

Huntingtonova choroba a zvířecí modely

Huntingtonova choroba (Huntington's disease, HD) je progresivní dědičné neurodegenerativní onemocnění člověka s nástupem až v dospělosti. Projevuje se mimovolnými pohyby, poruchami chování a kognitivních funkcí. Je způsobeno expanzí (zmožením) repetice bázi cytozin-adenin-guanin (CAG) v genu pro protein huntingtin, který je exprimován ve většině tkání. Nemoc charakterizuje především rozsáhlá degenerace buněk centrální nervové soustavy, ale mutace má velký vliv i na další orgány a tkáně. Mechanismy těchto změn nejsou stále dostatečně popsány. Jednu z nezbytných součástí výzkumu Huntingtonovy choroby představují zvířecí modely.

Z historie

První záznamy hovořící ještě o „taneční máni“ pocházejí z r. 1374. Zpočátku byly tyto religiózní extáze spojeny s kletbou svatého, většinou sv. Víta – od toho se onemocnění pojí s názvem tanec sv. Víta. Paracelsus v 15. stol. mimovolní pohyby doprovázející tuto nemoc pojmenoval chorea (z řeckého chorea – tanec, obr. 1 a 2). V 17. stol. anglický lékař Thomas Sydenham jako první podal ucelený klinický popis choreatických pohybů, ale až v 19. stol. americký lékař George Huntington popsal základní rysy choroby, jako jsou: manifestace v dospělosti, progresivní průběh s fatálním koncem a choreatické pohyby kombinované s mentálním postižením (práci On Chorea publikoval 13. dubna 1872 v periodiku Medical and Surgical Reporter of Philadelphia – Lékařský a chirurgický zpravodaj Filadelfie).

Jelikož jde o dědičné onemocnění, během první poloviny 20. stol. vznikly podrobné rodokmeny rodin trpících Huntingtonovou

chorobou. V r. 1911 C. B. Davenport podal přesvědčivé důkazy o autozomálně dominantním způsobu přenosu (viz dále). Studium populace obyvatel okolo zálivu Maracaibo ve Venezuele vedlo k objevu mutace v genu původně nazvaném HD gen, který v r. 1983 James F. Gusella (Massachusetts General Hospital a Harvard Medical School, Boston) identifikoval jako gen *IT15* kódující protein huntingtin. Gen *IT15* lokalizoval na krátké raménko chromozomu 4 (obr. 3). V r. 1993 byla objasněna podstata mutace podmiňující vznik nemoci – zmožení trinukleotidu (tripletu) CAG (Huntington's Disease Collaborative Research Group 1993). Tento fakt otevřel dveře studiu HD pomocí zvířecích modelů.

Co způsobuje Huntingtonovu chorobu

Onemocnění přechází z rodičů na děti prostřednictvím genové mutace. V důsledku výše zmíněného autozomálně dominantního charakteru této nemoci je pravděpodobnost přenosu na potomky 50% (viz

obr. 6). Příčinu známe již přes 20 let – jde o mutaci ve zmíněném genu *IT15* kódujícím protein huntingtin (Htt), konkrétně v prvním exonu, hned zpočátku výsledného proteinu (oblast od aminokyseliny 18). V tomto místě se nachází repetice glutaminů (opakování trojice nukleotidů CAG kódující glutamin) často nazývaná jen polyglutamin. Polyglutamin je nechvalně známý pro své časté mutace, které stojí za řadou chorob (např. některé spinocerebelární ataxie – vzácné dědičné neurodegenerativní onemocnění, rovněž způsobené expanzí CAG tripletů proteinu, ataxinu-7; pacienti mohou mít choreu, snížení kognitivních funkcí a poruchy chování odpovídající HD – proto se v literatuře píše i o tzv. fenokopii Huntingtonovy choroby). Tato sekvence má totiž expanzivní sklony. DNA polymeráza při kopírování genomu v tomto místě občas „klouže“, prodlužuje uvedenou repetici a tím dochází k případům nezděděného výskytu HD, tedy *de novo*. Nejčastěji se sekvence polyglutaminů prodlužuje při vývoji spermií otce.

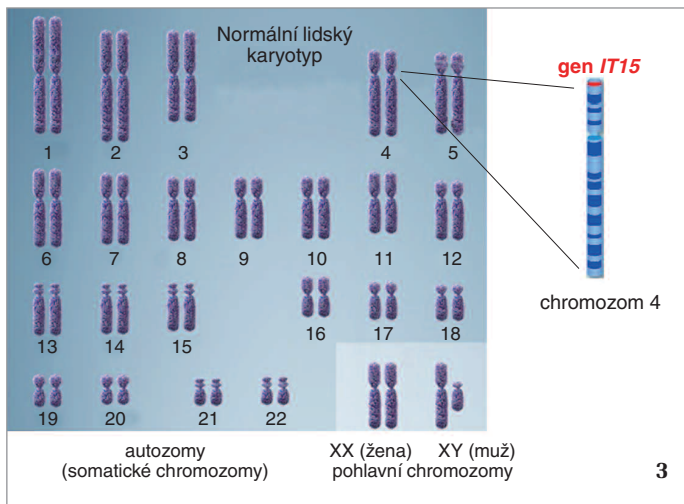
Formy a projevy

Huntingtonova choroba postihuje 4–10 obyvatel ze 100 tisíc. U zdravých jedinců nacházíme 6–35 (nejčastěji do 27) opakování tripletu CAG, při prodloužení nad 40 CAG dojde k 100% projevu onemocnění. První příznaky se obvykle dostaví ve věku mezi 35–50 lety. Čím je počet CAG opakování vyšší, tím dříve nemoc propukne. Vzácně se projeví i v dětství a dospívání či později ve stáří. První změny chování, kognitivních funkcí a méně nápadné poruchy motoriky lze však pozorovat 10–15 let před stanovením klinického počátku nemoci.

Chorobu provází rozsáhlá degenerace mozku, především v bazálních gangliích, zejména v striatu (nucleus caudatus a putamen), které se podílí na řízení svalového napětí, stability, stoje, chůze a dalších volných pohybů (obr. 4). Rovněž je ovlivněna mozková kůra, která ovládá myšlení, chování a kognitivní funkce, např. paměť. Z projevů zaznamenáme jako nejvýraznější mimovolní pohyby, tzv. choreu. Nastávají problémy s polykáním a u některých pa-



1 a 2 Nejnápadnějším příznakem Huntingtonovy choroby (HD) jsou choreatické pohyby, které nastávají proti vůli nemocného. Jde o rychlé, neohrabané a nekoordinované pohyby opakující se v jednom nebo více svalech. Tyto mimovolní pohyby nejsou zpočátku nápadné. Občasný tik na tváři nebo grimasa, náhlý pohyb prstů, nohy – to všechno může signalizovat nástup nemoci. Ilustrace pocházejí z lékařských učebnic používaných před druhou světovou válkou. Z archivu autorů



3 Schéma normálního lidského karyotypu s detailem chromozomu 4, na kterém leží gen *IT15*. Upraveno podle: Genetics Home Reference, v souladu s podmínkami pro použití (<http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/illustrations/normalkaryotype>)

4 Jádra zapojená do okruhů bazálních ganglií v lidském mozku

5 Zjednodušená struktura proteinu huntingtinu (Htt). Blíže v textu. Orig. D. Pallová

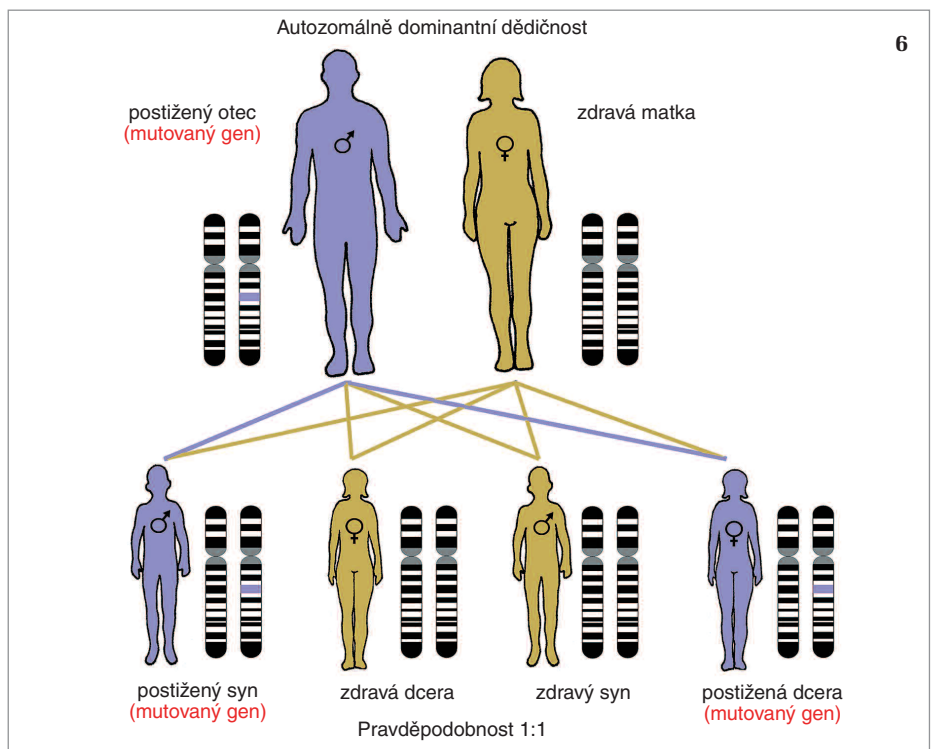
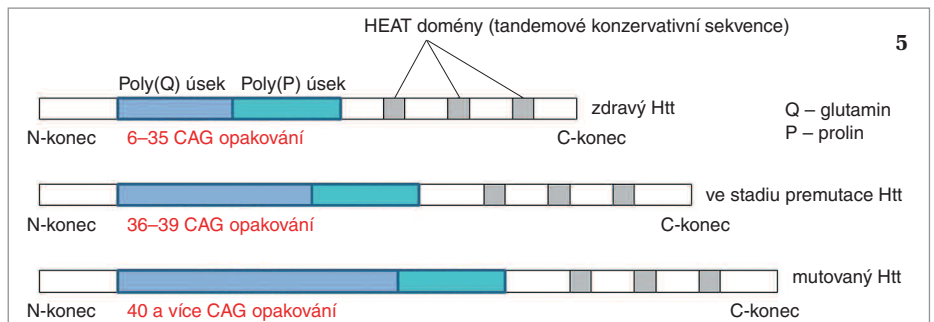
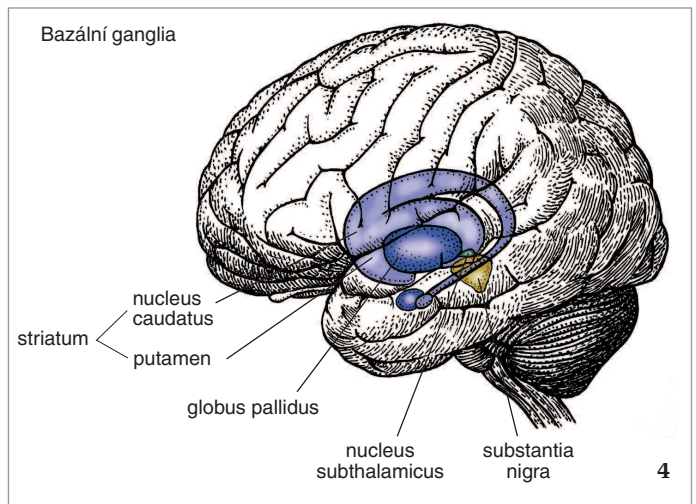
6 Schéma autozomálně dominantní dědičnosti. Postižený otec je heterozygotní pro dominantní alelu. Každé dítě, které získá dominantní alelu pro HD, bude ovlivněno onemocněním. Od otce ji dostane s 50% pravděpodobností. Obr. 4 a 6 podle materiálů z archivu autorů kreslila M. Chumchalová

cientů také s řečí. Nemocní trpí psychickými obtížemi: úzkostí, depresí, podrážděností, agresivitou, apatií. Obtížně dělají jednoduchá rozhodnutí, zhoršuje se jim paměť a může se rozvíjet demence. Jsou zahleněni a mají potíže s dýcháním. Nemoc většinou trvá 10–20 let. Mezi časté příčiny úmrtí patří obecné infekční komplikace – pneumonie, selhání srdce, uroseps (infekce pronikající do krevního oběhu z močových cest), nepohyblivost, podvýživa, ale i sebevraždy či pád, který způsobí zranění (subdurální hematom, kraniocerebrální trauma nebo zlomeninu, jež pacienta upoutá na lůžko).

Léčba a patogeneze

V současnosti neexistuje žádná léčba, která by zastavila nebo zvrátila průběh tohoto onemocnění. Mohou být použity léky upravující emocionální a pohybové problémy spojené s HD, je však důležité mít na paměti, že se tím pomáhají udržet klinické příznaky pod kontrolou, i když pouze určitou dobu, ale neléčí se samotná choroba.

Mechanismus vzniku a vývoje poškození (patogeneze) není zcela objasněn, ale existuje několik teorií. Jedna z nich uvádí, že se buňky ve skutečnosti zabíjejí samy, a to v důsledku chemických změn vyvolaných HD. Předpokládá se, že onemocnění spouští předčasnou smrt neuronů urychlením apoptózy – vědci zkoumají, zda k tomu dochází přítomností pozměněného huntingtinu. Vložili lidský mutovaný HD gen myším, aby mohli studovat osud jejich nervových buněk. Zjistili, že se



u myši vyskytují rovněž shluky proteinu Htt (agregáty), stejně jako v nervových buňkách pacientů s HD. Další studie ukázaly, že agregáty ve skutečnosti obsahují jen část změněného Htt, z něhož se tedy pravděpodobně v určitém okamžiku odštěpila část s mutovaným polyglutaminem. Vznikají tak cytotoxické fragmenty proteinu, které končí jako agregáty v buňkách jádře.

Struktura a funkce huntingtinu

Protein Htt má molekulovou hmotnost kolem 348 kDa a délku asi 3 144 aminokyselin, což závisí na počtu CAG opaková-

ní. Co se týče struktury, obsahuje několik oblastí, a to N-terminální část (17 aminokyselin), Poly(Q) úsek, Poly(P) úsek, C-konec a tzv. HEAT domény (obr. 5). Huntingtin se nachází v každé buňce našeho těla. Již jsme uvedli, že vyřazení genu pro tento protein není sluchitelné se životem, pro organismus je Htt nepostradatelný. Jeho přesné funkce však zatím neznáme. Zasahuje např. do buněčného transportu, mitochondriálních funkcí, synaptického přenosu a také do exprese jiných proteinů. K nejdůležitějším z nich patří mozkový neurotrofický faktor (BDNF, brain-derived neurotrophic factor), jež se účastní přenosu

látek uvnitř neuronu, ovlivňuje adaptaci na poškození a oxidační stres, rovněž má antiapoptický účinek (ovlivňuje buněčnou smrt). Huntingtin je ale významný nejen pro centrální nervovou soustavu, účastní se také hematopoézy (krvetočiny) nebo působí na vývoj plodu.

Zvířecí modely Huntingtonovy choroby

Přestože se nemoc intenzivně studuje po celém světě a stále více se dozvídáme o buněčné degeneraci a dalších patologických procesech, účinná léčba zůstává v nedohlednu. Dobře popsaná mutace podmiňující rozvoj HD otevírá jedinečnou možnost (na rozdíl od jiných neurodegenerativních onemocnění) studovat tuto chorobu na zvířecích modelech. Gen kódující Htt je v evoluci velmi konzervovaný a v všech obratlovcích. Zavedení mutace podmiňující vznik HD do genomu nejrůznějších živočichů vede k rozvoji příznaků připomínajících onemocnění u lidí. Vědci vkládají právě do zvířecích modelů naděje na objev způsobu, jak opravit nebo zastavit proces odumírání nervových buněk. Modelové organismy zároveň poskytují nenahraditelný prostředek pro testování bezpečnosti nových léčebných přístupů. Od identifikace mutace genu způsobujícího HD bylo vyvinuto množství zvířecích modelů. Často kladená otázka ale zní: který z nich nejlépe napodobuje průběh nemoci u člověka?

● Vybrané myší modely HD:

R6/2 myši

Prvním (vytvořen v r. 1996), nejpoužívanějším a nejvíce probádaným modelem je linie transgenních myši R6/2 nesoucí repetici se 144 tripletů CAG. Vznikla tak, že do myšího genomu byl vpraven 1,9 kb velký fragment, který se skládal ze sekvence promotoru a prvního exonu lidského genu *IT15* (nesoucího prodlouženou repetici CAG). Vzhledem k extrémní délce CAG opakování jsou projevy HD velmi výrazné a nastupují už okolo 9–11 týdnů stáří myši, ke smrti dochází v 10.–13. týdnu. Stejně jako HD pacienti, tak i R6/2 myši vykazují progresivní motorický deficit, byl u nich pozorován rychlý úbytek hmotnosti. Kvůli nepřírozeně dlouhé repetici, rychlosti rozvoje HD a krátkému životu zvířat však bývá tento model kritizován jako zdroj mnoha artefaktů.

R6/1 myši

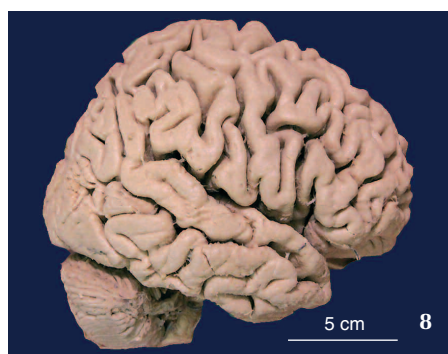
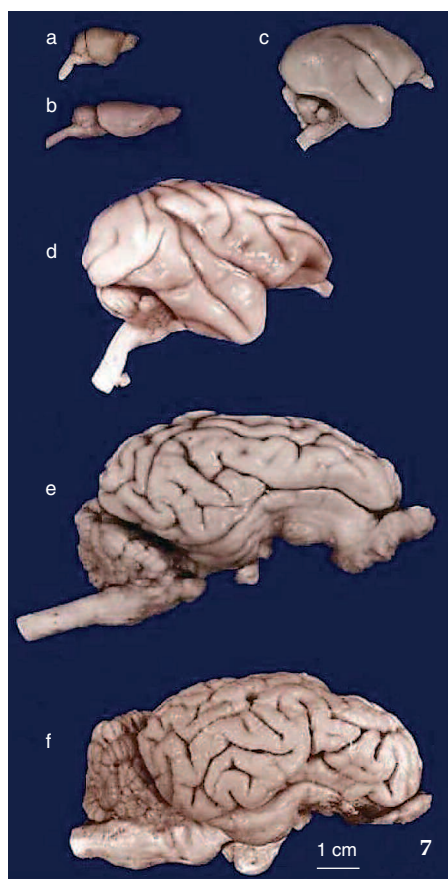
Metoda jejich přípravy byla stejná jako u R6/2 myši, patří shodně mezi tzv. linie R6. Linie R6/1 v genomu nese menší počet CAG repetic než u R6/2, konkrétně 116. Proto pozorujeme u R6/1 myši pozdější nástup nemoci a delší dobu přežívání.

N171-82Q myši

Jde o kmen transgenních myši exprimujících 171 N-terminálních aminokyselin lidského huntingtinu pod kontrolou myšího promotoru. Vnesený fragment obsahuje 82 repetic CAG, proto k projevu příznaků dochází podstatně později, po několika měsících, i když myši mají obdobné příznaky jako R6 linie.

Linie knock-in myši

Hdh^{CAG(150)} je linie s repeticí 150 CAG vytvořená insercí CAG repetice do myšího genu pro Htt. Tato zvířata vykazují pozdější nástup behaviorálních a neuroanatomických změn. Knock-in myši představují typický příklad fenoménu pozorovaného



7 Srovnání velikosti mozku druhů, které by mohly být použity pro modelování neurodegenerativních onemocnění: a – myš domácí (*Mus musculus*), b – potkan (*Rattus norvegicus*), c – kosman bělovousý (*Callithrix jacchus*), d – makak rhesus (*Macaca mulatta*), e – prase domácí (*Sus scrofa domestica*), f – ovce domácí (*Ovis aries domestica*). Snímky: University of Wisconsin and Michigan State Comparative Mammalian Brain Collections (Morton a Howland 2013), použity s laskavým svolením vydavatelství IOS Press

8 Mozek člověka (*Homo sapiens*).

Foto O. Naňka, Anatomický ústav 1. lékařské fakulty UK v Praze

i na jiných transgenních organismech, a to, že vložení prodloužené polyglutaminové sekvence do endogenního genu pro Htt daného organismu má o hodně slabší efekt než vložení lidské mutované sekvence.

Kondicionální model myši

V r. 2000 Ai Yamamoto (Univerzita v Columbii, USA) vytvořila myší model HD, u kterého je možné tetracyklinem podání v potravě inaktivovat mutovaný gen (gene on/gene off). Po inaktivaci byl pozor-

ován úbytek již vytvořených agregátů Htt a také zlepšení klinického stavu zvířete.

Použití myších modelů bylo velmi přírodné a geneticky modifikované modely hlodavců poskytly dobrý náhled do patologie HD, včetně odhadu míry změn v genové expresi. Avšak vyvstávají zde problémy spojené se značnou evoluční vzdáleností hlodavců a lidí. Zásadní problém pro výzkum HD znamená skutečnost, že myši žijí ve srovnání s člověkem krátce a většina lidských neurodegenerativních onemocnění je běh na dlouhou trať. Krátká životnost vylučuje možnost detailního sledování postupného vývoje a stadií nemoci. Proto se přistoupilo k vytvoření modelů použitím velkých zvířat, kdy jde ale o náročný proces vyžadující spolupráci mnoha expertů – veterinářů, molekulárních biologů a vývojových biologů. Získáním modelu navíc cesta nekončí, spíše začíná.

● Příklad zebříčky pestré a velké zvířecí modely Huntingtonovy choroby

I když porucha řeči může být závažným problémem pro jednotlivce postižené HD, jak tato nemoc narušuje řečový projev, není snadné zkoumat. Pěvci používají na učení a produkci zpěvu specializované vokální oblasti mozku. Jednou z nich je oblast Area X nacházející se ve striatu. Vědci z týmu Richarda D. Mooneyho (Duke University School of Medicine) u zebříčky pestré (*Taeniopygia guttata*) vpravili právě do této oblasti lentivirus obsahující první exon Htt s rozšířenými CAG repeticemi. I když dospělá zebříčka zpívala melodie s vysoce stereotypními sekvencemi slabik normálně, expresí mutovaného Htt v oblasti Area X se zvýšila sekvencí variabilita slabik a výška tónů. Naproti tomu spektrální vlastnosti jednotlivých slabik zůstaly stabilní, což znamená, že mutovaný protein selektivně narušuje nervovou kontrolu vokálních sekvencí.

Opice jsou dalšími vhodnými druhy pro výzkum HD, protože mají podobné genomy a stavbu mozku jako člověk. Nabízejí tak unikátní zvířecí model pro studium patogeneze a průběhu nemoci, a pro klinické studie, které mohou přispět k rozpletení molekulárního, buněčného a klinického základu dědičných neurodegenerativních onemocnění. Týmy badatelů věnující se primátům jako modelům HD existují jen dva. Anthony Chan a kol. (Emory University v Atlantě) vytvořili skupinu kontrolních a HD opic (makak rhesus – *Macaca mulatta*) pro dlouhodobé studium nukleární magnetické rezonancí (NMR), zaměřené na kognitivní chování a molekulární profilování pomocí periferní krve a mozku míšního moku, s cílem vypracovat integrovaný časový průběh rozvoje a progresu onemocnění u opic s HD, který usnadní jejich budoucí využití v preklinických studiích. Jodi McBrideová a její kolegyně z Oregon Health and Science University pracují na tvorbě modelu HD u nehumánních primátů, jenž spolehlivě shrne symptomatologii onemocnění a může být použit k posouzení a zlepšení prediktivní účinnosti terapeutických látek. V cestě však stojí několik podstatných překážek, jež je třeba překonat, než budou primáti přijatelní jako zvířecí modely pro preklinický výzkum HD. Aby zvířata vykazovala příznaky přesně odpovídající průběhu



9 a 10 Miniprasata z Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v. v. i., v Liběchově, která jsou jedním ze zvířecích modelů HD. Foto I. Valeková

nemoci u lidí, očekávají se nejen motorické změny, ale i psychická porucha a úbytek kognitivních funkcí. Řízení těchto symptomů v rámci experimentálního testování zahrnuje vážné praktické a etické otázky. Je velmi obtížné zvládnout nemocná zvířata v opičí kolonii. U krátkodobých nemocí se to může dařit, ale dlouhodobá izolace primátům způsobuje stres, který mnohdy vyústí ve zmatek, a ten je už těžké kontrolovat. Jakmile se u zvířat začnou projevovat první příznaky HD, rozhodnutí o jejich optimální péči mohou významně ovlivnit charakter a trvání experimentů. Lidští pacienti s HD obvykle potřebují v posledních 5–10 letech života celodenní péči, proto by studium této choroby u opic pravděpodobně mohlo probíhat jen v časných stadiích onemocnění.

Vhodným modelem pro studium HD jsou také ovce, a to kvůli analogické morfologii bazálních ganglií a mozkové kůry v porovnání s člověkem. V závislosti na plemeni mají srovnatelnou tělesnou hmotnost s dospělým člověkem. I když patří mezi přežvýkavce, jejich další tělesné systémy jsou opět velmi podobné jako u lidí. Ovce proto byly široce používány jako zvířecí modely při řešení otázek z reprodukční biologie, respirační a kardiovaskulární fyziologie i dalších oborů. Tento velký transgenní model představuje příležitost pochopit časnou patogenezi mozku při HD. Ovce se vyznačují dobrou pamětí, jsou schopny učit se a pamatovat si nové úkoly. Zajímavé je, že se u nich našlo množství přirozených mutací způsobujících neurologické onemocnění s patologií podobající se té, kterou pozorujeme u lidí s obdobnými mutacemi. Transgenní ovčí model HD vytvořila před pěti lety skupina Jenny Mortonové (Univerzita v Cambridge) a Russella Snella (Univerzita v Aucklandu). Ke studiu používají podrobnou imunohistochemickou analýzu buněčných markerů a receptorů, jež v průběhu onemocnění HD podléhají patologickým změnám. V lidském mozku se snižuje hustota receptorů kyseliny gama-aminomáselné (GABA) a neurochemikálií včetně substance P a DARPP-32 (dopamine- and cyclic-AMP-regulated phosphoprotein – dopamin a cyklickým AMP regulovaný fosfoprotein o molekulové hmotnosti 32 kDa). Pětileté

transgenní ovce vykazují brzké neuropatologické změny, včetně 35% a 39% snížení množství podjednotek GABA receptorů přítomných v nucleus caudatus a putamen. Zajímavé je zároveň 33% snížení objemu striosomů – jednoho ze dvou základních tkáňových kompartmentů nucleus caudatus. Tyto změny jsou paralelní s časnými změnami v lidském mozku u nemocných HD a poskytují doplňující důkaz, že ovce představují vhodný model pro studium patogeneze HD a testování léčebných postupů.

Miniprasata

Celková fyziologie prasat se podobá člověku, a proto se stále častěji využívají v biomedicinském výzkumu (např. v reprodukční biologii nebo v respirační a kardiovaskulární fyziologii). V některých ohledech mají prasata jasné přednosti oproti ovcím – početný vrh (až 10 selat), chovné prasnice mohou mít dva vrhy ročně, což je při požadavku na množství zkoumaných zvířat výhodné. Dále patří mezi všežravce s podobným trávicím systémem. Obecně jsou považována za „chytřejší“ než ovce, i když přímé důkazy chybějí. Mezi výhodami v použití prasat pro studium postupných změn při neurodegenerativních onemocněních jmenujme především podobnost lidského a prasečího mozku (viz obr. 7 a 8), a poměrně dlouhou délku života (12–15 let). Hmotnost těla však může znamenat problém, protože prasata mohou přibývat po celý život. Většina chovaných prasat naroste příliš na to, aby byla využitelná pro experimentální účely. Proto se při výzkumu uplatňují hlavně miniprasata.

Na Ústavu živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd ČR, v. v. i., v Liběchově se nám před pěti lety podařilo vytvořit transgenní miniprase, které nese ve svém genomu promotor a část genu pro lidský mutovaný Htt (obr. 9 a 10). Přenos genu do genomu prasečích embryí se uskutečnil pomocí lentivirového vektoru, jenž integruje nesenou genetickou informaci do hostitelského genomu. Takto získaná miniprasata jsou schopna přirozeně se rozmnožovat a přenášet vložený gen do dalších generací. Mozky i jiné tkáně stárnoucích miniprasat testujeme na přítomnost agregátů, oligomerů a fragmentů Htt, souvisejících s patologií onemocnění HD u lidských pacientů. Ve spolupráci s laboratoří v Münsteru provádíme behaviorální studie a vyšetření nukleární magnetickou rezonancí. Miniprasata zatím nemají mo-

torické problémy, což může být způsobeno nízkým věkem či jejich lepší stabilitou. Ale již ve stáří 24 měsíců zjišťujeme přítomnost Htt oligomerů a toxických fragmentů, zvýšenou zánětlivou odpověď a změny v expresi různých biomarkerů u transgenních jedinců v porovnání s jejich zdravými sourozenci. I pokud se u prasete nerozvine stejný fenotyp jako u pacientů s HD, zůstává slibným modelem pro studium patofyziologie, buněčných pochodů a hledání terapeutických možností.

Závěrem

Je zřejmé, že žádný zvířecí model nemůže splnit všechny požadavky pro řešení otázek výzkumu Huntingtonovy choroby. Rovněž je nepravděpodobné, že by „pouhé“ vnesení mutovaného genu mohlo být použito u velkých zvířat stejně úspěšně jako u bezobratlých (např. octomilka *Drosophila melanogaster* a háďátko *Caenorhabditis elegans*) a myši. Přestože tyto transgenní modely pomohly odhalit základní molekulární důsledky mutovaného Htt, velcí savci představují komplikovanější model odrážející spíše komplexitu interakcí a dlouhodobý vývoj patologických procesů. Základní mechanismy byly do jisté míry objasněny na hlodavcích a nyní nastupuje generace nesrovnatelně věrnějších modelů. Jejich studium je složitější a náročné, ale cesta k detailnímu pochopení nemoci a designu a testování léčiv se bez nich neobejde. V průběhu posledních dvou desetiletí již velké zvířecí modely ukázaly, že jsou účinnou a důležitou součástí souboru modelů HD. Pro úspěšné vyvinutí léčby bude nejspíše potřebná spolupráce všech úrovní výzkumu, od identifikace mechanismu HD v nižších modelech, přes ověření použitím laboratorních myši, přizpůsobení léčebného přístupu v modelech velkých zvířat až k detailním klinickým testům.

Článek vznikl v rámci projektu 7F14308 Czech-Norwegian Research Programme a výzkumného Centra PIGMOD (C2.1.05 12.1.00103.0124).

Kolektiv spoluautorů: Klára Vočyánová, Dominika Vachútová a Zdenka Ellederová

Použitá literatura uvedena na webu Živy.