

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**IMUNOLOGICKÉ A HISTOLOGICKÉ METODY  
VE VÝZKUMU HUNTINGTONOVY NEMOCI**

**Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Ivana Němečková, Ph.D.**

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

**HRADEC KRÁLOVÉ, 2016**

**Patricia Jandurová**

## **Poděkování:**

Chtěla bych poděkovat vedoucí své práce RNDr. Ivaně Němečkové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky v průběhu zpracování této bakalářské práce.

Všem kolegům a kolegyním z 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.

Svojí rodině, která byla mou velkou oporou po celou dobu studia.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

**V Hradci Králové:**

**Podpis:**

# Abstrakt

Autor: Patrícia Jandurová

Název: Imunologické a histologické metody ve výzkumu Huntingtonovy nemoci

Bakalářská práce

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Studijní obor: Zdravotní laborant

Huntingtonova nemoc (HN) je vážné dědičné, autozomální, neurodegenerativní onemocnění postihující jedince bez rozdílu pohlaví. Toto onemocnění je způsobené expanzí CAG tripletů v genu pro protein huntingtinu, který je exprimovaný ve většině tkání. Takto mutovaný protein způsobuje degeneraci neuronů v mozku postižených pacientů, což vede k motorickým poruchám a rozkladu osobnosti. Nemoc vzniká při přítomnosti mutace na jednom ze dvou párových chromozomů. Riziko předání vlohy pro nemoc přímým potomkům je tedy 50%. Kvůli nástupu projevů většinou až v dospělosti je tato nemoc velice zákeřná. Doposud neexistuje vhodná léčba, ale mnoho výzkumných týmů se soustředí na navržení vhodných léčebných postupů.

Tato práce popisuje Huntingtonovu nemoc a zaměřuje se na možnosti experimentálního studia s použitím některých imunologických a histologických metod na vhodných zvířecích modelech. Jednotlivé techniky jsou v práci popsány a výsledky jsou doložené pomocí obrázků.

**Klíčová slova:** Huntingtonova nemoc, CAG triplet, imunologické a histologické metody, zvířecí model

# Abstract

Author: Patrícia Jandurová

Title of thesis: Imunologické a histologické metody ve výzkumu Huntingtonovy nemoci  
Bachelor thesis

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Study course: Medical laboratory technician

Huntington's disease (HD) is a severe autosomal inherited neurodegenerative disorder that affects individuals regardless of gender. This disorder is caused by an expansion of CAG repeats in huntingtin gene, that is expressed in almost all tissues. Mutant protein causes a neuron degeneration in a brain of HD patients which leads to a motor abnormalities and personality decay. The disease develops in the presence of a mutation in one of two huntingtin alleles. The risk of transmission of disease for the direct descendants is 50%. This disease is very malign because of its late onset. An adequate therapy does not exist yet, but a lot of research teams focus on designing a suitable medical treatment.

This work is devoted to the description of Huntington's disease and is focused on immunological and histological methods used in animal model experimental studies. Particular techniques are described and the results are supported with figures.

**Key words:** Huntington's disease, CAG repeat, immunological and histological methods, animal model

# Obsah

<b>Abstrakt.....</b>	<b>3</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>4</b>
<b>1. Úvod .....</b>	<b>7</b>
<b>2. Zadání bakalářské práce – cíl práce .....</b>	<b>8</b>
<b>3. Popis Huntingtonovy nemoci .....</b>	<b>9</b>
<b>3.1 Historie .....</b>	<b>9</b>
<b>3.2 Nemoc z pohledu medicínského a neuropatologie .....</b>	<b>12</b>
<b>3.3 Nemoc z pohledu genetiky - genetická podstata .....</b>	<b>13</b>
<b>3.4 Příznaky Huntingtonovy nemoci .....</b>	<b>16</b>
3.4.1 Neurologické projevy Huntingtonovy nemoci .....	16
3.4.2 Psychické projevy Huntingtonovy nemoci .....	16
<b>3.5 Formy Huntingtonovy nemoci .....</b>	<b>16</b>
3.5.1 Průběh klasické formy .....	17
3.5.2 Průběh juvenilní formy .....	17
3.5.3 Průběh formy s pozdním počátkem .....	17
<b>3.6 Vyšetření Huntingtonovy nemoci .....</b>	<b>17</b>
<b>4. Vybrané zvířecí modely Huntingtonovy nemoci.....</b>	<b>18</b>
<b>4.1 Model myš.....</b>	<b>18</b>
<b>4.2 Model prase .....</b>	<b>19</b>
<b>5. Histologické techniky používané ve výzkumu Huntingtonovy nemoci .....</b>	<b>20</b>
<b>5.1 Odběr materiálu .....</b>	<b>20</b>
<b>5.2 Fixace .....</b>	<b>20</b>
5.2.1 Fixace fyzikální.....	20
5.2.2 Fixace chemická.....	21
<b>6. Vyhodnocování.....</b>	<b>21</b>
<b>7. Základní histologická barvení.....</b>	<b>22</b>
<b>7.1 Barvení Hematoxylin – Eozin .....</b>	<b>22</b>
<b>7.2 Toluidinová modř .....</b>	<b>25</b>
<b>7.3 Luxol Fast Blue.....</b>	<b>26</b>
<b>8. Imunologické metody .....</b>	<b>29</b>
<b>8.1 Imunohistochemie .....</b>	<b>29</b>
<b>8.2 Imunofluorescence .....</b>	<b>34</b>
<b>8.3 Imunoblot .....</b>	<b>36</b>
<b>9. Závěr .....</b>	<b>37</b>

<b>Seznam použitých zkratk</b> .....	<b>38</b>
<b>Seznam obrázků</b> .....	<b>39</b>
<b>Seznam tabulek</b> .....	<b>40</b>
<b>Literatura</b> .....	<b>41</b>
<b>Elektronické zdroje</b> .....	<b>44</b>

# 1. Úvod

Huntingtonova nemoc (HN) je vážné dědičné, autozomální, neurodegenerativní onemocnění lidí, u kterých se projeví psychické a fyzické změny. Počáteční projevy nemoci nastávají ve středním věku, obvykle mezi 35. až 50. rokem (Roth a kol., 2006).

Rozšíření HN je celosvětově odhadováno na 5-8 nemocných na 100 000 obyvatel (Kumar a kol., 2010; Zuccato a kol., 2010). Největší četnost výskytu HN je v Západní Evropě a zemích s obyvateli evropského původu. Z celosvětového pohledu je nejnižší četnost výskytu HN v Číně, Japonsku, Africe a Finsku (Kumar a kol., 2010).

Nemoc vzniká při přítomnosti mutace na jednom ze dvou párových chromozomů. Riziko předání vloh pro nemoc přímým potomkům je tedy 50% (Roth a kol., 2006).

Pro toto onemocnění jsou charakteristické nekontrolovatelné záškuby svalů s motorickým efektem, poruchy pozorovatelné při chůzi a přijímání potravy. Důsledkem je také psychický rozklad osobnosti a vznikající demence (Roth a kol., 2006).



## **2. Zadání bakalářské práce – cíl práce**

Cílem této práce je zpracovat literární rešerši o výzkumu Huntingtonovy nemoci se zaměřením na možnosti jejího experimentálního studia s použitím různých imunologických a histologických metod na vhodných zvířecích modelech. Popis se týká vybraných imunologických a histologických metod využívaných ve výzkumu HN.

## 3. Popis Huntingtonovy nemoci

### 3.1 Historie

Epidemie „taneční mánie“ byla popsána v roce 1374, kdy jako první použil název chorea pro mimovolné záškuby svalů Paracelsus (1493-1541) a domníval se, že jde o poruchu centrálního nervového systému (Zuccato a kol., 2010).

Označení chorea popisuje, jak se lidé postižení touto poruchou svíjí, kroutí a točí v neustálém, jakoby „tanečním pohybu“ (Vondráčková a kol., 2014).

Na počátku 17. století angličtí kolonisté nazývali nemoc “that disorder” (ten nepořádek), nebo “San Vitus dance” (tanec Svatého Víta). Až do 17. století, zůstala nemoc záhadou a její povaha nebyla pochopena. Lidé s choreou byli považováni za posedlé ďáblem. První pokus o přesný lékařský popis HN pod názvem "chronická dědičná chorea" byl zaznamenán o dvě století později, v roce 1840, lékaři ve Spojených státech, Anglii a Norsku. Ale první přesný popis HN sepsal v roce 1872 americký lékař George Huntington, po němž byla pojmenovaná (Walker, 2007; Zuccato a kol., 2010).

Už v témže roce publikoval krátký článek s názvem „On Chorea“ v *Medical and Surgical Reporter of Philadelphia* (Huntington, 1872). Lékaři v nadcházejících desetiletích mnohé objasnili a poprvé si všimli zhoršení v centrální oblasti mozku pacientů s HN a lokalizovali nucleus caudatus (ocasaté jádro - část striata) jako hlavní cíl buněčné apoptózy. Velkou zásluhu na projeveném zájmu o výzkum HN má především americký eugenik Ch. Davenport. Ve své studii mapoval rodiny s výskytem HN, je to vůbec největší studie rodin s HN. Později, v padesátých letech dvacátého století, diagnostikoval A. Negrette HN desítkám osob ze společenství, které žili u jezera Maracaibo ve Venezuele. Mutace jediného genu, který se nachází na čtvrtém chromozomu, a je odpovědný za HN, byla objevena N. Wexlerovou (Zuccato a kol., 2010; Gusella a kol., 1993).

V roce 1983 objevil tým Josepha Martina genetický marker signalizující tuto nemoc (Walker, 2007; Zuccato a kol., 2010).

O deset let později, v roce 1993 se Gusellovi a kolegům podařilo prokázat zvýšený počet CAG tripletů v genu a nalézt přesný lokus genu pro huntingtin (HTT) v kódující oblasti IT-15 na krátkém raménku chromozomu 4p16 (Heiberg, 2008).

Tato nemoc je způsobena mutací v jediném genu, mohlo tedy dojít k vývoji genetického testování. Huntingtonova choroba se stala jedním z prvních genetických

onemocnění, které bylo možné testovat. Díky dostupnosti testování a podobnosti příznaků s jinými neurologickými nemocemi došlo v uplynulých letech k výraznému nárůstu testování této choroby (Walker, 2007).

Objev HTT genu, který kóduje bílkovinu huntingtin, podpořil výzkum a práce se nyní soustřeďují na molekulární mechanismy onemocnění (Walker, 2007).

Přibližný počet publikací o Huntingtonově nemoci citovaných pro daný rok v aktuálním seznamu lékařské literatury (před 1966) a v PubMed (po roku 1967) je uvedený v tabulce 1.

Tab. 1: Historie Huntingtonovy nemoci

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

*Převzato a upraveno z: (Walker, 2007)*

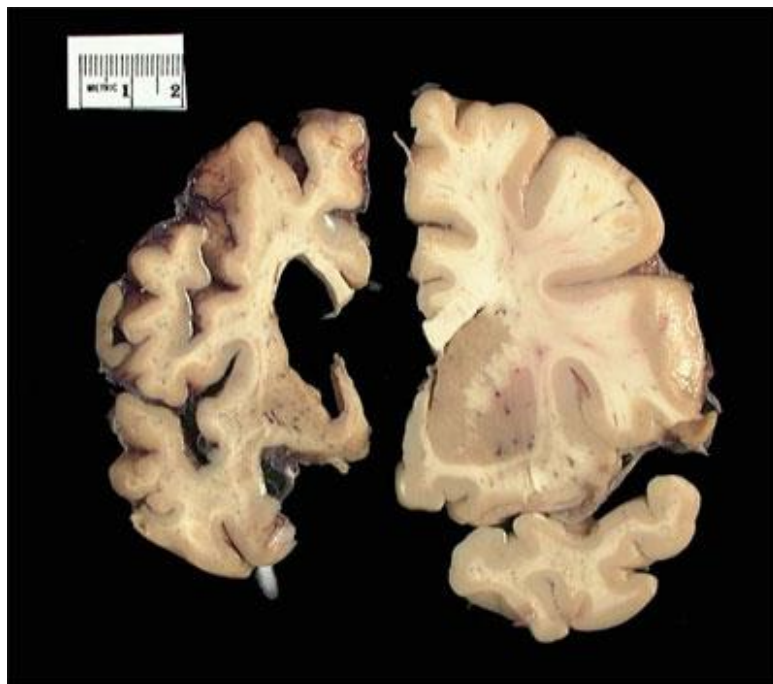
### 3.2 Nemoc z pohledu medicínského a neuropatologie

Patologie HN je soustředěna na centrální nervový systém. Rozsáhlá exprese huntingtinu má za následek progresivní atrofii mozku, stejně jako selektivní ztrátu nervových buněk a to zejména v hlubokých vrstvách frontálního kortexu a specifický úbytek buněk a atrofie částí bazálních ganglií jako nucleus caudatus a putamen (obr. 1) (Zuccato a kol., 2010).

Struktura degenerovaného striata ve tkáni klasifikuje stavy HN do pěti různých stupňů závažnosti (0-4). Stupeň 0 je k nerozeznání od normálních mozků. Nicméně 30-40% ztráty neuronů může být detekováno po histologickém vyšetření, hlavně v nucleus caudatus. U stupně 1, 2 a 3 je patrné postupující a výraznější zhoršování atrofie ve striatu. Stupeň 4 zahrnuje případy HN s těžkou atrofií striata a až 95% ztráty neuronů (Gil a Rego, 2008).

Důležité jsou i vzájemné interakce buněk. Narušení jejich správné funkce mutovaným huntingtinem poškodí neurony, naruší správnou funkci okolních neuronů nebo glií v blízkosti, které tomuto neuronu poskytují důležitou podporu (Walker, 2007).

Struktura neuronů ukazuje na významný vztah mezi morfológickou změnou mozku a rozvojem poruch poznávání a chování člověka, jeho paměti, pozornosti a pracovní funkce (Gil a Rego, 2008).



Obr. 1: Normální mozek vpravo, mozek pacienta s Huntingtonovou chorobou vlevo. *Převzato z: OSEL (Objective Source E- Learning) [online]*

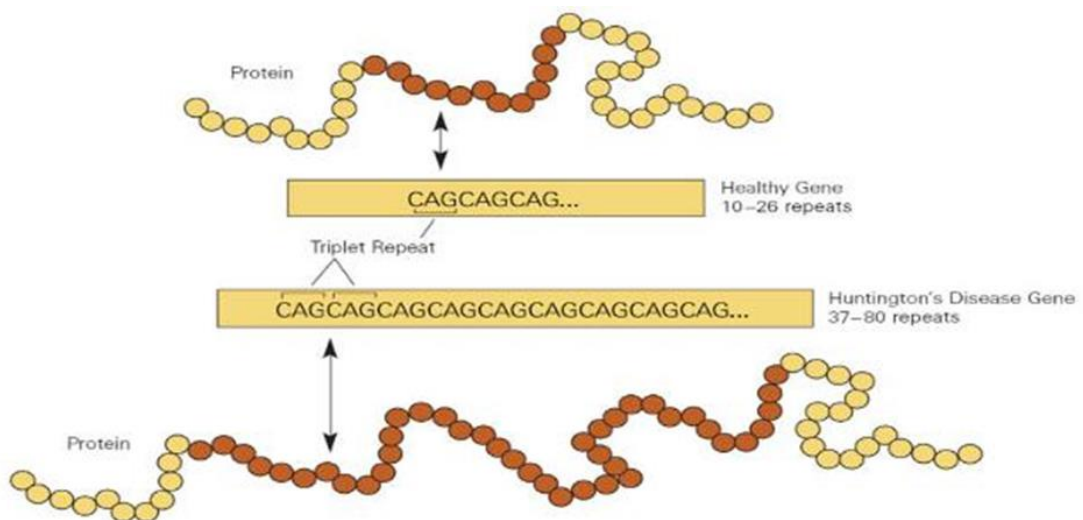
Jedním z patologických projevů Huntingtonovy choroby je vznik jaderných a cytoplazmatických agregátů, které obsahují mutovaný huntingtin. Stav u postižených jedinců již dlouho před nástupem symptomů, naznačuje, že výskyt agregátů nemusí korelovat s dobrou či špatnou prognózou. U některých transgenních myších modelů Huntingtonovy choroby vznikají agregáty pouze po nástupu příznaků (Walker, 2007).

### **3.3 Nemoc z pohledu genetiky - genetická podstata**

Huntingtonova nemoc je autosomálně dominantně dědičné neurodegenerativní onemocnění, vznikající mutací genu IT 15 na krátkém raménku 4. chromosomu (Roth a kol., 2006).

Normální huntingtin je obsažen ve všech lidských a savčích buňkách. S nejvyšší koncentrací v mozku a varlatech. Malé množství je přítomno v játrech, srdci a plicích (Walker, 2007). Gen kódující normální HTT může obsahovat až 36 tripletů CAG bazí (Cytosin-Adenin-Guanin), které kódují peptidovou sekvenci složenou z aminokyseliny glutamin (Kumara kol., 2010).

Základem mutace je zmnožení CAG tripletů, které vytváří prodloužený řetězec polyglutaminu (PolyQ) (obr. 2). U osob s 36-39 tripletů není vývoj nemoci jednoznačný, ale už při počtu 40 a více tripletů člověk onemocní HN (pokud se dožije věku projevů nemoci). Nástup nemoci se projeví tím dříve, čím je vyšší počet opakujících se CAG tripletů v sekvenci genu. Počet CAG tripletů ale není jediný činitel, který rozhoduje o věku, kdy se HN klinicky projeví (Roth a kol., 2006).



Obr. 2: Ukázka nadměrného opakování nukleotidové sekvence genu pacienta s HN (dole) ve srovnání s normálním genem (nahore). *Převzato z: HELP 4HD INTERNATIONAL INC. Educating The World Huntington's Disease. [online]*

Regulace transkripce DNA na mRNA je jedním z nejvíce regulovaných procesů v buňce. Exprese proteinů kódujících geny je regulována a řízena propracovaným způsobem, který zahrnuje několik transkripčních faktorů. Tyto musí na sebe vzájemně působit spolu s regulačními prvky DNA specifickými aktivitu genu. Je stále více zřejmé, že HTT má důležitou úlohu v transkripci. Řada metod ukázala, že jak wild-type (WT) HTT tak i mutovaný HTT interagují s transkripčními faktory. Kromě toho bylo zjištěno, že mnoho transkripčních drah je oslabených. Význam těchto interakcí i jejich změny v transkripci mají vliv na patogenezi onemocnění a zůstávají nejasné (Landles a kol., 2004).

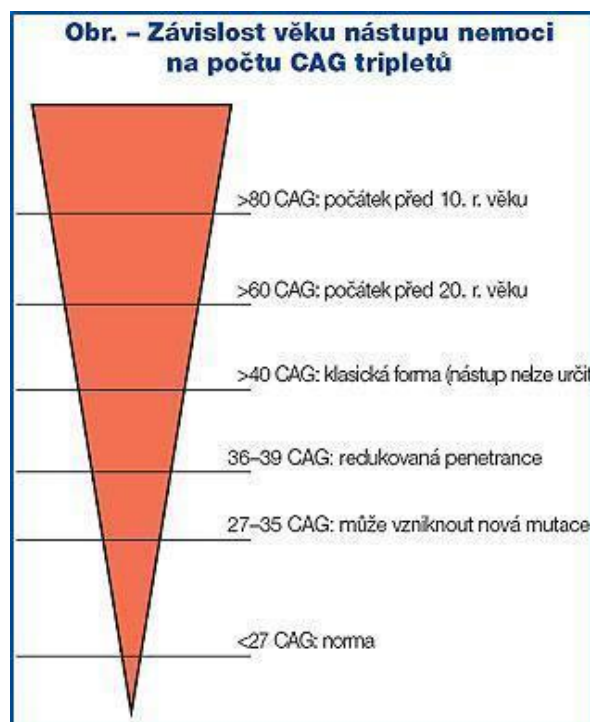
Zkoumání naznačuje, že délka polyglutaminových repetitivních ukazuje závažnost onemocnění. Se vzrůstající délkou opakování CAG tripletů je tedy spojena i rychlost progresu nemoci a časný nástup onemocnění zejména u juvenilní formy (tab. 2) (Walker, 2007).

Tab. 2: Vývoj HN u jedinců s hraničním počtem opakování CAG tripletů.

Počet CAG repetic	Výsledek
< 28	U jednotlivce se nebude vyvíjet HN
29 - 34	Individuálně se nebude vyvíjet HN, ale příští generace je v ohrožení
35 - 39	U jednotlivců v tomto rozmezí se může vyvinout HN; další generace je také ohrožená
> 40	Individuálně se bude vyvíjet HN

*Převzato a upraveno z: Hungtinton disease [online]*

Mutace genu je spouštěcím mechanismem pro syntézu proteinu s odlišnou funkcí. Tento protein je škodlivý pro mozkové buňky a současně také zhoršuje schopnost syntézy normálního proteinu hungtintinu, který je zásadní pro fungování neuronů (Zuccato a kol., 2010).



Obr. 3: Závislost věku nástupu nemoci na počtu CAG tripletů. *Převzato z: (Roth a kol., 2006)*



Spojitosť mezi opakovaním CAG tripletů, délkou polyglutaminového řetězce se u jednotlivých pacientů dramaticky liší jak dobou nástupu nemoci tak i rychlostí projevů (obr. 3) (Zuccato a kol., 2011).

### **3.4 Příznaky Huntingtonovy nemoci**

Počátek projevů HN u dospělého jedince, změny v osobnosti, dysfunkce motoriky a snížení poznávacích schopností nastává většinou mezi 35 a 50 lety. U malého procenta pacientů (5%) se objeví příznaky již před 20. rokem života (Zuccato a kol., 2010).

#### **3.4.1 Neurologické projevy Huntingtonovy nemoci**

Nejcharakterističtějšími projevy klasické formy HN jsou poruchy chůze, mající kolébavý až taneční ráz, tzv. chorea – mimovolně nepravidelné „házivé až šubavé“ pohyby. Projevuje se i v obličeji, na trupu i na končetinách. Častý projev nemoci je i nesrozumitelná řeč. Pozdní stádia Huntingtonovy nemoci jsou poznačena dysfagií, poruchou polykání, kdy pacient neovládá pohyb svalstva hltanu, proto v pokročilejších stádiích je typické hubnutí až kachexie (Roth a kol., 2006).

#### **3.4.2 Psychické projevy Huntingtonovy nemoci**

Změny osobnosti a chování, psychické problémy, které doprovází nemocného, jsou apatie nebo předrážděnost, ztráta kritičnosti a nadhledu, časté jsou i projevy agrese (Walker, 2007). Závažné jsou i stavy jako smutná nálada, úzkost či deprese (Roth a kol., 2006).

### **3.5 Formy Huntingtonovy nemoci**

Podle věku nástupu nemoci se HN dělí do 3 základních forem:

- Forma klasická, počínající obvykle mezi 35. – 50. rokem věku (cca 90% všech případů)
- Forma juvenilní, počínající do 20. roku věku (cca 5% všech případů)
- Forma s pozdním počátkem počínající po 60. roku věku (cca 5% všech případů)

### **3.5.1 Průběh klasické formy**

Nemoc se objevuje mezi 35. - 50. rokem věku a příznaky jsou nespecifické - poruchy chování a povahy, často také depresivní stavy. Později v pokročilejších fázích nemoci se již projeví i demence. Od časných stadií se objevují mimovolní pohyby a poruchy cílených pohybů, chůze, porucha řeči, polykání. V pokročilejších stadiích často ubývá mimovolných pohybů. Pacient se po 10-15 letech nemoci (průběh však bývá individuální) stává závislým na péči okolí a umírá většinou na komplikace vzniklé infekcemi (Roth a kol., 2006; Roth a kol., 2010).

### **3.5.2 Průběh juvenilní formy**

Juvenilní forma začíná už před 20. rokem věku a vzniká u přibližně 5% všech případů Huntingtonovy nemoci. Objevují se poruchy jak intelektu a chování, tak i neurologické. Poruchám motoriky dominuje ztuhlost a zpomalenost, objevují se i epileptické záchvaty, dysartrie a dysfagie. Nástup obtíží je rychlý a vede k závislosti na péči okolí. Doba přežití je kratší než u klasické formy (Roth a kol., 2006; Roth a kol., 2010).

### **3.5.3 Průběh formy s pozdním počátkem**

Tato forma nemoci se objevuje u osob starších 60 let. Jedná se o cca 5% všech případů Huntingtonovy nemoci. Ze všech tří forem patří mezi nejmírnější, protože její průběh je pomalý. Obvykle nepůsobí závažná postižení základních denních aktivit a nemocní jsou po motorické stránce soběstační. Výraznější demence se obvykle nerozvíjí. Z poruch chování se nejčastěji objevují apatie, deprese a iritabilita (Roth a kol., 2006; Roth a kol., 2010).

U identických dvojčat je počáteční projev příznaků Huntingtonovy choroby jen několik let od sebe (Walker, 2007).

## **3.6 Vyšetření Huntingtonovy nemoci**

Přesné patofyziologické mechanismy Huntingtonovy choroby nejsou dobře známy, ale výzkum na geneticky upravených zvířecích modelech poskytuje pohled na mechanismus nemoci a teoreticky i cestu vedoucí k budoucí léčbě (Walker, 2007).

Byl vytvořený zvířecí model s genetickým základem tohoto onemocnění, který představuje genetické a molekulární mechanismy, které jsou základem pro degenerativní procesy v lidské nemoci. Většina současných modelů má vloženou tuto mutaci (nebo její část) do genomu (Ramaswamy a kol., 2007).

U neurodegenerativních onemocnění, jako jsou Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, Huntingtonova choroba lze laboratorně vyšetřovat vzorky pacientů pouze post mortem. Díky genetickým modifikacím je dnes možno i přes bariéry mezi druhy přenést mutovanou kopii genu, nebo její část z jednoho druhu na jiný a sledovat rozvoj a průběh onemocnění. Transgenní organismy se využívají i u diabetes mellitus a cystické fibrózy nebo i ke studiu kardiovaskulárních chorob (Aigner a kol., 2010).

Genetické mutace HN umožnily vytvoření různých zvířecích modelů, které vyjadřují různé formy mutovaného huntingtinu a ukazují diferenciální patologii. Studie na těchto zvířecích modelech poskytly důležitý pohled na patogenezi HN. Transgenní myši exprimují N-terminální konec nebo plnou délku mutovaného HTT ve všech buňkách nebo selektivně v různých typech buněk. Pro vytvoření modelů HN byla také použita velká zvířata, jako jsou ovce, prase a opice (Chang a kol., 2015).

Vznikem těchto modelů nastal velký pokrok ve výzkumu HN. Zvířecí modely nám dávají příležitost studovat vývoj nemoci od počátku, postupný rozvoj nemoci a sledování příznaků a změn. Ukazují možnosti využití nových farmakologických či chirurgických postupů.

## **4. Vybrané zvířecí modely Huntingtonovy nemoci**

### **4.1 Model myš**

Mezi nejčastěji studované myší modely patří R6/2 myši. Tyto myši, transgenní (Tg), vykazují progresivní neurologický fenotyp, který napodobuje mnohé z vlastností Huntingtonovy nemoci. Zahrnují choreické pohyby, nedobrovolné stereotypní pohyby, tremor, epileptické záchvaty a také nemotorické komponenty nemoci (Carter a kol., 1999).

U myši R6/2 byla prokázána abnormalita neuronů. Od stáří 5 týdnů bylo popsáno postupné snižování objemu mozku hlavně v oblasti striata. Významné snižování počtu striatálních neuronů od 12. týdnu věku a smrt, která nastává v 12. – 15. týdnech věku (Davies a kol., 1997).

Myši R6/2 exprimují mutantní exon 1 HTT. Jejich gen nese 141 až 157 CAG opakování. Vyvinul se u nich progresivní neurologický fenotyp s motorickými symptomy připomínajícími ty, které jsou vidět u pacientů a vykazují časný nástup a rychlý průběh nemoci (Landles a kol., 2010; Carter a kol., 1999).

## 4.2 Model prase

Geneticky upravená prasata – transgenní se používají v biomedicínském výzkumu, protože tento model ukazuje několik podobností s lidmi s ohledem na fyziologii, metabolismus, organizaci genomu, patologii a stárnutí (Gün a kol., 2014).

Vhodný model pro studium HN vznikl v roce 2009. Pod vedením profesora Jana Motlíka se jeho týmu pracovníků v Ústavu živočišné fyziologie a genetiky, Akademie věd České Republiky v Liběchově, podařilo tento model vytvořit. Metoda lentivirové transgenese dala vzniknout miniaturnímu praseti, který nese gen lidského mutovaného huntingtinu. Vzniklo 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). Prasnička nesoucí mutovaný gen dala vzniknout F1 a F2 generaci (Baxa a kol., 2013). V současné době je vyvíjena snaha o vytvoření miniaturního prasete exprimujícího plnou délku lidského mutovaného huntingtinu.

Díky podobné fyziologii a orgánové kapacitě jako u lidí jsou tato zvířata vhodná pro preklinické experimenty a dlouhodobé studie (Zuccato a kol., 2010).

## **5. Histologické techniky používané ve výzkumu Huntingtonovy nemoci**

### **5.1 Odběr materiálu**

Studium orgánů a jejich stavby na mikroskopické úrovni jak v medicíně, tak i ve výzkumu je motivováno zjištěním přítomnosti patologických procesů a zároveň potvrzením vzniku nemocí, které propukly přirozeně nebo byly experimentálně vyvolány (Maňáková a Seichertová, 2002).

Materiál určený k histologickému, histochemickému nebo submikroskopickému vyšetření musí být správně odebrán a okamžitě ošetřen (Uhrín a kol., 2003), ihned fixován v některé z fixačních tekutin a přesně označen (Vacek, 1996). Musí představovat reprezentativní vzorek tkáně (Maňáková a Seichertová, 2002).

### **5.2 Fixace**

Cílem fixace je zachování buněk a tkání co možná nejvíce bez posmrtných změn, které jsou vyvolány buněčnými enzymy, nebo změnami obsahu vody, případným vyschnutím (Lüllmann-Rauch, 2012).

Fixace se používá k rychlému vysrážení bílkovin protoplazmy v buňkách a tkáních s účelem zabránit autolýze tkáně. Účelem není jen denaturace bílkovin, ale zároveň musí být denaturace velmi šetrná, aby byla struktura tkáně pokud možno taková, jakou měla za živa. I když fixací dochází vždy k nějakým změnám v odebírané tkáni, tyto změny by měly být co nejmenší a zároveň by neměly narušovat barvitelnost tkáně (Vacek, 1996).

#### **5.2.1 Fixace fyzikální**

1. chladem-rychlé zmražení, např. kapalným dusíkem, aby nedošlo k vytvoření krystalků vody, které by narušily membrány buněk a morfologii tkání
2. teplem-pomocí mikrovlnné trouby, ve fyziologickém roztoku nebo v řádu sekund ve fixačním roztoku, které urychlí fixaci a umožní odhalení antigenu v imunohistochemických technikách.

### 5.2.2 Fixace chemická

1. aldehydy-formaldehyd, glutaraldehyd
2. alkoholy-ethanol, methanol
3. kyseliny-octová, trichloroctová, pikrová
4. soli těžkých kovů-chlorid rtuťnatý, oxid osmičelý, dvojchroman draselný (Maňáková a Seichertová, 2002).

Standardně se používá chemická fixace ve 4-10% formaldehydu v isotonickém fosfátovém pufru. Proteiny se zesílují a lehce denaturují (Lüllmann-Rauch, 2012).

Po fixaci se zhotovují tenké řezy pro další mikroskopické studium, tkáň se zaleje do média, do parafínu nebo celoidinu, či speciálních pryskyřic, které ji zpevní a je možno nakrájení tenkých řezu na mikrotomu. Lze krájet i tkáně, které nebyly zalévané, ale pouze zamražené (Maňáková a Seichertová, 2002). Nakrájené tenké řezy jsou přeneseny na mikroskopická skla potažená želatinou, která nám slouží ke zvýšení přilnavosti preparátu.

## 6. Vyhodnocování

Výstupem histologických značení je obrázek. Získaná obrazová dokumentace všech barvení dále postupuje obrazovou analýzou, během které se stanovuje např. intenzita fluorescence, srovnávání ploch sledované struktury, počet definovaných objektů (buněk, jader, agregátů).

Všechny náhledy obrázků byly získány virtuálním skenerem OLYMPUS VS-ASW-FL (Virtual Slide system VS120). Skener pracuje na principu mikroskopického zobrazení makroskopických útvarů (řez celého mozku). Jednotlivá zorná pole, pořízena objektivem 20x, byla sloučena do jednoho obrázku.

## 7. Základní histologická barvení

Neuron, jako základní morfologická a funkční jednotka CNS, se skládá z těla (perikaryon) a výběžků. Dendrity jsou specializované pro příjem vzruchů do perikarya a axon, vždy jen jeden, převádí vzruchy z perikarya. Konec axonu je rozvětvený a zakončen synapsí.

V těle neuronu je velké euchromatické jádro, malé jadérko, tzv. Nisslova tělíska, jejíž součástí je drsné endoplazmatické retikulum obklopeno volnými ribozomy, lysozomy, Golgiho aparát, mitochondrie. Na povrchu perikarya se také nacházejí synaptické kontakty. Cytoskelet tvoří neurofibrily složené z neurofilament a neurotubulů, které pronikají až do výběžků.

Axony v CNS jsou obklopené oligodendrocyty, které vytváří myelinové pochvy. Myelinové pochvy jsou tvořeny lipidy a proteiny (Slípka a Tonar, 2015; Junqueira a kol., 1999; Lüllmann-Rauch, 2012).

Základní metody histologického barvení jako barvení hematoxylin-eozin (H&E) (obr. 4-6), toluidine blue (TB) (8-10), luxol fast blue (LFB) (11-14) jsme použili v nezměněné formě dle protokolů uvedených v databázi IHC WORLD (obr. 4-6, 8-14).

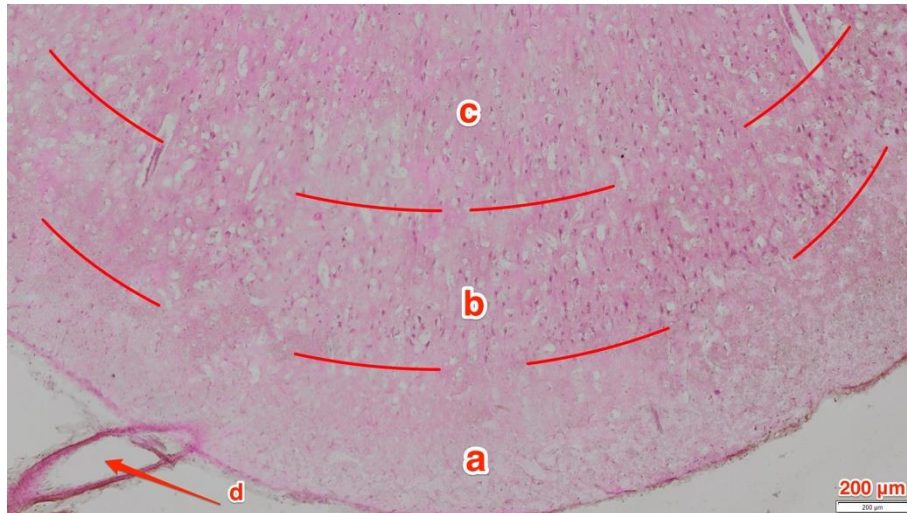
### 7.1 Barvení Hematoxylin – Eozin

Hematoxylin (H) je zásadité barvivo, které barví rychle a výrazně kyselá jádra buněk díky DNA a RNA.

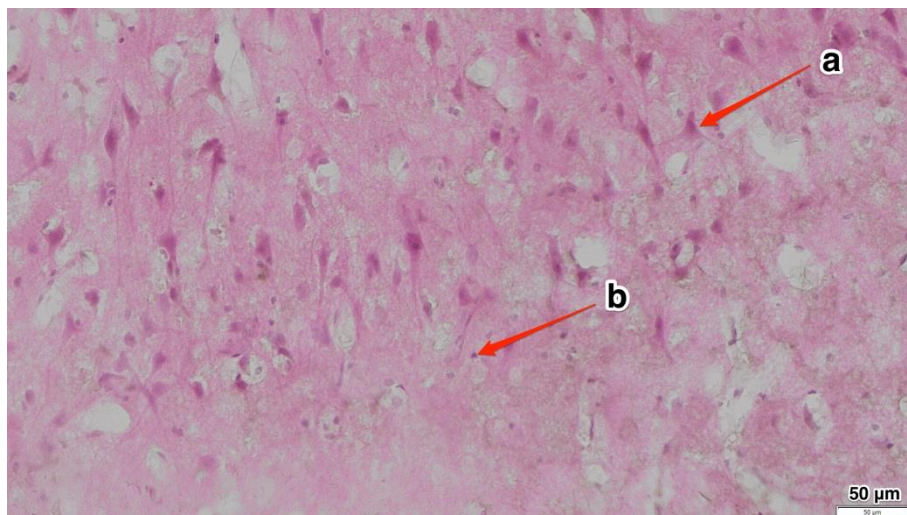
Eozin (E) je kyselé barvivo, které naopak barví bazickou cytoplazmu buněk (Vacek, 1996).

Barvením hematoxylin - eozin (H&E) lze docílit dostatečný barevný kontrast pro orientaci na řezu, z kterého je vhodné vybírat oblast pro další imunohistochemické reakce (Maňáková a Seichertová, 2002).

H&E barvení není vhodné pro detailní studium neuroglií, umí rozlišit jen malá jádra glií od velkých jader neuronů. K morfologickému rozlišení se používá speciálních procedur impregnačních vzácnými kovy (Junqueira a kol., 1999).

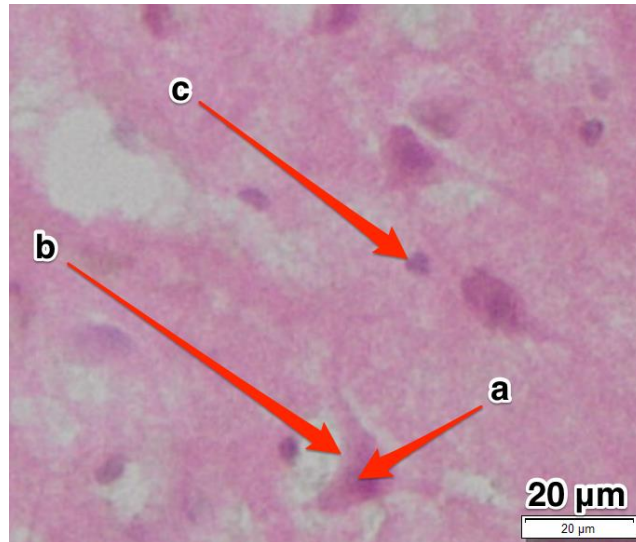


Obr. 4: Řez korovou vrstvou prasečího WT mozku, 20  $\mu\text{m}$  tlustý, barvení H&E, a) v molekulární vrstvě je velmi málo buněk, b) v zevní granulózní vrstvě se nacházejí malé pyramidové buňky i nepyramidové buňky. V další c) viditelné vrstvě jsou malé a středně velké pyramidové buňky d) dole vlevo je velký artefakt. Zvětšení obrázku 5x, objektiv 20x, měřítko 200  $\mu\text{m}$  (LBRP AV ČR, 2013).

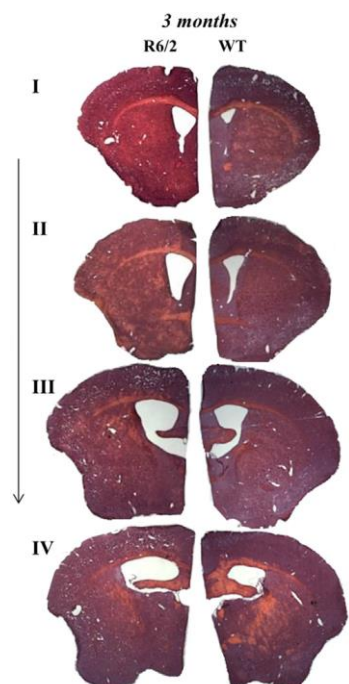


Obr. 5: Řez korovou vrstvou prasečího WT mozku, 20  $\mu\text{m}$  tlustý, barvení H&E, a) tmavě fialové jádro pyramidové buňky a světle fialové perikaryon, b) tmavě fialové malé buněčné jádro gliové buňky. Zvětšení obrázku 20x, objektiv 20x, měřítko 50  $\mu\text{m}$  (LBRP AV ČR, 2013).





Obr. 6: Řez korovou vrstvou prasečího WT mozku v detailu, 20  $\mu\text{m}$  tlustý, barvení H&E, a) tmavě fialové jádro pyramidové buňky, b) světle fialový perikaryon, c) tmavě fialové malé buněčné jádro gliové buňky. Zvětšení obrázku 40x, objektiv 20x, měřítko 20  $\mu\text{m}$  (LBRP AV ČR, 2013).

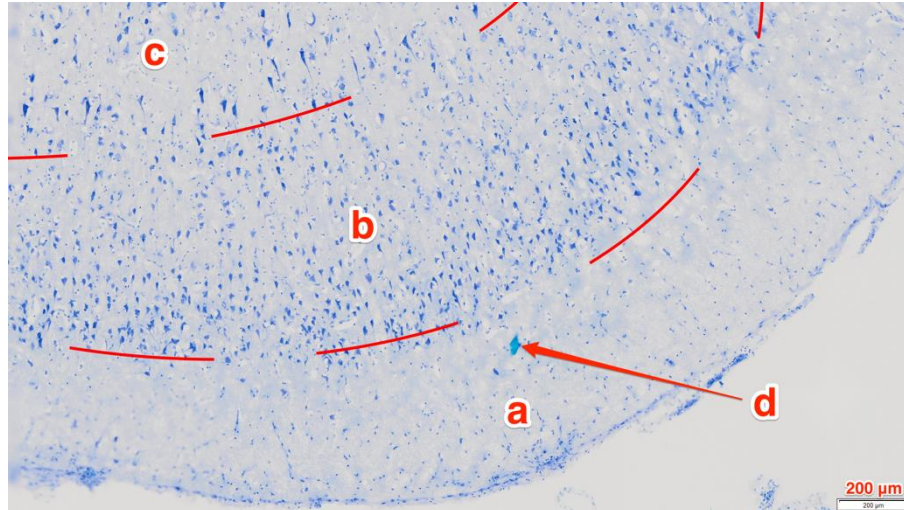


Obr. 7: Řez myším mozkiem, 20  $\mu\text{m}$  tlustý, barvení H&E. Porovnání vpravo myš R6/2, vlevo myš WT. Převzato z: (Marangoni a kol., 2014)

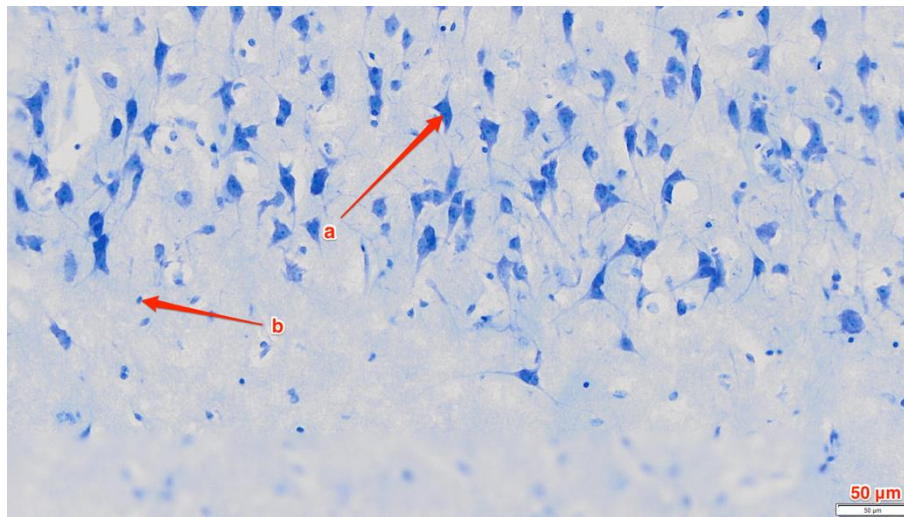
Na obrázku 7 jsou patrné změny v morfologii mozků obarvených H&E. Porovnání kontrolních WT myši a transgenních myši R6/2 ve věku 3 měsíce. V průběhu stárnutí se prokázalo významné rozšíření bočních mozkových komor (Marangoni a kol., 2014).

## 7.2 Toluidinová modř

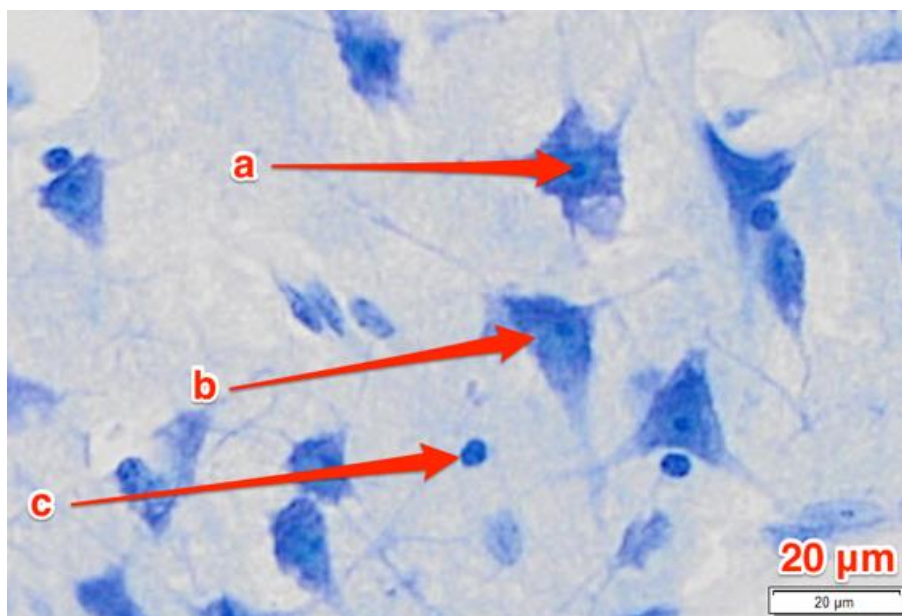
Obarvení toluidinovou modří (Toluidine blue, TB) se na obarvených preparátech dá sledovat tvar, velikost buněk, uspořádání vrstev, jejich hustota (Vacek, 1996).



Obr. 8: Řez neokortexem prasečího WT mozku, 20  $\mu\text{m}$  tlustý, barvení TB, a) molekulární vrstva - velmi málo buněk, b) zevní granulózní vrstva- malé pyramidové buňky i nepyramidové buňky, c) vnitřní granulózní vrstva - malé a středně velké pyramidové a nepyramidové buňky Dole uprostřed d) malý artefakt. Zvětšení obrázku 5x, objektiv 20x, měřítko 200  $\mu\text{m}$  (LBRP AV ČR, 2013).



Obr. 9: Řez neokortexem prasečího WT mozku, 20  $\mu\text{m}$  tlustý, barvení TB, a) viditelná pyramidová buňka b) malá gliová buňka. Zvětšení obrázku 20x, objektiv 20x, měřítko 50  $\mu\text{m}$  (LBRP AV ČR, 2013).



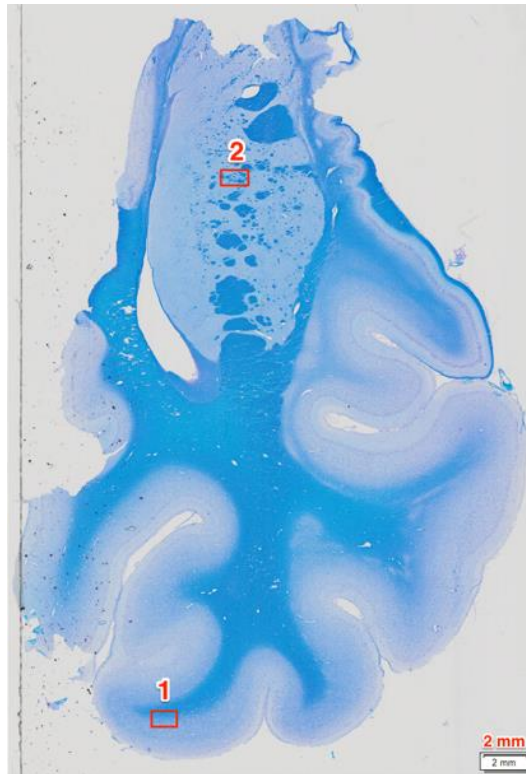
Obr. 10: Řez neokortexem prasečího WT mozku, detail, 20  $\mu\text{m}$  tlustý, barvení TB, a) tmavé jádrko uprostřed jádra b) světlé jádro a perikaryon pyramidového neuronu, c) malé jádro gliové buňky. Zvětšení obrázku 40x, objektiv 20x, měřítko 20 $\mu\text{m}$  (LBRP AV ČR, 2013).

### 7.3 Luxol Fast Blue

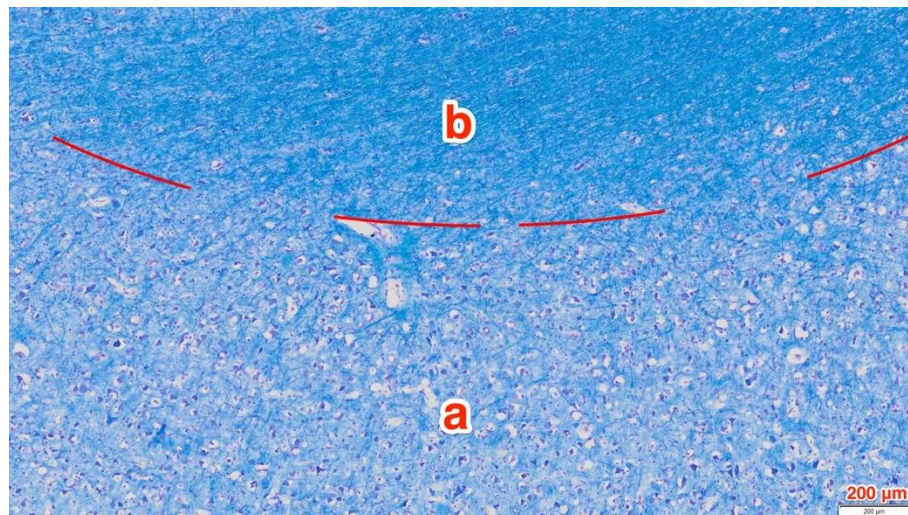
Barvení Luxol fast blue (LFB, luxolová modř) se používá ke sledování vláken s myelinovými pochvami, jejich počtu, uspořádání svazků a proužků, jejich tloušťky i jejich případné rozdíly (Vacek, 1996).

Barvení luxolovou modří je výhodné a poskytuje velmi dobré výsledky. Můžeme ho použít na barvení mražených i parafínových řezů. Na fixaci je nejvhodnější Bakerova tekutina. Myelin, včetně fosfolipidů, jsou obarveny modře až zeleně a neurony jsou obarvené růžově až fialově. Toto barvivo se běžně používá pro identifikaci základní neuronální struktury v mozku nebo míchy (IHCWORLD) [online].

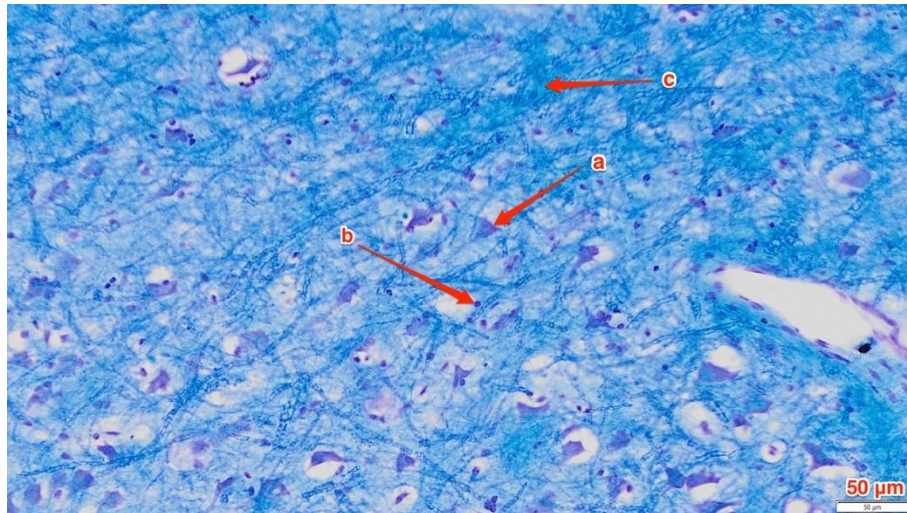




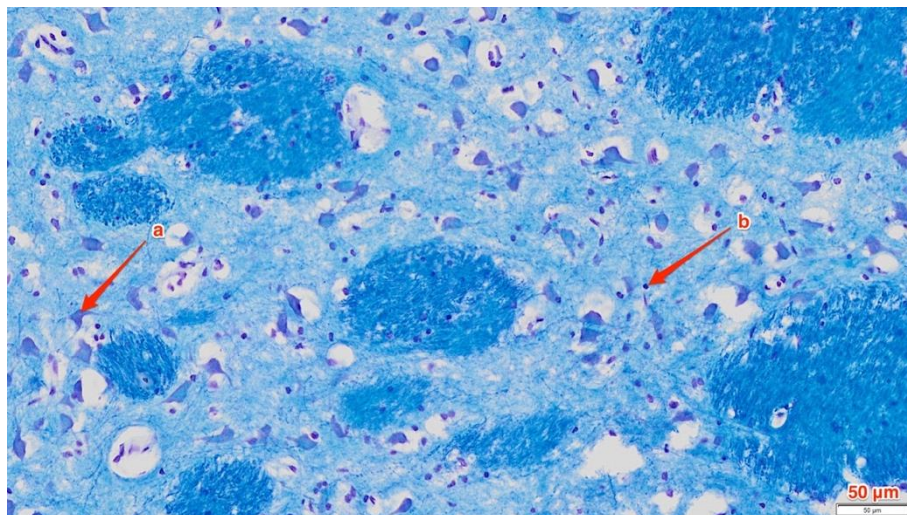
Obr. 11: Řez jednou hemisférou prasečího WT mozku, 20  $\mu\text{m}$  tlustý, barvení LFB, 1) bílá hmota má modrou barvu, šedá, korová, vrstva je světlejší, 2) striatum, objektiv 20x, měřítko 2 mm (LBRP AV ČR, 2013).



Obr. 12: Řez prasečím WT mozkiem, 20  $\mu\text{m}$  tlustý, barvení LFB, a) šedá korová vrstva je světlejší a obsahuje fialová perikarya, b) bílá hmota má tmavou sytě modrou barvu s hustě uspořádanými myelinizovanými vlákny. Zvětšení obrázku 5x, objektiv 20x, měřítko 200  $\mu\text{m}$  (LBRP AV ČR, 2013).



Obr. 13: Řez prasečím WT mozkem, 20 μm tlustý - detail, barvení LFB, a) fialový perikaryon , b) malé buněčné jádro gliové buňky-astrocyt, c) myelin, včetně fosfolipidů modře až zeleně. Zvětšení obrázku 20x, objektiv 20x, měřítko 50 μm (LBRP AV ČR, 2013).



Obr. 13: Řez prasečím WT mozkem, 20 μm tlustý - detail, barvení LFB. Striatum, a) fialový perikaryon, b) malé buněčné jádro gliové buňky. Zvětšení obrázku 20x, objektiv 20x, měřítko 50 μm (LBRP AV ČR, 2013).

## 8. Imunologické metody

### 8.1 Imunohistochemie

Fixací buněk ethanolem nebo paraformaldehydem je v buňkách zachován hledaný antigen, na který se naváže primární protilátka (získaná obvykle na myších nebo králicích). Na tuto primární protilátku se naváže sekundární protilátka, která je namířena proti imunoglobulinu primární protilátky, a naváže se v místě, kde je tato navázaná na antigen.

Sekundární protilátky jsou značeny enzymem, např. křenovou peroxidázou, která označí molekulu sekundární protilátky. Po odmytí reaguje peroxidáza se substrátem-peroxidem vodíku a chromogenem, např. DAB (diaminobenzidin). V místě reakce se vyvine tmavě hnědé zbarvení. Další dobarvení je možné klasickým histologickým barvením, např. hematoxylinem, toluidinovou modří (Principy imunocytochemie) [online].

Uvedený postup zhotovování imunohistochemických preparátů popisuje pouze konkrétní námi použitou metodiku.

Materiál, který jsme odebrali ze zvířat k histologickému a histochemickému vyšetření byl po perfuzi fosfátovým pufrem odebrán a okamžitě ošetřen roztokem 4% paraformaldehydu. Poté byl prosycen 30% roztokem sacharózy. U metody imunohistochemie jsme pro náš výzkum modifikovali různé kroky ve standardním protokolu. Už samotný začátek imunohistochemických procesů vyžaduje vysoké nároky na přípravu všech materiálů a pomůcek.

Řezy mozku 20  $\mu\text{m}$  silné o velikosti asi 4  $\text{cm}^2$ , se musí ručně pomocí štětečků narovnávat na podložní skla.

Na neošetřených sklech se řez svinuje a nemá minimální přilnavost potřebnou k jeho rozprostření. Úprava skel silanem byla také málo vhodná, důsledkem vysoké adheze řezu k povrchu docházelo k trhání při snaze narovnat jej. Kompromisem v adhezi a relativní jednoduchosti rozprostření řezu, se jako nejvýhodnější ukázala skla potažená 0,5% roztokem želatiny.

Po fixaci tkáně 4% paraformaldehydem, který zčásti maskuje antigenní místa ve vzorcích a způsobuje slabé nebo falešně negativní zbarvení pro imunohistochemickou detekci některých proteinů, jsme použili metodu odkrytí antigenů (Antigen Retrieval, AR). S ní lze výrazně zlepšit odhalení skrytých antigenních míst. Vyzkoušením různých

typů se ukázal jedním z vhodných řešení pro konkrétní, námi použitou protilátku (3B5H10, Sigma Aldrich, USA), zásaditý roztok Tris-EDTA pufr (10mM Tris Base, 1mM EDTA , 0.05% Tween 20, pH 9.0).

Roztok pro AR je navržen tak, aby demaskoval antigeny a epitopy na paraformaldehydem fixovaných tkáňových řezech a tím se zvýšila intenzita zbarvení protilátek. Účinnost se projevuje převážně kombinací teploty, času, pH a v chemickém složení pufru. Kvůli nestandardnímu a neopakovatelnému výsledku a také rozpadu tkáně jsme dali přednost AR metodám, které vyžadují nižší teplotu. Vysoká teplota způsobuje rozpad, rozvaření tkáně.

Druhým možným a použitým řešením bylo „kyselé“ předčištění 90% kyselinou mravenčí za laboratorní teploty.

Po blokadě endogenní peroxidázy a po nespecifickém vysycení tkáně bílkovinami, jsme pokračovali permeabilizací roztokem Tritonu-X 100. Následně proběhla reakce s primární protilátkou naředěnou na koncentraci doporučenou výrobcem (u některých protilátek byla nutná optimalizace reakce vlastním ředěním) v +4°C přes noc.

Další inkubace probíhala se sekundární- biotinylovanou protilátkou. Po inkubaci jsme pokračovali reakcí s detekčním komplexem ABC (VECTASTAIN® ABC Kit, Vector Laboratories, USA) abychom dosáhli vizualizace chromogenu, následovalo další působení 3,3'-diaminobenzidinem (DAB) ve směsi s peroxidem vodíku. Výsledkem byl hnědý stabilní produkt, který zviditelnil místa, v nichž proběhla specifická IHC reakce. Na obrázcích 15 až 19 je vidět úspěšné provedení této metody. Po odvodnění ve vzestupné řadě alkoholů a projasnění v xylenu jsme skla zamontovali v montovacím médiu.

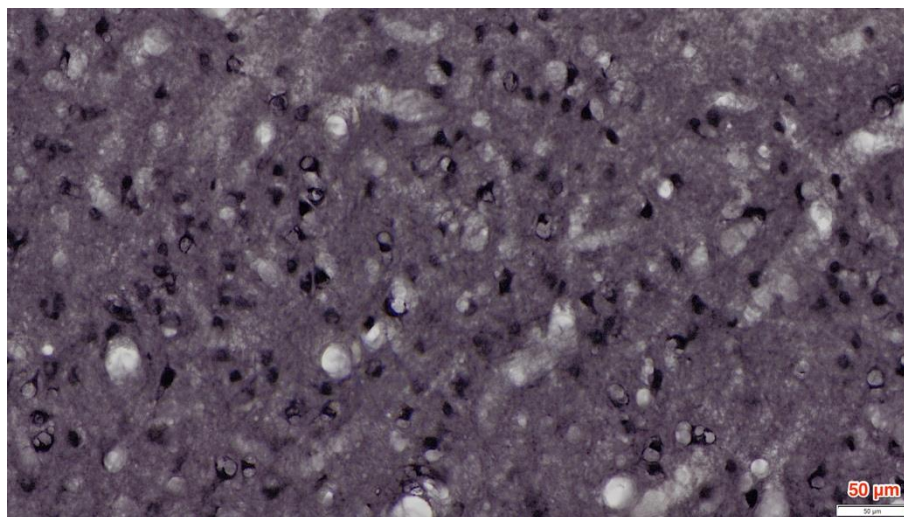




Obr. 15: Řez jednou hemisférou prasečího WT mozku, obarvený protilátkou DARPP-32, chromogen DAB, objektiv 20x, měřítko 2 mm (LBRP AV ČR, 2014).

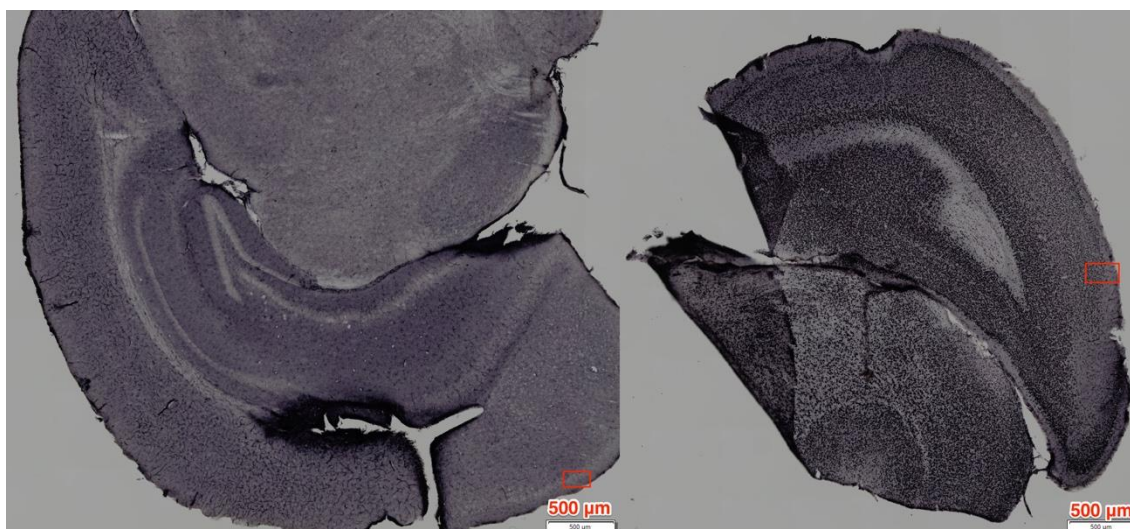
Na obr. 15 a 16 je barvení primární protilátkou DARPP-32 (Abcam, UK) (dopamin a cAMP-regulovaný fosfoprotein). U neuronů syntetizujících dopamin, který umožňuje přenos nervových impulsů, je poškození dopaminových drah úzce spojené se vznikem neurodegenerativních onemocnění. Tento cytosolický protein se vyskytuje ve velké míře ve středních neuronech striata (Nishi a kol., 1997).





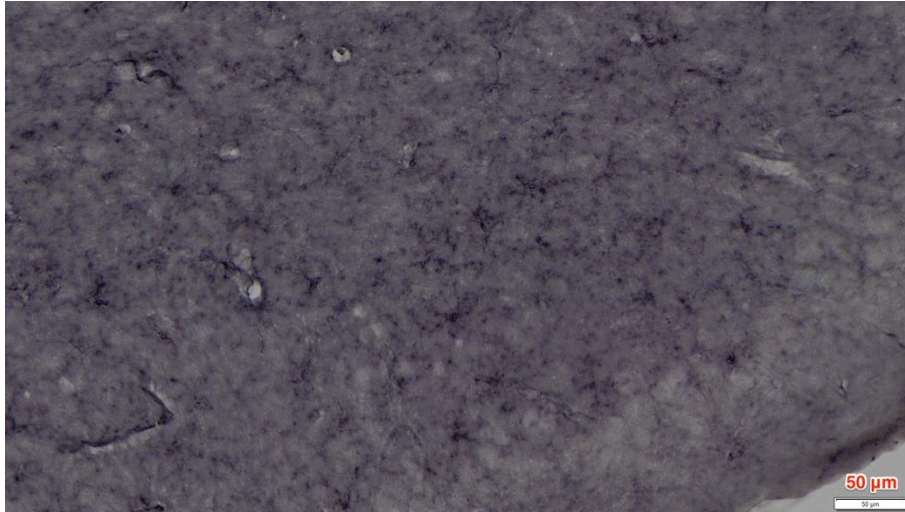
Obr. 16: Řez prasečím WT mozkem, 20  $\mu\text{m}$  tlustý, detail, protilátka DARPP32, chromogen DAB. Zvětšení obrázku 20 x, objektiv 20x, měřítko 50  $\mu\text{m}$  (LBRP AV ČR, 2015).

Odlišné chování mutovaného huntingtinu vede ke tvorbě cytoplazmatických inkluzí a intranukleárních tělísek v mozku s HN. Na základě studia protilátek, intranukleární tělíška obsahují N-terminálně zkrácené fragmenty huntingtinu (Faber a kol, 1999).

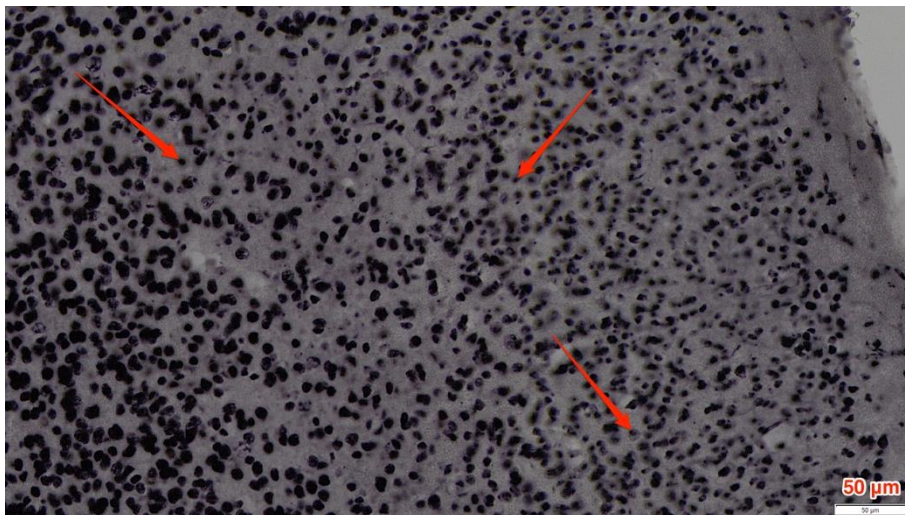


Obr. 17: Řez myším mozkem 20  $\mu\text{m}$  tlustý, protilátka MW8, chromogen DAB, vlevo WT myš, vpravo R6/2 myš. Objektiv 20x, měřítko 500  $\mu\text{m}$  (LBRP AV ČR, 2015).

Protilátka MW8 (Developmental Studies Hybridoma Bank, USA) může odlišit transgenní myš od WT myši tím (obr. 17, 18, 19), že označí jaderné inkluze v R6/2 mozku. V mozku WT myši neoznačí žádná místa. Mapování epitopů ukazuje, že MW8 se specificky váže na domény a aminokyseliny 83-90. Epitopy pro MW8 jsou různě dostupné v různých subcelulárních strukturách, kde se HTT nachází (Ko a kol., 2001).



Obr. 18: Detail – řez myším WT mozkem, tlustý 20  $\mu\text{m}$ , protilátka MW8, chromogen DAB, nejsou vidět žádné inkluze. Zvětšení obrázku 20 x, objektiv 20x, měřítko 50  $\mu\text{m}$  (LBRP AV ČR, 2015).



Obr. 19: Detail - řez myším R6/2 mozkem, tlustý 20  $\mu\text{m}$ , protilátka MW8, chromogen DAB, šipky ukazují na agregovanou formu HTT lokalizovanou převážně v jádře. Zvětšení obrázku 20 x, objektiv 20x, měřítko 50  $\mu\text{m}$  (LBRP AV ČR, 2015).

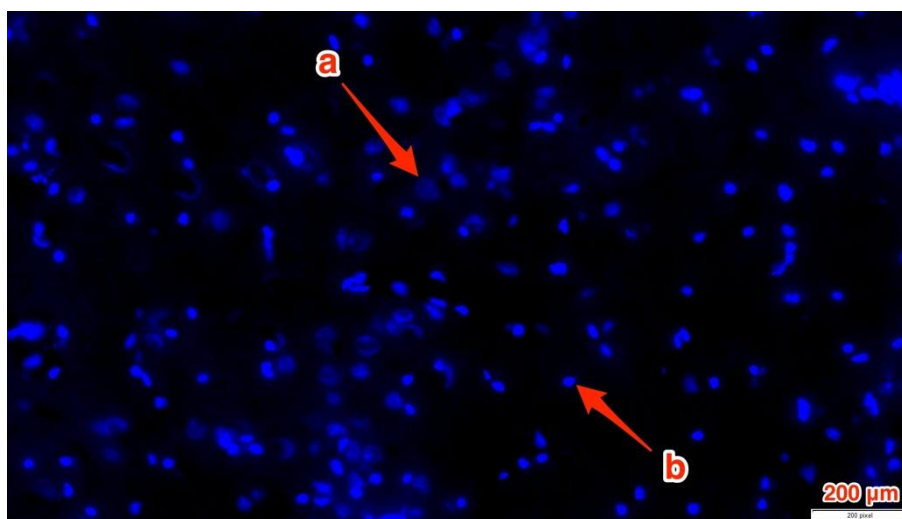
Imunohistochemické studie protilátek detekují v mozku huntingtin v perikaryu některých neuronů a neuropilu jako tečkované zbarvení, která mohou být nervovými zakončeními (Trottier a kol., 1995).

## 8.2 Imunofluorescence

Tato metoda umožňuje průkaz některých látek založených na reakci antigenu s protilátkou, která se s ním váže, ale naproti předchozí IHC metodě je protilátka označena sloučeninou schopnou vyvolat fluorescenci - fluorescenčním barvivem. Jestliže se v histologickém vzorku nachází sledovaný antigen, lze přesně prokázat jeho lokalizaci. Ve fluorescenčním mikroskopu jsou tyto struktury viditelné jako jasně svítící body na černém pozadí (Vacek, 1996).

U imunofluorescenčních barvicích metod (viz obr. 20, 21, 22) jsme vycházeli také ze standardních protokolů. U kroku blokace, kde se řezy inkubují v séru stejného druhu jako je původ sekundární protilátky, aby se vyblokovaly nespecifické vazby imunoglobulinů, jsme modifikovali protokol blokací s odtučněným mlékem a také s hovězím sérovým albuminem (BSA).

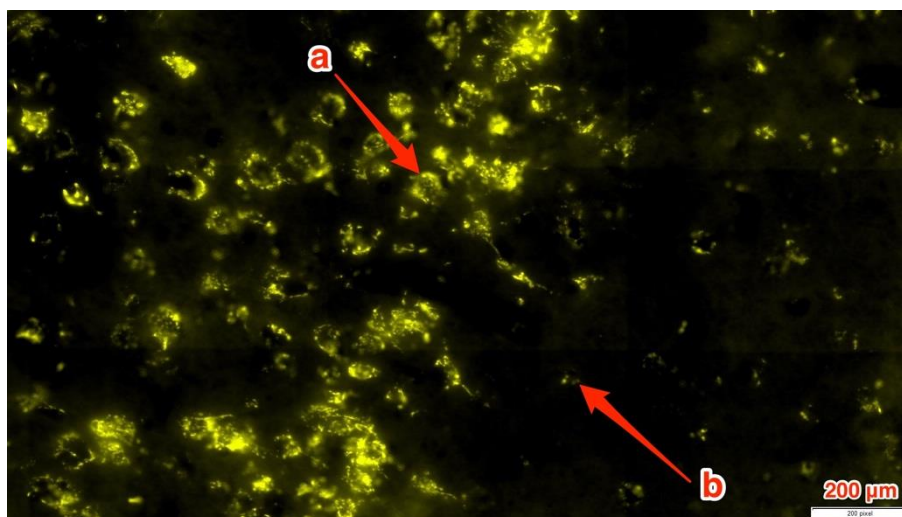
Vizualizaci myší monoklonální protilátky Anti-Polyglutamin (myší IgG1 izotyp, 3B5H10) jsme provedli nepřímou dvoustupňovou metodou, použili jsme sekundární protilátku s fluorochromem Alexa Fluor® 555.



Obr. 20: Řez prasečím Tg mozkem, tlustý 20  $\mu\text{m}$ , značení jader DAP, a) větší, méně výrazné jádro patří pyramidové buňce, b) výrazně zbarvené kompaktnější malé jádro glie patří astrocytu. Zvětšení obrázku 20 x, objektiv 20x, měřítko 200  $\mu\text{m}$  (LBRP AV ČR, 2015).

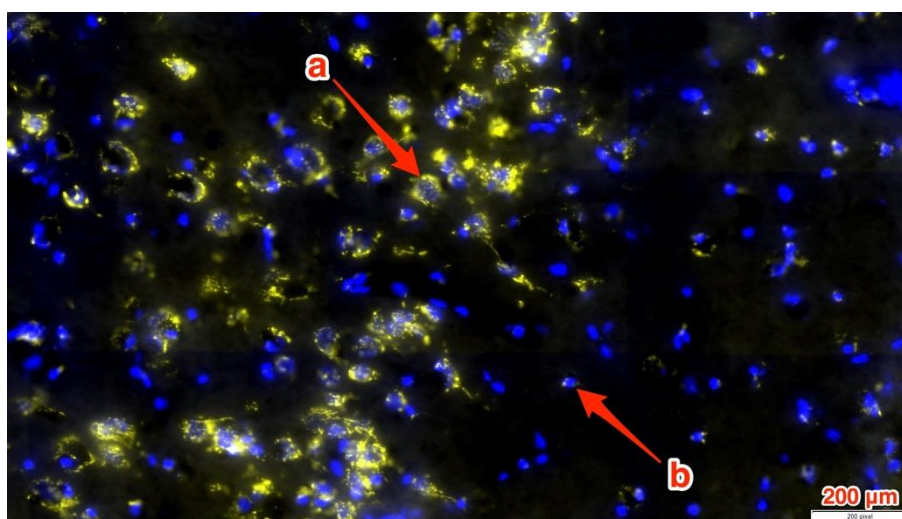
Označení jader je fluorescenčním barvivem DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride), které se pevně váže na oblasti AT v DNA. Excitační maximum DAPI je 358 nm a jeho emisní maximum je 461 nm (Eurocytology) [online].





Obr. 21: Řez prasečím Tg mozkem, tlustý 20  $\mu\text{m}$ , značený 3B5H10. Flouorchrom AF<sup>®</sup>555, a) 3B5H10 navázaná na mutovaný HTT v okolí jádra neuronu b) malá gliová buňka. Zvětšení obrázku 20 x, objektiv 20x, měřítko 200  $\mu\text{m}$  (LBRP AV ČR, 2015).

Myší monoklonální protilátka Anti-Polyglutamin (myší IgG1 izotyp, 3B5H10) je vytvořena proti lidskému huntingtinu (N-koncový fragment 171 aminokyselin obsahující 65 Q). Nerozpustné mikroskopické bílkovinové depozita v buňkách (inkluzní tělíska) jsou v korelaci s onemocněním a protilátka 3B5H10 je užitečným nástrojem pro studium polyglutaminového onemocnění. Protilátka 3B5H10 se váže přednostně k neagregovanému mutantnímu huntingtinu a k několika dalším proteinům způsobujícím onemocnění asociované s polyQ (Peters a kol. 2005).



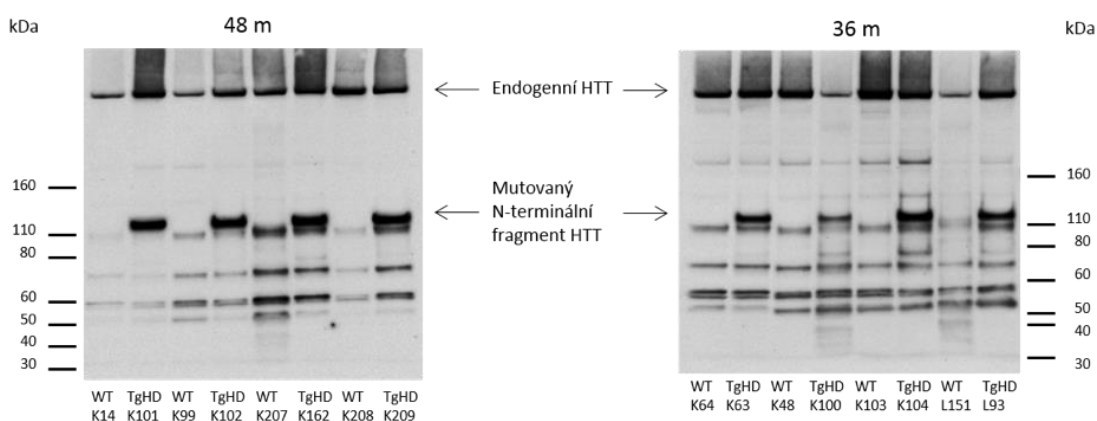
Obr. 22: Řez prasečím Tg mozkem, tlustý 20 $\mu\text{m}$ , značený 3B5H10. Flouorchrom AF 555 a DAPI, a) 3B5H10 navázaná na mutovaný HTT v okolí jádra neuronu (žlutě), jádro neuronu (modře), b) malá gliová buňka. Zvětšení obrázku 20 x, objektiv 20x, měřítko 200  $\mu\text{m}$  (LBRP AV ČR, 2015).

## 8.3 Imunoblot

Western blotting (WB) nebo imunoblotování je technika používaná pro detekci specifických proteinů a jejich relativní kvantifikaci. Western blotting má nespornou výhodu ve specifičnosti detekce oproti jiným metodám a to díky identifikaci sledovaného proteinu podle jeho velikosti, tzn. molekulární hmotnosti. Je používána na různých *in vitro* a *in vivo* modelech HN. Některé studie uvádějí použití WB jako vhodnou metodu k identifikaci a kvantifikaci HTT proteinu. Typy gelů používaných k separaci, použité protilátky a specifické úpravy protokolů, byly optimalizovány výzkumnými pracovníky vždy v závislosti na typu buněčné linie a na délce mutovaného proteinu HTT (Neelima a kol., 2014).

Tato technika používá základní tři prvky:

1. separační rozdělení podle velikosti pomocí gelové elektroforézy
2. přenos na pevný nosič (blotování)
3. značkování cílového proteinu pomocí správné primární a sekundární protilátky k vizualizaci (Mahmood a Yang, 2012).



Obr. 23: Reprezentativní obrázek WB při použití protilátky Anti-Huntingtin [EPR5526]. (LBRP AV ČR, 2016).

U metody WB (obr. 23) pro identifikaci proteinů, separované podle velikosti elektroforézou na gelu, jsme použili pro inkubaci specifickou protilátku Anti-Huntingtin antibody [EPR5526] (Abcam, UK) a vizualizovali za použití sekundární protilátky a detekčního činidla. Vzorky mozků jsou z WT a Tg prasat starých 36 a 48 měsíců. U všech Tg prasat je prokázán mutovaný N-terminální fragment HTT na pozici 120kDa a u všech prasat endogenní HTT cca 350kDa.

## 9. Závěr

Cílem mojí práce bylo přehledné popsání histologických a imunologických metod a zdůraznění jejich důležité role a pevného místa ve výzkumu HN, který má vést k pochopení průběhu nemoci a poznání patologických změn v mozkové tkáni.

Hlavními změnami, které u HN pozorujeme, jsou úbytek hmoty striata, zvětšování mozkových komor a úbytek neuronů. Dále je charakteristická tvorba inkluzí různého původu mutovaného HTT a jejich distribuce v mozku jak na buněčné úrovni v jádře a neuropilu, tak i na úrovni tkáňové, kde výskyt agregátů je rozdílný v různých částech mozku.

Význam zvířecích modelů je hlavně ve výhodách sledování průběhu nemoci po celou dobu života zvířete a dostupný materiál i v preklinických stádiích, nejen post mortem jako je to u tkání humánních. Další důležitou věcí je testování možností, jak ovlivnit průběh nemoci, lokalizace sledovaného HTT a jeho agregace.

Dosavadní poznání z výzkumu na miniprasatech neprokázalo žádný projev klinických příznaků HN. Ale na úrovni molekulární (WB, biochemie) lze již sledovat změny vyvolané přítomností mutovaného HTT.

Na úrovni histologických preparátů není dosud pozorován rozdíl mezi WT a Tg zvířetem. Hlavní znaky Huntingtonovy nemoci - choreu, atrofii a agregáty jsme zatím nepozorovali.

## Seznam použitých zkratek

AR	Antigen Retrieval
AT	adenin, thymin (nukleové báze)
BSA	hovězí sérový albumin
CAA	cytozin- adenin- adenin ( aminokyseliny)
CAG	cytozin- adenin- guanin (aminokyseliny)
CNS	centrální nervová soustava
DAB	diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride
DNA	deoxyribonukleotidová kyselina
EDTA	kyselina ethylendiaminotetraoctová
H&E	Hematoxin Eozin
HN	Huntingtonova nemoc
HTT	gen pro huntingtin
LBRP	Laboratoř buněčné regenerace a plasticity
LFB	Luxol Fast Blue
mRNA	mediátorová ribonukleotidová kyselina
PolyQ	polyglutamin
TB	Toluidine Blue – Toluidinová modř
Tg	Transgenní zvíře
WB	Western blotting
WT	Wild type

## Seznam obrázků

Obr. 1: Normální mozek vpravo, mozek pacienta s Huntingtonovou chorobou vlevo .	12
Obr. 2: Ukázka nadměrného opakování nukleotidové sekvence genu pacienta s HN (dole) ve srovnání s normálním genem (nahore). .....	14
Obr. 3: Závislost věku nástupu nemoci na počtu CAG tripletů.....	15
Obr. 4: Řez korovou vrstvou prasečího WT mozku, barvení H&E. ....	23
Obr. 5: Řez korovou vrstvou prasečího WT mozku, barvení H&E.. ....	23
Obr. 6: Řez korovou vrstvou prasečího WT mozku v detailu, barvení H&E. ....	24
Obr. 7: Řez myším mozkiem, barvení H&E. Porovnání vpravo myš R6/2, vlevo myš WT. ....	24
Obr. 8: Řez neokortexem prasečího WT mozku, barvení TB.....	25
Obr. 9: Řez neokortexem prasečího WT mozku, barvení TB. ....	25
Obr. 10: Řez neokortexem prasečího WT mozku, detail, barvení TB. ....	26
Obr. 11: Řez jednou hemisférou prasečího WT mozku, barvení LFB. ....	27
Obr. 12: Řez prasečím WT mozkiem, barvení LFB. ....	27
Obr. 13: Řez prasečím WT mozkiem, detail, barvení LFB.....	28
Obr. 14: Řez prasečím WT mozkiem, detail, barvení LFB. Striatum.....	28
Obr. 15: Řez jednou hemisférou prasečího WT mozku, značený DARPP-32. ....	31
Obr. 16: Řez prasečím WT mozkiem, značený DARPP32.....	32
Obr. 17: Řez myším mozkiem, WT a R 6/2, značený MW8. ....	32
Obr. 18: Detail – řez myším WT mozkiem, značený MW8. ....	33
Obr. 19: Detail- řez myším R6/2 mozkiem .....	33
Obr. 20: Řez prasečím Tg mozkiem, značení jader DAPI. ....	34
Obr. 21: Řez prasečím Tg mozkiem, značený 3B5H10.....	35



Obr. 22: Řez prasečím Tg mozkem, značený 3B5H10..... 35

Obr. 23: Reprezentativní obrázek WB při použití protilátky Anti-Huntingtin [EPR5526]  
..... 36

## **Seznam tabulek**

Tab. 1: Historie Huntingtonovy nemoci..... 11

Tab. 2: Vývoj HN u jedinců s hraničním počtem opakování CAG tripletů. .... 15

## Literatura

1. Aigner B, Renner S, Kessler B, Klymiuk N, Kurome M, Wünsch A, Wolf E. Transgenic pigs as models for translational biomedical research. *J Mol Med (Berl)*. 2010 Jul;88(7):653-64.
2. Baxa M, Hruska-Plochan M, Juhas S, Vodicka P, Pavlok A, Juhasova J, Miyanochara A, Nejime T, Klima J, Macakova M, Marsala S, Weiss A, Kubickova S, Musilova P, Vrtel R, Sontag EM, Thompson LM, Schier J, Hansikova H, Howland DS, Cattaneo E, DiFiglia M, Marsala M, Motlik J. A transgenic minipig model of Huntington's Disease. *J Huntingtons Dis*. 2013;2(1):47-68.
3. Carter RJ, Lione LA, Humby T, Mangiarini L, Mahal A, Bates GP, Dunnett SB, Morton AJ. Characterization of progressive motor deficits in mice transgenic for the human Huntington's disease mutation. *J Neurosci*. 1999 Apr 15;19(8):3248-57.
4. Davies SW, Turmaine M, Cozens BA, DiFiglia M, Sharp AH, Ross CA, Scherzinger E, Wanker EE, Mangiarini L, Bates GP. Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell*. 1997 Aug 8;90(3):537-48.
5. Faber PW, Alter JR, MacDonald ME, Hart AC. Polyglutamine-mediated dysfunction and apoptotic death of a *Caenorhabditis elegans* sensory neuron. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Jan 5;96(1):179-84.
6. Gil JM, Rego AC. Mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease. *Eur J Neurosci*. 2008 Jun;27(11):2803-20.
7. Gün G, Kues WA. Current progress of genetically engineered pig models for biomedical research. *Biores Open Access*. 2014 Dec 1;3(6):255-64.
8. Heiberg A. [Huntington's disease]. *Tidsskr Nor Laegeforen*. 2008 Oct 9;128(19):2214-7.
9. Huntington G. On chorea. *Med Surg Reporter* 1872 Feb 15;26:317-21.
10. Chang R, Liu X, Li S, Li XJ. Transgenic animal models for study of the pathogenesis of Huntington's disease and therapy. *Drug Des Devel Ther*. 2015 Apr 15;9:2179-88.
11. Junqueira CL, Carneiro J, Kelley RO. *Základy histologie. a Lange medical book*, 7. Vyd. H+H 1999, s. 153, 160. ISBN80-85787-37-7.
12. Ko J, Ou S, Patterson PH. New anti-huntingtin monoclonal antibodies: implications for huntingtin conformation and its binding proteins. *Brain Res Bull*. 2001 Oct-Nov 1;56(3-4):319-29.

13. Kumar P, Kalonia H, Kumar A. Huntington's disease: pathogenesis to animal models. *Pharmacol Rep.* 2010 Jan-Feb;62(1):1-14. Landles C, Bates GP. Huntingtin and the molecular pathogenesis of Huntington's disease. Fourth in molecular medicine review series. *EMBO Rep.* 2004 Oct;5(10):958-63.
14. Landles C, Sathasivam K, Weiss A, Woodman B, Moffitt H, Finkbeiner S, Sun B, Gafni J, Ellerby LM, Trottier Y, Richards WG, Osmand A, Paganetti P, Bates GP. Proteolysis of mutant huntingtin produces an exon 1 fragment that accumulates as an aggregated protein in neuronal nuclei in Huntington disease. *J Biol Chem.* 2010 Mar 19;285(12):8808-23.
15. Lüllmann-Rauch R. *Histologie*, 3 vyd. Grada Publishing, a.s. 2012, s. 516, 517. ISBN978-80-247-3729-4.
16. Mahmood T, Yang PC. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci.* 2012 Sep;4(9):429-34.
17. Marangoni M, Adalbert R, Janeckova L, Patrick J, Kohli J, Coleman MP, Conforti L., Age-related axonal swellings precede other neuropathological hallmarks in a knock-in mouse model of Huntington's disease. *Neurobiol Aging.* 2014 Oct;35(10):2382-93.
18. Maňáková E, Seichertová A. *Metody v histologii*, 1.vyd. Nakladatelství Karolinum, 2002, s. 5, 7, 8, 9, 10, 12. ISBN80-0230-X.
19. Neelima M, Nandita GD, Sudip K. *DasRecent Trends in Detection of Huntingtin and Preclinical Models of Huntington's Disease*, ISRN Molecular Biology Volume 2014 (2014), Article ID 190976, 5 pages.
20. Nishi A, Snyder GL, Greengard P. Bidirectional regulation of DARPP-32 phosphorylation by dopamine. *J Neurosci.* 1997 Nov 1;17(21):8147-55.
21. Peters-Libeu C, Newhouse Y, Krishnan P, Cheung K, Brooks E, Weisgraber K, Finkbeiner S. Crystallization and diffraction properties of the Fab fragment of 3B5H10, an antibody specific for disease-causing polyglutamine stretches. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 2005 Dec 1;61(Pt 12):1065-8.
22. Ramaswamy S, McBride JL, Kordower JH. Animal models of Huntington's disease. *ILAR J.* 2007;48(4):356-73.
23. Roth J, Klempíř J, Židovská J. Huntingtonova nemoc. In: *Postgraduální medicína*, 2006, roč. 8, č. 5, s. 517-522.
24. Slípka J, Tonar Z. *Základy histologie*, Karolinum Press, 2015, s 95, 97, ISBN8024628090.
25. The Huntington's Disease Collaborative Research Group 1993. "A Novel Gene Containing a Trinucleotide That Is Expanded and Unstable on Huntington's Disease Chromosomes." *Cell*, 72, 971–83.

- 26.** Trottier Y, Devys D, Imbert G, Saudou F, An I, Lutz Y, Weber C, Agid Y, Hirsch EC, Mandel JL. Cellular localization of the Huntington's disease protein and discrimination of the normal and mutated form. *Nat Genet.* 1995 May;10(1):104-10.
- 27.** Uhrín V, Kuna R, Jančová A, Uhrín P, Záhonová A. *Základy mikroskopických a submikroskopických a preparačních technik v biológii*, Fakulta přírodných vied UFK v Nitre, 2003, s. 29, ISBN80-8050-586-1.
- 28.** Vondráčková Z, Baxa M, Maurová Z. *Život s Huntingtonovou chorobou*, Rapid & Smart s.r.o., 2014, s. 23, ISBN978-80-90-4199-4-0.
- 29.** Walker FO. Huntington's disease. *Lancet.* 2007 Jan 20;369(9557):218-28.
- 30.** Vacek Z. *Histologie a histologická technika I. a II. část, 1. Vyd.* PROTISK Slavkov, 1996, s.25, 68, 125, 159, ISBN: 80-7013-201-9, 1996, ISBN80-7013-202-7,1996
- 31.** Zuccato C, Ciammola A, Rigamonti D, Leavitt BR, Goffredo D, Conti L, MacDonald ME, Friedlander RM, Silani V, Hayden MR, Timmusk T, Sipione S, Cattaneo E. Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science.* 2001 Jul 20;293(5529):493-8.
- 32.** Zuccato C, Marullo M, Vitali B, Tarditi A, Mariotti C, Valenza M, Lahiri N, Wild E.J., Sassone J., Ciammola A, Bachoud-Lèvi A.C., Tabrizi S.J., Di Donato S., Cattaneo E. Brain-Derived Neurotrophic Factor in Patients with Huntington's Disease. Li X-J, ed. *PLoS ONE.* 2011;6(8):e22966.
- 33.** Zuccato C, Valenza M, Cattaneo E. Molecular mechanisms and potential therapeutical targets in Huntington's disease. *Physiol Rev.* 2010 Jul;90(3):905-81.

## Elektronické zdroje

1. OSEL (Objective Source E- Learning), dostupné [online] 19.3.2016 z <http://www.osel.cz/2934-huntingtonova-evolucni-rana-pod-pas.html>
2. HELP 4HD INTERNATIONAL INC. Educating The World Huntington's Disease. [online]. 19.3.2015. Dostupné z: <http://www.help4hd-international.org/understanding.html>
3. IHCWORLD, Luxol Fast Blue Staining Protocol for Myelin, dostupné [online]. 25.1.2016 z [http://www.ihcworld.com/protocol\\_database.htm](http://www.ihcworld.com/protocol_database.htm)
4. Eurocytology, Principy imunocytochemie, dostupné [online]. 6.1.2016 z <http://www.eurocytology.eu/cs/course/894>
5. Thermofischer scientific, Immunocytochemistry dostupné [online] 19.3.2016 z <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/D1306>
6. Roth J. Cesk Slov Neurol N 2010; 73/106(2): 107-123, dostupné 3.4.2016 z [online] <http://www.csnn.eu/ceska-slovenska-neurologie-clanek/huntingtonova-nemoc> 33804?confirm\_rules=1 ISSN: 1210-7859, ISSN pro on-line přístup: 1802-4041
7. Huntington disease [online]. 11.11.2015. dostupné z <http://www.angelfire.com/md/danil/huntington.html>