopny reprodukovat patofyziologické mechanismy indukované mutovaným genem. Naproti tomu stále zůstanou dobrými modely pro studium neuroprotektivních a neuroreparačních terapií HN ( Zuccato a kol., 2010).

## 5.2 Genetické modely

Díky dostupnosti několika genetických modelů onemocnění je nyní možné sledovat vliv buď normálního, nebo mutovaného huntingtinu na tkáň, buňky a subcelulární úroveň v různém čase. Zejména buněčné linie HN, které umožňují stabilní nebo indukovanou expresi wild-typu nebo mutovaného huntingtinu, byly užitečné pro zkoumání mechanismů onemocnění. V poslední době byly využívány i pro screening terapeutik (Sipione a Cattaneo, 2001). Současné úsilí směřuje k produkci nových in vitro buněčných systémů založených na množení a diferenciaci nervových kmenových buněk nesoucích mutovaný gen, které mohou být použity pro objevení léčiv a k toxikologickým testům v krátkodobých aplikacích (Conti a Cattaneo, 2010).

Nedávno byla indukovaná pluripotentní kmenová (IPS) technologie použita pro patologické modelování spinální muskulární atrofie (SMA), a v současné době je hlavním úsilím získat indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSCs) z pacientů s HN (Park a kol., 2008).

Pro expresi mutace HN byla geneticky upravená široká škála zvířecích druhů od bezobratlých - háďátka obecné (*Caenorhabditis elegans*) a octomilka obecná (*Drosophila melanogaster*,) přes nižší obratlovce - dánío pruhované (*Danio rerio*), až po savce jako jsou myši a potkani, ovce, prasata a nehumánní primáti.

Byl vytvořen velký počet myších modelů HN, které ukazují různé stupně podobnosti k lidským příznakům. Modely, které exprimují buď zkrácenou, nebo plnou délku lidského nebo myšího mutovaného huntingtinu, však vykazují značné fenotypové rozdíly. Tyto rozdíly mohou být způsobeny vlivem mutovaného proteinu, kmenem myši, nebo regulačními sekvencemi mezi myšími a lidskými geny huntingtinu. Pro překonání těchto problémů, někteří badatelé usilují o vytvoření velkých genetických modelů HN, jako jsou ovce, miniaturní prasata a nehumánní primáti. Díky své velikosti, kapacitě orgánů a fyziologii v některých aspektech podobných lidem, mohou být tyto modely vhodné pro preklinické zkoušky a dlouhodobé bezpečnostní studie, i když v některých případech vznikají etické obavy (Zuccato a kol., 2010).

## 5.2.1 Modely hlodavců

Genetické modely HN hlodavců jsou dnes především transgenní a knock-in modely myši a potkanů. Existující transgenní myši modely HN spadají do 2 hlavních kategorií. První kategorií jsou myši, které exprimují zkrácenou délku (N-terminální fragment), obvykle první 1 nebo 2 exony lidského genu HTT, který obsahuje rozšířenou polyQ. Druhá kategorie jsou transgenní myši vyjadřující plnou délku lidského nebo myšského mutovaného huntingtinu s rozšířenou polyQ (Wang a Qin, 2006).

### 5.2.1.1 Transgenní myši

V průkopnické studii vytvořila Gillian Bates a její skupina v nemocnici Guy v Londýně první transgenní linii myši vložením 1,9-kb fragmentu obsahujícího promotér lidského huntingtinu a exon 1 genu lidského huntingtinu nesoucího 144 CAG repetit (Davies a kol., 1997). Tyto myši, známé jako R6/2 myši linie, vykazují progresivní neurologický fenotyp, který napodobuje mnohé z vlastností Huntingtonovi nemoci zahrnující choreické pohyby, nedobrovolné stereotypní pohyby, tremor, epileptické záchvaty a také nemotorické komponenty nemoci. Často močí a vykazují progresivní ztrátu na váze těla. Neuropatologicky vyvíjejí neuronální intranukleární inkluze (NII), které obsahují jak huntingtin tak ubiquitin proteiny. Tyto NII byly také identifikovány u lidských pacientů s HN. Vyhodnocení úkolů učení se a paměti ukazuje abnormality již od věku 3,5 týdne. Pozorování jednoduchých motorických úkolů na zařízení zvaném rotarod („rotující tyč“) a chůze po kladině, odhalilo deficity od 5. týdne věku (Carter a kol., 1999).



**Obr.2.** Rotarod – zařízení pro sledování motorických schopností myši. Dostupné z [http://www.fmigmbh.de/ZP\\_00136.htm](http://www.fmigmbh.de/ZP_00136.htm)

R6/2 myši vykazují neuroanatomické abnormality, včetně postupného snižování objemu mozku a striata od 5. týdne věku, podstatné snižování počtu striatálních neuronů od 12. týdne věku, a smrt v 12. – 15. týdnech věku (Davies a kol., 1997). Byla také vytvořena druhá linie myši, známá jako R6/1, která ukazuje méně dramatický fenotyp. R6 linie jsou charakterizovány přítomností rozsáhlých jaderných inkluzí mutovaného huntingtinu v neuronech mozku, které se s postupující nemocí stále zvyšují co do počtu, velikosti a distribuce (Davies a kol., 1997). Vzhledem k jejich rozšířené polyQ, jsou R6 linie myši považovány za model spíše juvenilní formy HN než klasické formy HN. Časným nástupem příznaků a rychlým průběhem nemoci slouží tento model pro testování terapií HN, ale je méně vhodný pro zkoumání časných mechanismů onemocnění. R6/2 linie byla hlavním nástrojem pro preklinické farmakologické studie HN a značný počet pokusů byl hodnocen na této myší linii (Wang a Qin, 2006).

Podobný neuropatologický a behaviorální fenotyp byl charakterizován v transgenní linii N171-82Q, vytvořený v laboratoři Davida Borchelta na Johns Hopkins Univerzitě (Schilling a kol., 1999). Tento model exprimuje 171 aminokyselin lidského huntingtinu s 82 opakování CAG pod kontrolou prionového promotoru myšního proteinu, která omezuje expresi mutovaného proteinu pouze na neurony mozku. Intranukleární inkluze a neuritické agregáty



byly nalezeny v mozku N171-82Q myši, připomínající lidský fenotyp. Ve srovnání s myšmi R6, má N171-82Q model méně polyglutaminových repetic, výsledkem čehož je pozdější nástup příznaků, což z něj činí atraktivní model pro studium presymptomatických terapií. V důsledku delšího experimentálního okna může být terapie aplikována ještě před začátkem patologických změn onemocnění (Zuccato a kol., 2010).

Transgenní myši exprimující plnou délku huntingtinu jsou v některých případech lepší než modely exprimující NH2-terminální fragment huntingtinu, pokud jde o ztráty neuronů a schopnost přesněji shrnout sled událostí vedoucí k HN. Nicméně myši s N-terminálním fragmentem HTT mají obvykle více zřejmé chování a patologický fenotyp. Variabilita a pomalý vývoj fenotypu modelů exprimující plnou délku huntingtinu může být překážkou pro jeho použití při výzkumu potenciálních léčebných látek (Wang a Qin, 2006).

Dosud byly vytvořeny čtyři myši modely HN exprimující plnou délku huntingtinu. První myši model exprimující plnou délku huntingtinu (IT15 cDNA klon) s počtem repetic CAG v patologickém rozmezí, řízen cytomegalovirusovým promotorem, byl vyroben v roce 1998 (Reddy a kol., 1998). U těchto myši byl pozorován behaviorální fenotyp podobný HN, který byl doprovázen selektivní neuronální ztrátou ve striatu. Tato myši linie pak byla přerušena.

Skupina Michaela Haydena na Universitě v Britské Columbií vytvořila transgenní myš s kvasnicovým umělým chromozomem (YAC), která exprimuje genový transkript s plnou délkou genomu HN (Hodgson a kol., 1999). Následně bylo vytvořeno značné množství YAC myši nesoucích 18, 46, 72, a 128 CAG repetic (pojmenované YAC18, YAC46, YAC72 a YAC128 myši). Myši YAC128 jsou obzvláště zajímavé, protože ukazují jednotný fenotyp, striatální a následnou kortikální neurodegeneraci, a rozvoj dobře charakterizovaných progresivních motorických a kognitivních deficitů závislých na věku (Van Raamsdonk a kol., 2005). Myši YAC128 vykazují motorické abnormality již ve 3 měsících věku se zvýšenou aktivitou v *open field* testu (test sledující pohybovou aktivitou v otevřeném prostoru), následovaných výkonnostními abnormalitami na rotarodě v 6 měsících věku. Behaviorální deficity jsou progresivní, a okolo 12. měsíce se aktivita v *open field* testu výrazně snižuje ve srovnání s kontrolami. Difuzní imunoreaktivita mutovaného huntingtinu v jádrech je bohatá v neuronech striata ve 3 měsících věku. Ve 12 měsících věku je pak více rozšířená v neuronech kortexu, hippocampu a mozečku, zatímco žádné jaderné inkluze (NIIs) nebyly zjištěny (Van Raamsdonk a kol., 2005).

Slow a kol. (2005) vytvořili myš nesoucí poly-CAG gen huntingtinu zkrácený po intron II. Ve srovnání s YAC128, tento model i přes přítomnost agregátů nezobrazuje žádný

klinický důkaz o dysfunkci neuronů a jejich degeneraci, stanovený hmotností mozku, objemem striáta, a počtem neuronů striáta. Toto zjištění naznačuje, že inkluze nejsou patogenní *in vivo*, a že rozpustné fragmenty mutovaného huntingtinu mohou být více toxické. Zejména myši YAC128 obsahující selektivní mutaci kaspázy-6 štěpícího místa jsou chráněna před dysfunkci neuronů a neurodegeneraci *in vivo*. I přes přítomnost abnormálního chování a důkazů o ztrátě neuronů striáta, myši YAC128 nevykazují žádné snížení širokého spektra vazebních míst receptorů neurotransmiterů striata, které byly popsány v jiných myších genetických modelech a u lidí s HN (Benn a kol., 2007).

Ve stejných letech, skupina Lisy Ellerbyové na Buck Institute, Novato v Kalifornii přispěla k rozšíření počtu dostupných myších modelů s plnou délkou huntingtinu (Tanaka a kol., 2006). Tito vědci vytvořili podmíněný model myši s HN, ve kterém je plná délka lidského HTT exprimována v mozku pomocí tet-transaktivátoru (TTA) pod kontrolou prionového PrP promotoru. Tet-transaktivace znamená, že exprese genu může být zapnuta, nebo vypnuta pomocí příjmu antibiotika tetracyklinu, nebo jejich analogů např. doxycyklinu. V nepřítomnosti doxycyklinu projevovaly tyto myši progresivní behaviorální fenotyp skládající se z pomalých a nepravidelných mimovolných pohybů, ataxie při chůzi, třesu a trhavých pohybů, ztráty koordinace, ztráty hmotnosti a zkrácení délky života. Neuropatologie zahrnuje prominentní intranukleární inkluze v mozkové kůře a striátu, stejně jako cytoplasmatické agregáty (Tanaka a kol., 2006). Zejména, ~60-kDa fragment, který vypadá, že představuje NH<sub>2</sub>-terminální produkt štěpení, se hromadí v jádrech, což naznačuje, že proteolytické zpracování je součástí patogeneze HN.

V roce 2008 byly v laboratoři Williama Yanga vytvořeny myši nesoucí bakteriální umělý chromozóm (BAC) s plnou délkou lidského genu nesoucího 97 CAG repetice (Gray a kol., 2008). Tyto myši vykazují progresivní motorický deficit a selektivní neuropatologii v mozkové kůře a striatu s pozdním počátkem nástupu, což představuje nový a vhodnější *in vivo* model pro patogenezi HN a terapeutické studie. Myši BACHD ukazují progresivní motorické deficity výkonu na rotarodě od 2 měsíců věku, neuronální synaptické dysfunkce, a pozdní počátek selektivní neuropatologie, která zahrnuje významné atrofie mozkové kůry a striata a četné tmavě degenerující neurony ve striatu. Na rozdíl od předchozích modelů myši s plnou délkou mutovaného huntingtinu, nevykazují BACHD myši včasné a rozptýlené jaderné akumulace agregovaného mutovaného huntingtinu ve striatu, nebo mozkové kůře. Od 12 měsíců věku, mají mozky BACHD myši pouze několik malých agregátů, převážně v mozkové kůře a velmi malé agregáty ve striatu, což naznačuje, že difúzní jaderná akumulace agregovaného mutovaného huntingtinu ve striatu nebo mozkové kůře není nutně

spojena s pomalu progresivním a selektivním patologickým procesem u BACHD myši (Gray a kol., 2008).

### 5.2.1.2 Knock-in myši

U klasické transgenní myši HN se exogenní gen huntingtinu, nebo jeho část, vkládá náhodně, což znamená riziko interference s činností jiných genů, které nesouvisí s HN. Kromě toho může exprese transgenu, která je řízená umělými promotory, vést k fenotypu, který nesprávně napodobuje onemocnění, což je důsledek skutečnosti, že se transgen exprimuje nad fyziologickou koncentrací (Zuccato a kol., 2010).

Byly vypracovány geneticky přesné myši, které nesou mutace v příslušném genomickém a proteinovém kontextu a ve fyziologické koncentraci s cílem spolehlivěji replikovat patogenezi HN. Knock-in myši byly vytvořeny zavedením patogenní CAG repetice do endogenního myšního genu pro huntingtin (*Hdh*), který se nachází na chromozomu 5 (Shelbourne a kol., 1999; Lin a kol., 2001) anebo tím, že se nahradí myší exon 1 s lidským exonem 1 nesoucím poly-CAG repetice (Ishiguro a kol., 2001). Počáteční výsledky byly zklamáním, protože tyto knock-in myši měly normální délku života a nevykazovaly neuropatologické příznaky HN. Žádný zjevný fenotyp onemocnění nebyl pozorován u knock-in myši s 48, 90, a 109 CAG repeticemi v endogenním lokusu *Hdh* s názvem Hdh50, HdhQ92 a HdhQ111 (Shelbourne a kol., 1999). Tato počáteční zklamání později rozptýlilo bližší vyšetření modelů HdhQ92 a HdhQ111 skupinou Marcy MacDonald, které odhalilo jemné behaviorální abnormality v raném věku a středně silnou patologii ve striatu ve věku 2 let (Wheeler a kol., 2000). Výraznější buněčná dysfunkce a progresivnější abnormální motorické chování byly zjištěny i v dalších knock-in modelech vyznačující se přítomností delšího poly-CAG (Lin a kol., 2001).

HdhQ150 myši vytvořené v laboratoři Petera Detloffa na Univerzitě v Alabamě v Birminghamu vykazovali agregáty mutovaného huntingtinu přibližně v 9 měsících věku, úbytek na váze, sníženou aktivitu, abnormální výkon na rotarodě, stejně jako charakteristický fenotyp, který je známkou neurologických deficitů ve věku 2 let (Lin a kol., 2001). Podobné fenotypy byly popsány i u HdhQ140 myši, přičemž bylo pozorováno, že rané behaviorální abnormality v široké škále motorických a nemotorických funkcí začínající ve věku 1-4 měsíců byly následovány postupnou gliózí (12 měsíců) a ztrátou neuronů striáta ve 2 letech (Hickey a kol., 2008).

Tyto studie ukázaly, že knock-in myši reprodukuje obecné charakteristiky HN, jímž předchází deficity, které mohou odpovídat vleklé premanifestační fázi onemocnění u lidí. Tyto modely mohou být velmi důležité pro studium raných a mírných neuronálních abnormalit, které by mohly být primárně zodpovědné za rané funkční deficity. Proto knock-in myši představují platný model HN, s výhodou pomalejšího průběhu a patologie fenotypu, což může být užitečné pro hodnocení schopnosti potenciálních léčiv oddálit nástup raných abnormalit (Wang a Qin, 2006; Zuccato a kol., 2010).

### 5.2.1.3 Modely potkanů

Výzkum prováděný na potkanech těžší, na rozdíl od myši, z dostupnosti většího množství behaviorálních a zobrazovacích testů, které jsou vhodné k identifikaci neurologických deficitů, a které se vyskytují u neurodegenerativních onemocnění. Z potkanů by se proto měl stát ideální model pro hodnocení nových terapeutických přístupů v dlouhodobých in vivo studiích.

V prvním pokusu o model HN u potkanů byly do potkaního striáta injikovány lentivirální vektory kódující, prvních 171, 853, 1520 aminokyselin mutovaného huntingtinu s 44, 66, a 82 CAG repeticemi, řízené buď fosfoglycerát kinázou 1 (PGK) nebo cytomegalovirusovým promotorem (CMV) (De Almeida a kol., 2002). Tato strategie poskytuje robustní, akutní in vivo model pro selektivní neurodegeneraci. Nicméně, diskrétní, místně a časově omezená exprese mutovaného huntingtinu představuje překážku pro testování léků v dlouhodobých studiích.

K překonání místní transdukcce transgenů a umožnění konstitutivního rozšíření exprese mutovaného huntingtinu, vytvořila skupina Olafa Riese na univerzitě v Tübingenu první transgenní potkaní model HN nesoucího 1962-bp cDNA fragmentu potkaního huntingtinu s 51 CAG repeticemi pod kontrolou endogenního potkaního promotoru huntingtinu (Von Horsten a kol., 2003). Behaviorální a neuropatologické analýzy ukázaly, že potkan pro HN se vyznačuje počátkem onemocnění v dospělosti s behaviorálními fenotypy, které paralelizují histopatologické změny v mozku. Transgenní potkan HN představuje cenný model pro vyšetřování fenotypů choroby, jejich využití v dlouhodobých studiích, a testování účinnosti farmakologické léčby.

Nedávné pokroky v oblasti kmenových buněk vedly k izolaci potkaních embryonálních kmenových buněk (Buehr a kol., 2008). Můžeme tedy očekávat výrobu

velkého množství knock-in potkanů pro řadu lidských neurodegenerativních chorob, které budou poprvé poskytovat pozoruhodnou možnost pracovat s geneticky přesným potkaním modelem HN (Zuccato a kol., 2010).

## 5.2.2 Velké zvířecí modely

Modely hlodavců mají, nejen díky své omezené životnosti (36 měsíců), řadu nevýhod. Mnohé myší linie (R6) se vyznačují časným nástupem příznaků a rychlým průběhem nemoci, což odpovídá spíše juvenilní formě HN a jejich fenotypové projevy navozené nemoci se velmi odlišují od projevů člověka (Gil a Rego, 2009). Proto vznikla potřeba vytvoření velkých genetických modelů zvířat, které by svou velikostí, dlouhověkostí, orgánovou kapacitou a fyziologií hodnověrněji simulovali HN lidí.

### 5.2.2.1 Primáti

Anthony W.S. Chan a jeho výzkumný tým na Emory Universitě se rozhodl vytvořit transgenní model HN s použitím nehumánního primáta – *Makak rhesus* (Yang a kol., 2008). Pomocí virového vektoru zavedli do zralých oocytů změněnou formu genu pro lidský huntingtin (exon 1) s 84 repeticemi CAG a GFP (green fluorescent protein) (Zuccato a kol., 2010). Tyto oocyty následně vědci oplodnili spermii a vzniklá embrya byla zavedena do děloh náhradních matek. Ze 130 oocytů získali 23 embryí, z nichž se narodilo pět mláďat. Všechna měla funkční gen GFP a jejich buňky pod ultrafialovým zářením svítily, což dokazovalo, že se přenos genů zdařil. Transgenní opice vykazovali významné klinické rysy HN, včetně dystonie a chorey. Třem mláďatům viry zabudovaly do DNA větší počet kopií defektního genu. Tito makaci měli už při narození těžce poškozený mozek. Tkáň se podobala mozku člověka v závěrečné fázi Huntingtonovy choroby, přičemž dvě zvířata zemřela do čtyřiaadvaceti hodin po narození. Další makak zdědil menší počet kopií a žil měsíc. Brzy se u něj ale projeví příznaky typické pro Huntingtonovu chorobu (chorea). Zbývající dvě opice, označované jako rHD1 a rHD2 (Obr. 3), měli jen jednu kopii genu defektního huntingtinu s 29 a 83 CAG repeticemi, přičemž žili déle než půl roku a dali základ pro další generace transgenů (Yang a kol., 2008).



A

B

**Obr. 3.** Transgenní opice modelu HN - rHD-1 (vlevo) a rHD-2 (vpravo). Obraz při přirozeném světle (A) a fluorescenční obraz při ultrafialovém záření vykazující expresi GFP (B). (Yang a kol., 2008).

Nehumánní primáti jsou vzhledem k úzké fyziologické, neurologické a genetické podobnosti s lidmi velkým příslibem pro studium lidských neurologických poruch, u nichž jsou v současné době k dispozici stále nedokonalé experimentální modely.

### 5.2.2.2 Ovce

Russell Snell na Univerzitě v Aucklandu (ve spolupráci s jižním australským výzkumným a vývojovým ústavem Massachusetts General Hospital) vytvořil první ovčí model HN exprimující plnou délku lidského genu pro huntingtin se 73 CAG repeticemi (Jacobsen et al., 2010).

Ovce, *Ovis aries*, byly jako model vybrány pro podobnost jejich bazálních ganglií a mozkové kůry (míst primárně postižených při HN) obdobným oblastem lidského mozku. Další výhodou ovcí byla pro australské vědce jejich dostupnost a chovatelská nenáročnost – mohou být chovány pastevním způsobem v přirozeném prostředí a mají submisivní chování vůči člověku. Důležité ale je, že žijí déle než deset let, což umožňuje studium klasické formy nemoci s pozdějším nástupem neurodegenerativních změn a umožňuje sledovat chronické účinky mutovaného genu. Kromě toho se očekává, že ovce může být dobrým modelem pro farmakologické testy, protože jejich mozek má přední mozek (*Prosencephalon*) srovnatelný s lidským mozkem. To umožňuje využít chirurgické metody pro testování možných buněčných náhrad nebo aplikaci genové terapie, což není možné provádět u lidí.

Transgenní ovce byly vytvořeny metodou mikroinjekce DNA do prvojádra jednobuněčných zygot. Přibližně 413 takto injikovaných zygot pokračoval ve štěpení do fáze blastocysty, a ty byly zavedeny do příjemkyň australských Merino ovcí (3 embrya / 1 ks). Ze 150 narozených jehňat, sedm zemřelo už při porodu, dalších 16 zemřelo brzy po narození (do 48h), ale žádné z těchto jehňat nebylo transgenní. Ze zbývajících 127 jehňat, bylo metodou PCR potvrzeno šest transgenních jedinců - 4 berani, 2 ovce, kteří sloužili jako zakladatelé chovu transgenních jedinců (Jacobsen et al., 2010).

### **5.2.2.3 Prase – miniaturní prase**

Současné efektivní a přesné techniky genetické modifikace prasat umožňují vytváření transgenních modelů u řady lidských nemocí. Např. pigmentosa retinis, kardiovaskulární choroby, cystické fibrózy, diabetes mellitus, a v neposlední řadě neurodegenerativní onemocnění. (Aigner a kol., 2010).

První transgenní miniaturní prasata s uměle vneseným genem pro huntingtin byla vytvořena pomocí pronukleárních mikroinjekcí mutované huntingtonové cDNA (75 CAG repetice bylo uměle vloženo do exonu 1 této cDNA) derivované z miniaturních prasat pod kontrolou potkaního neuron specifického enolázového promotoru. Tato cDNA byla homologní s lidským genem zodpovědným za Huntingtonovu nemoc. V této práci autoři poprvé úspěšně demonstrovali tuto techniku na miniaturních prasatech. Úspěšnost byla určena na 1,24% (Uchida a kol., 2001).

Transgenní miniaturní prase s lidským mutovaným huntingtinem bylo vytvořeno také na tibetských miniaturních prasatech (Yang a kol., 2010). Tato prasata byla vytvořena metodou SCNT a exprimovali N-terminální konec (208 aminokyselin) lidského mutovaného huntingtinu s expandovaným polyglutaminovým traktem (105Q). Počet kopií transgenů byla určena na 3-4. Jenom jediné prase přežilo více jak měsíc, a v čase vydání publikace bylo 4 měsíce bez neurologických symptomů. V mozku uhynulých transgenních selat byl pozorován zvýšený počet apoptotických neuronů (DNA fragmentace, pozitivita na kaspázu 3).

V důsledku obrovské poptávky po vhodných velkých zvířecích modelech HN se Jan Motlík a jeho tým v Ústavu živočišné fyziologie a genetiky, Akademie věd České Republiky pokusili vytvořit transgenní miniaturní prasata nesoucí lidský mutovaný huntingtin (Zuccato a kol., 2010). V roce 2009 se metodou lentivirové transgeneze narodilo první sele exprimující N-terminální konec (548 aminokyselin) lidského mutovaného huntingtinu se 124 CAG/CAA

repeticemi. Počet kopií transgenu byl určen na 1-2, přičemž jejich lokalizace byla na dlouhém raménku chromozomu 1 (1q24-q25). Transgenní prasnička dala vzniknout F1 a F2 generaci, které také exprimují lidský mutovaný huntingtin. V současné době se tým profesora Motlíka snaží o vytvoření miniaturního prasete exprimujícího plnou délku lidského mutovaného huntingtinu.

Miniaturní prasata a ovce stále nabývají na důležitosti jako velké animální modely. Díky své velikosti, orgánové kapacitě a fyziologii podobné v několika aspektech lidem, jsou tato zvířata vhodná pro preklinické experimenty a dlouhodobé bezpečnostní studie (Zuccato a kol., 2010).

### 5.2.3 „Ne-savčí“ modely

Genetické manipulace u myši, potkanů, ovcí, miniaturních prasat a nehumánních primátů jsou nákladné a časově náročné. Kromě toho s používáním velkých zvířecích modelů mohou vyvstat etické otázky. Tyto důvody vyvolaly potřebu pro jednodušší, rychlejší (myšleno samozřejmě v čase), a levnější modely.

První příklad představují kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Krobisch a Lindquist (2000) vytvořili model modifikovaných kvasinkových buněk exprimující N-terminální fragment HTT s různou délkou polyQ repetice. I když jsou kvasinky jednobuněčné, jednoduchost a genetická manipulovatelnost systému poskytuje možnost studovat přírodní buněčné faktory, které stojí za mutací HN a umožňují vyhledávat potenciální terapeutické látky (Wang a Qin, 2006).

HN byla modelována také u bezobratlých - háďátka obecné (*Caenorhabditis elegans*), což je zavedený model pro vývojovou biologii. U této hlístice s HN byla zjištěna neurodegenerace závislá na věku a na délce polyglutaminového řetězce (Faber a kol., 1999). *C. elegans* umožňuje vývoj rychlých a levných in vivo analýz s cílem vyhodnotit účinnost mnoha potenciálních látek zjištěných v předběžných testech.

Mouchy, zejména octomilka obecná (*Drosophila melanogaster*), jsou vynikající volbou pro modelování neurodegenerativních onemocnění, protože mají plně funkční nervový systém. Srovnávací analýzy genomu ukazují, že nejméně 50% mušičích genů je podobných jako u lidí. Z doposud známých lidských genů, které souvisejí s HN má *Drosophila* 75%. (Wang a Qin, 2006). Nejdůležitější ovšem je, že u octomilky mohou být cizí geny manipulované a expresované ve specifické tkáni, časově regulovaným způsobem s ohromným množstvím genetických nástrojů, které jsou k dispozici. HN je jedním z prvních genetických



chorob, které byly modelovány na octomilce (Zuccato a kol., 2010). Exprese poly-Q zmnožených repetitivních NH<sub>2</sub>-terminálního fragmentu lidského huntingtinu vyústilo v progresivní neurodegeneraci oka mouchy, progresivní ztrátě motorické koordinace, a snížené životaschopnosti (Gunawardena a kol., 2003). Podobně jako u lidských příznaků, věk nástupu nemoci a síla degenerace neuronů korelovala s množstvím CAG repetitivních. Všechny tyto vlastnosti mušičích modelů HN jsou užitečné při zkoumání molekulárních mechanismů onemocnění, a také v oblasti strategie screeningu léčiv.

U nižších obratlovců byla HN modelována u ryb - Dánio pruhované (*Danio rerio*, mezi akvaristy známé i jako zebřička), která simuluje dva ústřední rysy lidské nemoci: toxicita je závislá na délce polyQ a vznik agregátů (Miller et al., 2005). Ačkoli tyto rysy jsou také snadno přítomné v jiných modelových systémech, embrya zebřiček poskytují určité výhody pro modelování polyQ nemocí: nemoci se u nich vyvíjejí rychle a externě, mohou být vyrobeny rychle ve velkých množstvích a jsou průhledné, což umožňuje přímou analýzu orgánů, tkání a fluorescenčně značených proteinů. Kromě toho mohou být modely HN na zebřičkách používány pro účely testování nových léčiv (Miller et al., 2005).

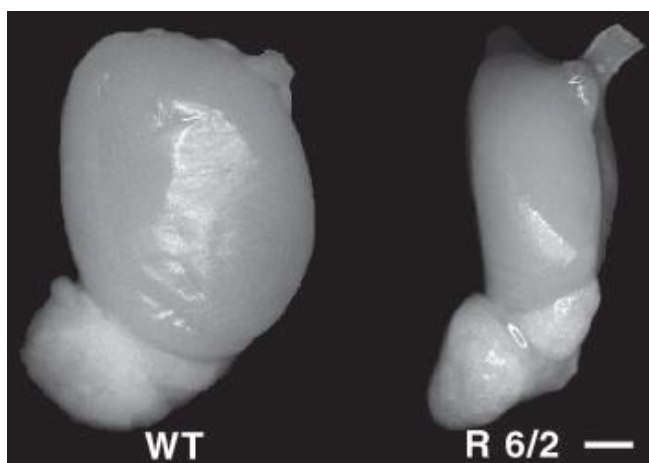
Ačkoli mnoho studií dokumentuje pozitivní aspekty spojené s ne-savčími modely, jsou tyto modely vzdálené od lidské patologie a riziko, že tyto molekulární cesty, které se používají, by mohly být velmi odlišné, by nemělo být podceňováno.

## 6. Patogeneze Huntingtonovy nemoci v samčích pohlavních orgánech

Jak bylo popsáno dříve, bílkovina huntingtin se u savců vyskytuje ve všech buňkách, přičemž její nejvyšší koncentrace jsou v mozku a varlatech, střední množství je pak přítomno v plicích, játrech, slezině, a nízká koncentrace se vyskytuje v srdci a ledvinách (Van Raamsdonk a kol., 2006; Walker, 2007).

Výzkum HN je primárně zaměřen na pochopení vlivu mutovaného HTT v mozku, ale ukazuje se, že k patologickým procesům dochází i v periferních orgánech. Do nedávna nebylo zcela jasné, zda jsou tyto změny primární, vyplývající z přímé toxicity mutovaného huntingtinu v periferních oblastech, nebo sekundární, plynoucí z neurodegenerace buněk vyskytujících se v mozku. Mezi periferními orgány v těle, vykazují samčí pohlavní orgány velmi podobné příznaky exprese genů jako v mozku.

Van Raamsdonk a kol. (2006) uvedl, že u myšího modelu YAC128 exprese mutovaného HTT způsobuje atrofii mozku a varlat, zatímco játra, ledviny, srdce a plíce nejsou ovlivněny. Již dříve byla popsána atrofie varlat i u myšího modelu R6/2, který exprimuje pouze první exon genu HN (Obr. 4.) (Papalexi a kol., 2005).



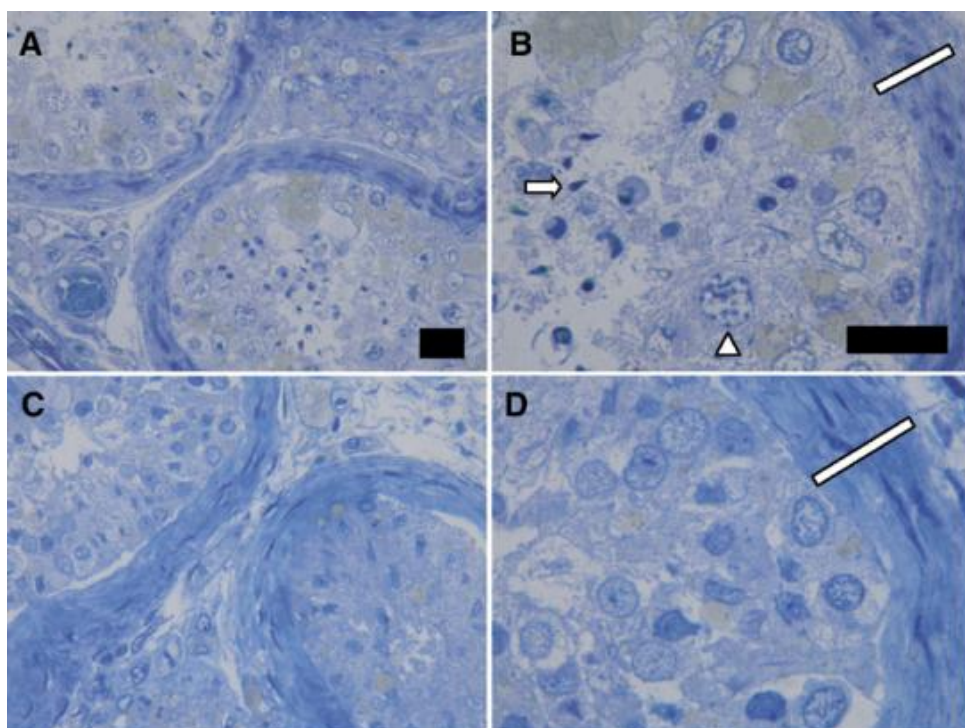
**Obr. 4.** Atrofie samčích reprodukčních orgánů myši R6/2 ve věku 12 týdnů a kontrolní „wild type“ myši (WT) (Papalexi a kol., 2005).

Papalexi a kol. (2005) ve své práci předpokládají, že patologické změny v hypotalamu snižují produkci gonadotropin uvolňujícího hormonu (GnRH), což způsobí poruchu syntézy

a vylučování luteinizačního a folikuloestimulačního hormonu (LH a FSH), což vede k atrofii reprodukčních orgánů. Snížená hladina testosteronu má za následek poškození spermatogeneze, což vede až k neplodnosti. To podporuje myšlenku, že testikulární patologické změny jsou sekundárním jevem toxického účinku mutantovaného huntingtinu v mozku. Potvrdit, nebo vyvrátit tuto domněnku a zjistit zda testikulární abnormality jsou rysem i u lidských pacientů se rozhodl tým kanadských vědců, kteří jako první popsali patologické testikulární abnormality při Huntingtonově nemoci (Van Raamsdonk a kol., 2007).

Použili k tomu vzorky od lidských pacientů postižených HN získané post-mortem a od nepostižených jako kontrolu. Zároveň na myších modelech YAC128 sledovali řadu dalších hodnot jako např. testikulární hmotnost, hladinu testosteronu v moči a plazmě, nebo počet a velikost GnRH-pozitivních neuronů v hypotalamu.

Vyšetření varlat osob s HN odhalilo jasný deficit spermatogeneze. Ve srovnání s kontrolní skupinou pacientů došlo k výraznému poklesu počtu spermatocytů a spermatid, a některá varlata pacientů s HN vykazovala úplnou absenci zárodečných buněk. Varlata pacientů s HN také měla výrazně tlustší stěny semenotvorných kanálků, než bylo pozorováno u kontrolních pacientů. Příčný řez pak ukázal, že semenotvorných kanálků bylo významně méně u pacientů s HN ve srovnání s kontrolními jedinci (Obr 5.)



**Obr. 5.** Varlata pacientů s HN (C,D) a nepostižené kontroly (A,B), zvětšení 40× (A, C) a 100× (B, D). Varlata s HN ukazují snížený počet vyvíjejících se spermií a tlustší stěnu semenotvorných kanálků. Šipka označuje spermatid. Trojúhelník ukazuje na spermie. Bílý pruh ukazuje stěnu semenotvorných kanálků. Černá je měřítko 10 mikronů. (Van Raamsdonk a kol., 2007)

Při vyhodnocování závažnosti testikulární patologie na základě počtu spermatid, počtu spermatocytů, na tloušťku stěny kanálku a příčného průřezu semenotvorných kanálků, se zjistilo, že vzorek s nejdelším opakováním CAG sekvence má nejzávažnější patologické změny, včetně úplné absence spermatid. To potvrzuje obecnou teorii, že závažnost patologických změn ve varlatech a mozku je ovlivněn velikostí polyglutaminové expanze a nesouvisí s věkem při úmrtí nebo s dobou trvání nemoci.

Aby bylo možné prokázat, že tyto změny varlat jsou specifické pro HN a nejsou obecným rysem osob s neurodegenerativním onemocněním, byla zkoumána i varlata od pacientů s amyotrofickou laterální sklerózou (ALS). Tato skupina pacientů však vykazovala stejné hodnoty na počet spermií a tloušťku stěn semenotvorných kanálků jako u kontrolních pacientů. Tím bylo potvrzeno, že testikulární abnormality nejsou jen projevem myších modelů, ale vyskytují se i u lidské populace a jsou specifické pro Huntigtonovu nemoc.

Metodou Western blot analýzy vědci dále zjišťovali, které konkrétní populace buněk ve varlatech vyjadřují vysokou úroveň HTT. Western blot ukázal, že HTT je vysoce vyjádřený v zárodečných buňkách a v Sertoliho buňkách.

Z moče a krevní plazmy myši se vědci rozhodli sledovat hladiny testosteronu a její časový průběh, za účelem zjistit, zda tyto hladiny testosteronu byly sníženy před testikulární degenerací. Hladinu testosteronu řídí osa hypotalamus - hypofýza – gonády. Hypotalamus uvolní gonadotropin uvolňující hormon (GnRH), který stimuluje uvolňování luteinizačního hormonu (LH) a folikulostimulačního hormonu (FSH) z předního laloku hypofýzy. Následně LH stimuluje Leydigovy buňky ve varlatech, které produkují testosteron, a spolu s FSH stimuluje LH vývoj spermií v Sertoliho buňkách.

Úbytek buněk hypotalamu v kombinaci se snížením hladiny LH a testosteronu u pacientů s HN vedlo k teorii, že testikulární patologie je sekundární jev poškození hypotalamu. Pokud by tomu tak bylo, pak by měl nástup hypotalamických škod předcházet testikulární degeneraci. K řešení této otázky použili vědci myši model YAC128, který umožňuje sledovat časový průběh změn v ose hypotalamus - hypofýza – gonády.

Aby zjistili věk nástupu testikulární atrofie a degenerace, měřili hmotnosti varlat u myší ve věku 3, 6, 9 a 12 měsíců a zkoumali jejich morfologii. U myší ve věku 3,6 a 9 měsíců nebyly v testikulární hmotnosti pozorovány žádné významné rozdíly. Po 12 měsících však varlata od myší YAC128 vážily podstatně méně než varlata od WT myší. Morfologické abnormality a ztráty zárodečných buněk byly pozorovány také až u myší ve stáří 12 měsíců. Prokázalo se tedy, že k testikulární degeneraci u myší YAC128 dochází mezi 9. a 12. měsícem věku.

Naměřené hladiny testosteronu v moči u myší YAC128 však nebyly významně odlišné od WT myší ve 3, 6, 9 nebo 12 měsících věku. Stejně výsledky vykazovaly i hladiny testosteronu v krevní plazmě. Absence změn hladiny testosteronu ve věku, kdy dochází k testikulární degeneraci ukazuje, že funkce Leydigových buněk ve varlatech, které jsou odpovědné za produkci testosteronu, a které jsou řízeny hormony hypotalamu, není poškozená, což naznačuje možnost, že testikulární vada vzniká ve varlatech, a ne v mozku.

Tuto hypotézu podpořily i další výsledky na počet a velikost GnRH-pozitivních neuronů v hypotalamu u YAC128 a WT myší. Myši YAC128 ve stáří 12 měsíců nevykazovali žádné významné ztráty GnRH-pozitivních neuronů ve srovnání s WT. Měřením neuronů na příčném řezu nebyla zaznamenána ani žádná změna ve velikosti. Výsledky potvrdily, že testikulární degenerace u myší YAC128 se vyskytuje ve věku, kdy je počet a velikost GnRH-pozitivních neuronů normální.

Časový průběh testikulární atrofie, hladiny testosteronu a GnRH-pozitivních neuronů v myším modelu YAC128 HN naznačuje, že tyto abnormality vyplývají z primárního účinku mutovaného genu HTT ve varlatech.

Primární defekt ve varlatech vyvolává otázku, proč jsou mozek a varlata nejvíce postiženými orgány v HN, a zda existují společné patogenní mechanismy, které vedou k degeneraci. Pochopení patogeneze HN ve varlatech může odhalit společné kritické cesty, které vedou k degeneraci jak v mozku, tak v samčích pohlavních orgánech (Van Raamsdonk a kol., 2007).

## 7. Závěr

Z přehledu výše uvedeného vyplývá, že jsou k dispozici mnohé modely Huntingtonovy nemoci, ale model, který reprodukuje plnou konstelaci změn, které tvoří charakteristický neuropatologický fenotyp pozorován u lidí s Huntingtonovou nemocí, stále chybí. Každý model má své výhody a omezení. Proto výběr konkrétního modelu závisí na otázce, která je předmětem zkoumání.

Modely HN založené na toxinech mají stále roli při zkoumání přístupů náhrady buněk u HN, ale většina experimentálních hypotéz, a to zejména těch, které zahrnují léčebné zásahy, vyžadují přístup na genetickém modelu, jehož volba je opět silně závislá na výzkumné otázce.

Nižší organismy nám nabízejí příležitost pro genetické analýzy. Savčí modely jsou zvláště užitečné pro objasnění aspektů onemocnění, které se vztahují k patologickým procesům v mozku, které nelze pozorovat na in vitro modelech nebo nižších organismech.

Užitečnost zvířecích genetických modelů je neocenitelná pro pochopení patologických mechanismů HN a pro možnost navrhnout nové způsoby léčby. Poslední pokrok v základním výzkumu a klinické oblasti dává naději na rozvoj účinné léčby v blízké budoucnosti.

## 8. Seznam literatury

- Aigner, B., Renner, S., Kessler, B., Klymiuk, N., Kurome, M., Wunsch, A., Wolf, E. 2010. Transgenic pigs as models for translational biomedical research. *Journal of Molecular Medicine* 88. 653–664.
- Benn, C.L., Slow, E.J., Farrell, L.A., Graham, R., Deng, Y., Hayden, M.R., Cha, J.H. 2007. Glutamate receptor abnormalities in the YAC128 transgenic mouse model of Huntington's disease. *Neuroscience* 147. 354–372.
- Brouillet, E., Conde, F., Beal, M.F., Hantraye, P. 1999. Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals. *Progress in Neurobiology* 59. 427–468.
- Buehr, M., Meek, S., Blair, K., Yang, J., Ure, J., Silva, J., McLay, R., Hall, J., Ying, Q.L., Smith, A. 2008. Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts. *Cell* 135. 1287–1298.
- Carter, R.J., Lione, L.A., Humby, T., Mangiarini, L., Mahal, A., Bates, G.P., Dunnett, S.B., Morton, A.J. 1999. Characterization of progressive motor deficits in mice transgenic for the human Huntington's disease mutation. *Journal of Neuroscience* 19. 3248–3257.
- Černý, J. Genetické zaměřování. 2008. *Vesmír* 87.196-197.
- Conti, L., Cattaneo, E. 2010. Neural stem cell system: physiological players or in vitro entities? *Nature Reviews. Neuroscience* 11. 176–187.
- Davies, S.W., Turmaine, M., Cozens, B.A., DiFiglia, M., Sharp, A.H., Ross, C.A., Scherzinger, E., Wanker, E.E., Mangiarini, L., Bates, G.P. 1997. Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell* 90. 537–548.
- De Almeida, L.P., Ross, C.A., Zala, D., Aebischer, P., Deglon, N. 2002. Lentiviral-mediated delivery of mutant huntingtin in the striatum of rats induces a selective neuropathology

modulated by polyglutamine repeat size, huntingtin expression levels, and protein length. *Journal of Neuroscience* 22. 3473–3483.

Faber, P.W., Alter, J.R., MacDonald, M.E., Hart, A.C. 1999. Polyglutaminemediated dysfunction and apoptotic death of a *Caenorhabditis elegans* sensory neuron. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 96. 179–184.

Fulka, J. Jr., Syková, E., Fulková, H., Motlík, J. 2000. Klonování reprodukční a terapeutické. *Vesmír* 79. 127-129.

Geurts, A.M., Cost, G.J., Freyvert, Y., Zeitler, B., Miller, J.C., Choi, V.M., Jenkins, S.S., Wood, A., Cui, X., Meng, X., Vincent, A., Lam, S., Michalkiewicz, M., Schilling, R., Foeckler, J., Kalloway, S., Weiler, H., Ménoret, S., Anegón, I., Davis, G.D., Zhang, L., Rebar E.J., Gregory, P.D., Urnov F.D., Jacob, H.J., Buelow, R. 2009. Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. *Science*. 325(5939). 433.

Gray, M., Shirasaki, D.I., Cepeda, C., Andre, V.M., Wilburn, B., Lu, X.H., Tao, J., Yamazaki, I., Li, S.H., Sun, Y.E., Li, X.J., Levine, M.S., Yang, X.W. 2008. Full-length human mutant huntingtin with a stable polyglutamine repeat can elicit progressive and selective neuropathogenesis in BACHD mice. *Journal of Neuroscience* 28. 6182–6195.

Gunawardena, S., Her, L.S., Bruschi, R.G., Laymon, R.A., Niesman, I.R., Gordesky-Gold, B., Sintasath, L., Bonini, N.M., Goldstein, L.S. 2003. Disruption of axonal transport by loss of huntingtin or expression of pathogenic polyQ proteins in *Drosophila*. *Neuron* 40. 25–40.

Hickey, M.A., Kosmalka, A., Enayati, J., Cohen, R., Zeitlin, S., Levine, M.S., Chesselet, M.F. 2008. Extensive early motor and non-motor behavioral deficits are followed by striatal neuronal loss in knock-in Huntington's disease mice. *Neuroscience* 157. 280–295.

Hodgson, J.G., Agopyan, N., Gutekunst, C.A., Leavitt, B.R., LePiane, F., Singaraja, R., Smith, D.J., Bissada, N., McCutcheon, K., Nasir, J., Jamot, L., Li, X.J., Stevens, M.E., Rosemond, E., Roder, J.C., Phillips, A.G., Rubin, E.M., Hersch, S.M., Hayden, M.R. 1999. A YAC mouse model for Huntington's disease with full-length mutant huntingtin, cytoplasmic toxicity, and selective striatal neurodegeneration. *Neuron* 23. 181–192.



Hofmann, A., Kessler, B., Ewerling, S., Weppert, M., Vogg, B., Ludwig, H., Stojkovic, M., Boelhauve, M., Brem, G., Wolf, E., Pfeifer, A. 2003. Efficient transgenesis in farm animals by lentiviral vectors. *EMBO reports* 4. 1054-1060.

Ishiguro, H., Yamada, K., Sawada, H., Nishii, K., Ichino, N., Sawada, M., Kurosawa, Y., Matsushita, N., Kobayashi, K., Goto, J., Hashida, H., Masuda, N., Kanazawa, I., Nagatsu, T. 2001. Age-dependent and tissue-specific CAG repeat instability occurs in mouse knock-in for a mutant Huntington's disease gene. *Journal of Neuroscience Research* 65. 289–297.

Jacobsen, J.C., Bawden, C.S., Rudiger, S.R., McLaughlan C.J., Reid, S.J., Waldvogel H.J., MacDonald, M.E., Gusella J.F., Walker, S.K., Kelly J.M., Webb G.C., Faull R.L.M., Rees M.I., Snell, R.G. 2010. An ovine transgenic Huntington's disease model. *Human Molecular Genetics* 19. 1873–1882.

Krobitsch, S., Lindquist, S. 2000. Aggregation of huntingtin in yeast varies with the length of the polyglutamine expansion and the expression of chaperone proteins. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 97. 1589–1594.

Laforet, G.A., Sapp, E., Chase, K., McIntyre, C., Boyce, F.M., Campbell, M., Cadigan, B.A., Warzecki, L., Tagle, D.A., Reddy, P.H., Cepeda, C., Calvert, C.R., Jokel, E.S., Klapstein, G.J., Ariano, M.A., Levine, M.S., DiFiglia, M., Aronin, N. 2001. Changes in cortical and striatal neurons predict behavioral and electrophysiological abnormalities in a transgenic murine model of Huntington's disease. *Journal of Neuroscience* 21. 9112–9123.

Lin, C.H., Tallaksen-Greene, S., Chien, W.M., Cearley, J.A., Jackson, W.S., Crouse, A.B., Ren, S., Li, X.J., Albin, R.L., Detloff, P.J. 2001. Neurological abnormalities in a knock-in mouse model of Huntington's disease. *Human Molecular Genetics* 10. 137–144.

McGeer, E.G., McGeer, P.L. 1976. Duplication of biochemical changes of Huntington's chorea by intrastriatal injections of glutamic and kainic acids. *Nature* 263. 517–519.

Miller, V.M., Nelson, R.F., Gouvion, C.M., Williams, A., Rodriguez-Lebron, E., Harper, S.Q., Davidson, B.L., Rebagliati, M.R., Paulson, H.L. 2005. CHIP suppresses polyglutamine aggregation and toxicity in vitro and in vivo. *Journal of Neuroscience* 25. 9152–9161.

Papalexí, E., Persson, A., Bjorkqvist, M., Petersen, A., Woodman, B., Bates, G.P., Sundler, F., Mulder, H., Brundin, P., Popovic, N., 2005. Reduction of GnRH and infertility in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *European Journal of Neuroscience*. 22, 1541–1546.

Park, I.H., Arora, N., Huo, H., Maherali, N., Ahfeldt, T., Shimamura, A., Lensch, M.W., Cowan, C., Hochedlinger, K., Daley, G.Q. 2008. Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* 134. 877–886.

Petr, J. 2000. Transgenová hospodářská zvířata. *Vesmír* 79. 514-517.

Reddy, P.H., Williams, M., Charles, V., Garrett, L., Pike-Buchanan, L., Whetsell, W.O. Jr., Miller, G., Tagle, D.A. 1998. Behavioral abnormalities and selective neuronal loss in HD transgenic mice expressing mutated full-length HD cDNA. *Nature Genetics* 20. 198–202.

Rémy, S., Tesson, L., Ménoret, S., Usal, C., Scharenberg, A.M., Anegón, I. 2010. Zinc-finger nucleases: a powerful tool for genetic engineering of animals. *Transgenic Research*. 19(3). 363-371.

Roth, J., Klempíř, J., Židovská, J. 2006. Huntingtonova nemoc. *Postgraduální medicína* 5. 517-522.

Schilling, G., Becher, M.W., Sharp, A.H., Jinnah, H.A., Duan, K., Kotzuk, J.A., Slunt H.H., Ratovitski, T., Cooper, J.K., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Price, D.L., Ross, C.A., Borchelt, D.R. 1999. Intranuclear inclusions and neuritic aggregates in transgenic mice expressing a mutant NH2-terminal fragment of huntingtin. *Human Molecular Genetic* 8. 397–407.

Shelbourne, P.F., Killeen, N., Hevner, R.F., Johnston, H.M., Tecott, L., Lewandoski, M., Ennis, M., Ramirez, L., Li, Z., Iannicola, C., Littman, D.R., Myers, R.M. 1999. A Huntington's disease CAG expansion at the murine *Hdh* locus is unstable and associated with behavioural abnormalities in mice. *Human Molecular Genetic* 8. 763–774. 1999.

- Sipione, S., Cattaneo, E. 2001. Modeling Huntington's disease in cells, flies, and mice. *Molecular Neurobiology* 23. 21–51.
- Slow, E.J., Graham, R.K., Osmand, A.P., Devon, R.S., Lu, G., Deng, Y., Pearson, J., Vaid, K., Bissada, N., Wetzel, R., Leavitt, B.R., Hayden, M.R. 2005. Absence of behavioral abnormalities and neurodegeneration in vivo despite widespread neuronal huntingtin inclusions. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 102. 11402–11407.
- Takahashi, K., Yamanaka, S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126(4). 663-676.
- Tanaka, Y., Igarashi, S., Nakamura, M., Gafni, J., Torcassi, C., Schilling, G., Crippen, D., Wood, J.D., Sawa, A., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Borchelt, D.R., Ross, C.A., Ellerby, L.M. 2006. Progressive phenotype and nuclear accumulation of an amino-terminal cleavage fragment in a transgenic mouse model with inducible expression of full-length mutant huntingtin. *Neurobiology Disease* 21. 381–391.
- Uchida, M., Shimatsu, Y., Onoe, K., Matsuyama, N., Niki, R., Ikeda, J.E., Imai, H. 2001. Production of transgenic miniature pigs by pronuclear microinjection. *Transgenic Research*. 10(6). 577-82.
- Van Raamsdonk, J.M., Murphy, Z., Slow, E.J., Leavitt, B.R., Hayden, M.R. 2005. Selective degeneration and nuclear localization of mutant huntingtin in the YAC128 mouse model of Huntington disease. *Human Molecular Genetics* 14. 3823–3835.
- Van Raamsdonk, J.M., Gibson, W.T., Pearson, J., Murphy, Z., Lu, G., Leavitt, B.R., Hayden, M.R., 2006. Body weight is modulated by levels of full-length Huntingtin. *Human Molecular Genetics*. 15, 1513–1523.
- Van Raamsdonk, J.M., Murphy, Z., Selva D.M., Hamidizadeh, R., Pearson, J., Petersén, A., Björkqvist, M., Muir, C., Mackenzie, I.R., Hammond, G. L., Wayne Vogl, A., Hayden, M. R., Leavitt, B. R. 2007. Testicular degeneration in Huntington disease. *Neurobiology of Disease* 26. 512–520.

Von Horsten, S., Schmitt, I., Nguyen, H.P., Holzmann, C., Schmidt, T., Walther, T., Bader, M., Pabst, R., Kobbe, P., Krotova, J., Stiller, D., Kask, A., Vaarmann, A., Rathke-Hartlieb, S., Schulz, J.B., Grasshoff, U., Bauer, I., Vieira-Saecker, A.M., Paul, M., Jones, L., Lindenberg, K.S., Landwehrmeyer, B., Bauer, A., Li, X.J., Riess, O. 2003. Transgenic rat model of Huntington's disease. *Human Molecular Genetics*. 12. 617–624.

Walker, F.O. 2007. Huntington's disease. *Lancet* 369. 218–228.

Wang, L.H., Qin, Z.H. 2006. Animal models of Huntington's disease: implications in uncovering pathogenic mechanisms and developing therapies. *Acta Pharmacologica Sinica* 27(10). 1287-1302.

West, F.D., Uhl, E.W., Liu, Y., Stowe, H., Lu, Y., Yu, P., Gallegos-Cardenas, A., Pratt, S.L., Stice, S.L. 2011. Brief report: chimeric pigs produced from induced pluripotent stem cells demonstrate germline transmission and no evidence of tumor formation in young pigs. *Stem Cells* 29(10). 1640-1643.

Wheeler, V.C., White, J.K., Gutekunst, C.A., Vrbanac, V., Weaver, M., Li, X.J., Li, S.H., Yi, H., Vonsattel, J.P., Gusella, J.F., Hersch, S., Auerbach, W., Joyner, A.L., MacDonald, M.E. 2000. Long glutamine tracts cause nuclear localization of a novel form of huntingtin in medium spiny striatal neurons in HdhQ92 and HdhQ111 knock-in mice. *Human Molecular Genetics*. 9. 503–513.

Yamamoto, A., Lucas, J.J., Hen, R. 2000. Reversal of neuropathology and motor dysfunction in a conditional model of Huntington's disease. *Cell* 101. 57–66.

Yang, D., Wang, C.E., Zhao, B., Li, W., Ouyang, Z., Liu, Z., Yang, H., Fan, P., O'Neill, A., Gu, W., Yi, H., Li, S., Lai, L., Li, X.J. 2010. Expression of Huntington's disease protein results in apoptotic neurons in the brains of cloned transgenic pigs. *Human Molecular Genetic* 19(20). 3983-3994.

Yang, S.H., Cheng, P.H., Banta, H., Piotrowska-Nitsche, K., Yang, J.J., Cheng, E.C., Snyder, B., Larkin, K., Liu, J., Orkin, J., Fang, Z.H., Smith, Y., Bachevalier, J., Zola, S.M., Li, S.H.,

Li, X.J., Chan, A.W. 2008. Towards a transgenic model of Huntington's disease in a non-human primate. *Nature* 453. 921–924.

Zuccato, C., Valenza, M., Cattaneo, E. 2010. Molecular Mechanisms and Potential Therapeutical Targets in Huntington's Disease. *Physiological Reviews* 90. 905–981.

### **Elektronické zdroje:**

Petr, J. 2003. Transgenní zvířata. [online] 9. 11. 2003 [cit. 2011-10-18]. Dostupné z <http://www.osel.cz/index.php?obsah=6&clanek=463>

Petr, J. 2007. Nobelova cena za genový knockout. [online] 10. 10. 2007 [cit. 2011-11-15]. Dostupné z <http://www.osel.cz/index.php?clanek=2994>

Roth, J., Uhrová, T., Židovská, J. 2008. Huntingtonova nemoc – základní informace. [online] Společnost pro pomoc při Huntingtonově chorobě. [cit. 2011-03-15]. Dostupné z [http://www.huntington.cz/soubory/huntingtonova\\_nemoc.pdf](http://www.huntington.cz/soubory/huntingtonova_nemoc.pdf)