

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ PRÁCE

Obor č.4: Biologie

Huntingtonova choroba na myším modelu zQ175

Tereza Mandáková
Středočeský kraj

Mělník 2023

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ PRÁCE

Obor č.4: Biologie

Huntingtonova choroba na myším modelu zQ175 Huntington's disease on mouse model zQ175

Autoři: Tereza Mandáková

Škola: Gymnázium Jana Palacha, Pod Vrchem 3421, 276 01, Mělník

Kraj: Středočeský

Konzultant: Mgr. Helena Švajdová, Ign. Kateřina Vodičková Kepková
PhD., MBA

Mělník 2023

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracovala samostatně a použila jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů. Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné. Nemám závažný důvod proti zpřístupnění této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

V Mělníce dne 5.1. 2023

.....
Tereza Mandáková

Poděkování

Touto cestou bych chtěla poděkovat své lektorce Ing. Kateřině Vodičkové Kepkové, Ph.D., MBA za laskavé a trpělivé vedení a všechny čas, který mi při práci na této SOČ věnovala. Dále bych také chtěla poděkovat vedoucímu Laboratoře aplikovaných proteomových analýz Mgr. Petru Vodičkovi, Ph.D. za pomoc při konfokální mikroskopii, zpracování dat a podnětné rady. Rovněž musím poděkovat učitelům z Gymnázia Jana Palacha, zejména Mgr. Heleně Švajdové za vstřícnost a ochotu. V neposlední řadě bych chtěla také poděkovat Ústavu živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd České republiky za umožnění realizace práce.

Anotace

Huntingtonova choroba je neurodegenerativní dědičné onemocnění způsobené expanzí CAG tripletu v genu huntingtin. Tato expanze má za následek produkci aberantního proteinu. Mutovaný protein huntingtin negativně ovlivňuje synaptickou funkci a způsobuje odumírání striatálních neuronů. I přes to, že se onemocnění nejčastěji objevuje až kolem 35. roku života, mutovaný protein má velký vliv na neuronální vývoj. Tato práce se zabývá studiem vlivu mutovaného huntingtinu na neurální vývoj a synaptogenezi u fetů ve stádiu E17.5 (embryonální den 17.5) a sledování vlivu mozkového neurotrofického faktoru BDNF na synaptogenezi a synapse.

Izolace synaptosomů byla provedena z myšního striata dospělých zQ175 myši nesoucích mutovanou alelu genu huntingtin a kontrolních myši nesoucích normální verzi HTT. Pro sledování vlivu BDNF na synaptogenezi a synapse byla provedena *in vitro* kultivace nervových kmenových buněk (NSC) sebraných z *in vivo* myších fetů zQ175/Q175, Q175/Q7 a Q7/Q7.

Pomocí RT-qPCR nebyly na úrovni synapsí detekovány žádné změny mezi heterozygotní a kontrolní linií na kortexu z dospělého mozku. Na proteinové úrovni byl pomocí imunobarvení v průběhu fetálního vývoje (E17.5) detekován vyšší signál synaptických proteinů SNAP25 a SYP. U NSC na úrovni genové exprese byly zaznamenány nejvýraznější rozdíly mezi jednotlivými genotypy u genů *Dcx*, *Gfap*, *Darpp32*, *Syp* a *L1cam*. Ve vzorcích NSC, buněk spontánně diferencovaných (SD) a buněk s přidaným BDNF byly pomocí Western blotů detekovány proteiny PSD95, SNAP25 a L1CAM u kterých byly zaznamenány rozdíly v koncentraci proteinů mezi jednotlivými genotypy.

Klíčová slova

Huntingtonova choroba, synapse, synaptosomy, nervové kmenové buňky.

Annotation

Huntington's disease is a heritable neurodegenerative disorder caused by the expansion of the CAG triplet located in the huntingtin gene. This expansion leads to the production of aberrant protein. Mutated huntingtin protein has a negative influence on synaptic function and is causing neuronal death of striatal neurons. Although the disease in most cases manifests around the 35th year of life, mutated protein significantly influences neural development. This study focuses on the impact of mutated protein on neural development and synaptogenesis in E17.5 (embryonic day 17.5) foetuses and observing the influence of the brain-derived neurotrophic factor BDNF on synaptogenesis and synapses.

Synaptosomes were isolated from the striatal brain tissue of adult zQ175 mice carrying a mutated allele of the huntingtin gene and control mice carrying the regular version of HTT. To monitor the effect of BDNF on synaptogenesis and synapses, the *in vitro* cell cultivation of neural stem cells (NSC) collected from *in vivo* mice foetuses zQ175/Q175, Q175/Q7 and Q7/Q7 was performed.

By RT-qPCR, no changes were detected on a synaptic level between heterozygous and control lines in the adult brain cortex. On the protein level, a higher signal of the synaptic proteins SNAP25 and SYP was detected during fetal development (E17.5) using immunostaining. The most pronounced differences between individual genotypes in NSC at the gene expression level were recorded for the genes *Dcx*, *Gfap*, *Darpp32*, *Syp* and *L1cam*. Differences in PSD95, SNAP25 and L1CAM protein concentration between individual genotypes were recorded in samples of NSCs, spontaneously differentiated (SD) cells, and cells with added BDNF using Western blots.

Keywords

Huntington's Disease, synapses, synaptosomes, neural stem cells.

Obsah

| | |
|--|----|
| Seznam zkratk | 13 |
| Úvod..... | 8 |
| 1 Teoretický úvod..... | 10 |
| 1.1 Huntingtonova choroba | 10 |
| 1.1.1 Molekulární podstata onemocnění | 11 |
| 1.1.2 Protein huntingtin | 13 |
| 1.3 Synapse a Huntingtonova choroba | 16 |
| 1.3.1 Synapse | 16 |
| 1.3.2 Synaptosomy | 17 |
| 1.3.3 Vliv HTT a mHTT na synapse | 18 |
| 1.3.4 Synaptické proteiny | 20 |
| 1.4 Zvířecí model | 24 |
| 1.5 Nervové kmenové buňky | 25 |
| 1.5.1 NSC v <i>in vitro</i> podmínkách | 27 |
| 1.5.2 NSC a neurodegenerativní onemocnění | 28 |
| 2 Cíle práce..... | 30 |
| 3 Metody..... | 31 |
| 3.1 Izolace synaptosomů | 31 |
| 3.1.1 Sacharózový gradient za použití 0,32 M a 1,2 M sacharózy | 31 |
| 3.1.2 Izolace synaptosomů pomocí Syn-PER Synaptic Protein Extraction Reagent kit | 32 |
| 3.2 <i>In vitro</i> kultivace NSC | 33 |
| 3.3 Molekulární a biochemické metody | 34 |
| 3.3.1 Real – time qPCR | 35 |
| 3.3.2 Western bloty | 35 |
| 3.3.3 Imunofluorescence | 37 |
| 3.3.4 Analýza dat a příprava grafů | 39 |
| 4 Výsledky..... | 40 |
| 4.1 Synaptické proteiny | 40 |
| 4.1.1 Stanovení hladiny wtHTT a mHTT | 40 |
| 4.1.2 Detekce synaptických proteinů Western bloty | 41 |
| 4.1.3 Genová exprese | 46 |

| | | |
|-------|---|----|
| 4.1.4 | Imunofluorescence | 47 |
| 4.2 | Nervové kmenové buňky | 49 |
| 4.2.1 | <i>In vitro</i> kultivace NSC izolovaných z <i>in vivo</i> myších fětů zQ175 a Q7 a sledování vlivu Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) na synaptogenezi/synapse | 49 |
| 4.2.2 | Genová exprese | 49 |
| 4.2.3 | Detekce specifických synaptických proteinů pomocí western blotů | 50 |
| 4.2.4 | Imunobarvení | 51 |
| 5 | Diskuse | 55 |
| 6 | Závěr..... | 60 |
| | Použitá literatura | 62 |
| | Přílohy..... | 69 |

SEZNAM ZKRATEK

| | |
|---------|--|
| ADAM10 | z angl. A Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10 |
| APP | amyloidní prekurzorový protein |
| BCA | z angl. Bicinchoninic acid assay |
| BDNF | Neurotrofický faktor odvozený z mozku (z angl. Brain-Derived Neurotrophic Factor) |
| bFGF | Bazický fibroblastový růstový faktor (z angl. Basic fibroblast growth factor) |
| CAG | Cytosin-Adenin-Guanin (kodon kódující aminokyselinu glutamin) |
| cDNA | komplementární DNA (z angl. Complementary DNA) |
| CNPase | 2',3'-Cyklický-nukleotid 3'-fosfodiesteráza (z angl. 2',3'-Cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase) |
| CNS | centrální nervová soustava |
| CXADR | z angl. Cocksackie virus and adenovirus receptor |
| DAPI | 4',6-diamidin-2-fenylindol |
| Darpp32 | z angl. Dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein |
| Dcx | Doublecortin |
| DLG4 | z angl. discs large homolog 4 |
| DMEM | z angl. Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| DNA | Deoxyribonukleová kyselina |
| DNM2 | Dynamin 2 |
| ECL | electrochemiluminescence |
| ECM | extracelulární matrix |
| EGF | epidermální růstový faktor (z angl. epidermal growth factor) |
| EPR5526 | anti-Huntingtin protilátka |
| GABA | Kyselina gama-aminomáselná (z angl. Gamma aminobutyric acid) |

| | |
|--------|--|
| GAPDH | Glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza |
| gDNA | genomické DNA |
| GDNF | Neurotrofický faktor odvozený z gliové buněčné linie (z angl. Glial cell line-derived neurotrophic factor) |
| GFAP | z angl. glial fibrillary acidic protein |
| HAP-1 | z angl. Huntingtin Associated Protein 1 |
| HBSS | z angl. Hanks' Balanced Salt Solution |
| HD | Huntingtonova choroba (z angl. Huntington's disease) |
| HET | heterozygot |
| HOMO | homozygot |
| HRP | z angl. Horseradish peroxidase |
| HTT | Huntingtin protein (fyziologický) |
| Htt | Huntingtin gen (fyziologický) |
| KSR | z angl. KnockOut serum replacement L1cam |
| MES | z angl. 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid |
| MOPS | z angl. 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid |
| LAPA | Laboratoř aplikovaných proteomových analýz |
| L1CAM | z angl. L1 Cell Adhesion Molecule |
| MSN | středně velké trnité neurony (z angl. medium spiny neurons) |
| mHTT | mutovaný huntingtin |
| NESTIN | z angl. neuroepithelial stem cell protein |
| NMDAR | N-metyl-D-aspartát receptor |
| NSC | nervové kmenové buňky (z angl. Neural stem cells) |
| PBS | z angl. Phosphate Buffered Saline |
| poly-Q | polyglutaminový trakt |
| PCNA | z angl. Proliferating cell nuclear antigen |

| | |
|---------|--|
| PDLIM5 | z angl. PDZ and LIM domain protein 5 |
| PFA | paraformaldehyd |
| PSD95 | z angl Postsynaptic density protein 95 |
| RIPA | z angl. Radioimmunoprecipitation assay (buffer) |
| RNA | ribonukleová kyselina (z angl. Ribonucleic acid) |
| RT-qPCR | kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase (z angl. Real-Time Quantitative Polymerase chain reaction) |
| SD | spontánní diferenciacce |
| SNAP25 | z angl. Synaptosomal-Associated Protein 25 |
| SNARE | z angl. SNAP receptor |
| SOX2 | z angl. Sex determining region Y-box 2 |
| Stx1a | Syntaxin 1A |
| SVZ | subventrikulární zóna |
| Syn1 | Synapsin I |
| Syn2 | Synapsin II |
| SYP | synaptofyzin |
| Syt | Synaptotagmin 1 |
| Syx6 | Syntaxin 6 |
| TTBS | Tween Tris buffered saline |
| TUBBIII | Beta-III-Tubulin |
| VAMP1 | z angl. Vesicle Associated Membrane Protein 1 |
| VAMP2 | z angl. Vesicle Associated Membrane Protein 2 |
| WT | kontrolní linie (z angl. Wild-type) |
| wtHTT | fyziologický huntingtin |

ÚVOD

Huntingtonova choroba je dědičné neurodegenerativní onemocnění způsobené expanzí CAG tripletu v genu huntingtin. Tato expanze vede k prodloužení polyglutaminového řetězce a mutaci proteinu huntingtinu (HTT). Důsledkem této mutace je degenerace mozkových neuronů převážně v oblasti striata. Patogenní syntéza HTT ovlivňuje jedince postiženého HD v mnoha směrech. U většiny živočichů jsou projevy nemoci téměř shodné. Na buněčné úrovni má mutace HTT za následek neuronální dysfunkci a smrt z důvodu narušení mnoha mechanismů např. narušení proteostázy, transkripce a mitochondriální funkce či toxicity mutantního proteinu. Mutace tohoto proteinu narušuje interakce s mnoha asociovanými proteiny a také dochází k narušení jejich specifických biologických funkcí. HTT má také klíčovou roli v embryonálním vývoji jedince.

Jelikož první symptomy Huntingtonovy choroby se projevují až ve 3. dekádě života, zdálo se, že mutace proteinu HTT nehraje ve vývoji jedince významnou roli. Vědci se domnívali, že mutovaný HTT dokáže ve vývoji nahradit fyziologický HTT, a tedy nemá vliv na vývoj mozku. Nejnovější studie však potvrdily, že mHTT výrazně mění i velmi raná stadia vývoje mozku. Embrya (myši i lidská) nesoucí mutaci HD vykazují abnormality ve vývoji kortexu způsobené změnami v polaritě neuroepitelu, což vede k menšímu počtu proliferujících buněk a k většímu počtu nervových progenitorů. Vliv mutovaného proteinu je především prozkoumán na úrovni dospělého mozku, ale velice málo během neuronálního vývoje. Předpokládáme, že již v průběhu fetálního období vývoje mozku se projeví určitá úroveň exprese genu huntingtinu.

V odborné práci jsme zkoumali vliv mHTT na synaptické funkce během neuronálního vývoje u myši. Pro studium vlivu mutovaného huntingtinu (mHTT) na synaptogenezi a synapse jsme použili myši knock-in model zQ175, nesoucí lidskou mutovanou alelu HTT uvnitř vlastního genu pro huntingtin, s opakováním CAG tripletu okolo 179. K tomu jsme použili kontrolní myši Q7 s normálním huntingtinem. Hlavním cílem práce bylo sledovat a charakterizovat změny v synaptické funkci během neuronálního vývoje. Dílčími cíli pak byla izolace synaptosomů z myšního mozku, zkoumání vlivu mHTT v průběhu neurálního vývoje a synaptogeneze u fétů a *in vitro* kultivace nervových kmenových buněk (NSC).

Izolace synaptosomů byla provedena z myšního striata dospělých zQ175 myši nesoucích mutovanou alelu genu huntingtin a kontrolních myši nesoucích normální verzi (WT) Q7 HTT. Pro porovnání izolace byl použit sacharózový gradient a komerčně dostupný kit Syn-PER Synaptic Protein Extraction Reagent. Vliv mHTT v průběhu neurálního vývoje a synaptogeneze byl studován u fétů ve stádiu E17.5 (embryonální den 17.5). Pro sledování vlivu mozkového neurotrofického faktoru (BDNF) na synaptogenezi a synapse byla provedena *in vitro* kultivace NSC sebraných z *in vivo* myších fétů zQ175 a Q7.

Většina použitých zdrojů pochází z odborných impaktovaných publikací řádně recenzovaných časopisů. Tyto publikace byly použity z volně dostupné databáze odborných článků, PubMed¹. Většina publikací byla volně přístupná, část publikací, které nebyly volně přístupné jsem získala od své konzultantky. Webové stránky jsem použila z počátku práce k získání přehledu o daném tématu. Dalšími zdroji byly manuály k příslušným kitům, např. kit na izolaci celkové RNA, ve kterých je velice dobře popsán potřebný materiál, přesný postup práce a popis problémů, které mohou při práci vzniknout a jejich řešení. U metodik, které se nedělají kitem, např. western blot, jsem využila zavedené protokoly Laboratoře aplikovaných proteomových analýz (LAPA)².

Práce je dělena na dvě hlavní části, část teoretickou a část experimentální. V teoretické části se zabývám Huntingtonovou chorobou, jaké má toto onemocnění genetické pozadí a co způsobuje mHTT v buňce. V další kapitole se zaměřuji na synaptické proteiny a synapse, jak na ně působí HTT a mHTT. Popisuji zde náš zvířecí model, myš zQ175 a NSC na kterých byl výzkum prováděn. Mezi dvěma hlavními částmi jsou popsány cíle práce, které byly stanoveny na začátku práce. V experimentální části jsou popsány použité metody pro získání výsledných dat a samotná výsledná data, která zahrnují výsledky z izolace synaptosomů dvěma různými metodami, jejich ověření na proteinové úrovni pomocí western blotů, data z imunobarvení hlaviček fétů a data z charakterizace NSC a vlivu BDNF na úrovni genové a proteinové exprese. K této části zahrnuji i diskusi nad výslednými daty.

Abychom identifikovali synaptické změny z izolovaných synaptosomů a NSC, byla použita metoda RT-qPCR pro zjištění exprese genů a pro sledování změn v genové expresi v synapsích na úrovni zahrnující synaptické váčky, pre-synaptické a post-synaptické geny. Kvantifikace každého genu byla provedena na tři houskeeping geny. Dále byly použity Western bloty k identifikaci a kvantifikaci specifických synaptických proteinů. Následujícím krokem byla imunofluorescence pro vizualizaci cílového proteinu na histologických řezech mozku u fétů E17.5, NSC, buněk spontánně diferencovaných (SD) a pod vlivem BDNF. Všechny experimenty a následné analýzy byly provedeny za účelem zjištění projevů mutace huntingtinu v průběhu neuronálního vývoje.

Přínos práce spočívá v charakterizaci momentálně nedostatečně prozkoumaného vlivu mHTT v embryonálním období a obecně přispívá k povědomí o Huntingtonově chorobě.

1 PubMed [online]. [cit. 2023-02-05]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>

2 Laboratoř aplikovaných proteomových analýz. Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v. v. i. [online]. [cit. 2023-02-05]. Dostupné z: <https://www.iapg.cas.cz/cs/laboratore/lab-aplikovanych-proteomovych-analyz/vyzkum/>

1 TEORETICKÝ ÚVOD

1.1 Huntingtonova choroba

Huntingtonova choroba (HD) je neléčitelné autozomálně dominantně dědičné neurodegenerativní onemocnění, charakterizované motorickými dysfunkcemi, psychiatrickými poruchami a intelektuálním úpadkem v dospělosti³.

Mezi neurologické projevy patří poruchy volní hybnosti, choreatické a dystonické dyskineze, poruchy chůze, dysfagie a dysartrie. Psychické symptomy jsou necharakteristické. Dochází k nesespecifickým změnám osobnosti a chování. Dále také k afektivním a kognitivním poruchám. HD pacienti trpí také metabolickými a imunitními poruchami, chřadnutím kosterního svalstva, ztrátou hmotnosti a osteoporózou.

Nejvýraznější změny probíhají v centrální nervové soustavě (CNS). Pro Huntingtonovu chorobu je typická degenerace specifické oblasti mozku, striata – ztráta středně velkých ostnitých GABA-ergních neuronů (medium spiny neurons, MSN), které tvoří 95% neuronů této oblasti. Jedná se o projekční neurony, které slouží k propojení striata s ostatními strukturami mozku. Nejprve odumírají striatální neurony produkující GABA a enkefaliny, na kterých jsou uloženy D2 dopaminové receptory. V dalších fázích odumírají striatální neurony s D1 dopaminovými receptory. V důsledku odumírání buněk dochází k atrofii striata. Postupně jsou postiženy i další části mozku. Výrazné neuropatologické změny byly pozorovány i v mozkové kůře (kortexu), thalamu a mozečku. Onemocnění vede k marasmu a doba přežití je 15-20 let od počátku onemocnění⁴.

Prevalence HD je přibližně 5-10 na 100 000 obyvatel. Velmi nízká prevalence HD je v asijských zemích. Průměrná prevalence v Japonsku, Jižní Koreji a na Tchaj-wanu byla od roku 1995 0,42 na 100 000 obyvatel. Pro srovnání průměrná prevalence ve stejném období v Austrálii, Evropě (včetně UK) a Severní Americe byla 9,71 na 100 000 obyvatel⁵. HD se častěji vyskytuje v zemích, do kterých proudila migrace z Evropy⁶. Nejnižší prevalence choroby byla zjištěna v Jižní Africe (0-0,5/100 000) a v Zimbabwe

3 BANO, D et al. Neurodegenerative processes in Huntington's disease. *Cell Death & Disease*. 2011, roč. 2, č. 11. DOI: 10.1038/cddis.2011.112

4 JAN ROTH. *Huntingtonova nemoc*. . 2010.

5 RAWLINS, Michael D. et al. *The Prevalence of Huntington's Disease*. *Neuroepidemiology*. 2016, roč. 46, č. 2. DOI: 10.1159/000443738

6 JAN ROTH. *Huntingtonova nemoc*. . 2010.

(1,00/100 000). To může být způsobeno špatným zjištěním případů, nebo neadekvátními diagnózami. Rozdíl v prevalenci onemocnění mezi etnickými skupinami souvisí s genetickými rozdíly v genu *HTT*. Populace s vysokou prevalencí mají delší průměrné opakování CAG. U Evropanů je průměrné opakování 18,4-18,7, zatímco u Asiatů 16,9-17,4⁷.

1.1.1 Molekulární podstata onemocnění

Gen huntingtin (*HTT*) je umístěn na krátkém raménku 4. chromozomu a obsahuje 67 exonů. V prvním exonu se nachází CAG (cytosin – adenin – guanin) repetice kódující aminokyselinu glutamin (Gln, Q). U zdravých lidí *HTT* gen obvykle obsahuje 6 až 35 repetic CAG. Onemocnění je způsobené nadměrnou expanzí CAG tripletu, která vede k produkci mutovaného proteinu (mHTT)⁸. Kritická hranice pro onemocnění je 40 repetic, tzn. při 40 a více tripletech je zcela jisté, že jedinec onemocní. Při přenosu mutovaného genu *HTT* z jedné generace na další často dochází k prodloužení CAG trinukleotidové repetice. Nástup a závažnost patologie přímo souvisí s počtem CAG repetic (**Tab. 1**). Větší počet repetic je obvykle spojen s časnějším nástupem příznaků onemocnění. U osob s HD může délka dosahovat až 250 opakování⁹. Expanze CAG segmentu vede k produkci abnormálně dlouhé verze proteinu huntingtin. Takto prodloužený protein je štěpen na menší fragmenty. Zejména N-terminální fragmenty jsou toxické, hromadí se v neuronech a spojují se s dalšími proteiny za tvorby inkluzí (**Obr.1**), čímž narušují správnou funkci těchto buněk. Onemocnění se projevuje mezi 30. – 50. rokem a obě pohlaví jsou postižena stejně. Existují i juvenilní formy a HD s pozdním nástupem, ale ty jsou vzácné (5 % případů).

Tabulka 1 CAG repetice v genu huntingtinu a její expanze

| Člověk | CAG počet | Nástup nemoci | Symptomy |
|------------------------------|-----------|-------------------------|---------------------------------|
| Fyziologický počet repetic | 6-26 | - | - |
| Intermediální počet repetic | 27-35 | - | - |
| HD s pozdním nástupem nemoci | 36-39 | Nástup nemoci ve stáří. | 5 % případů. Neúplná penetrace. |

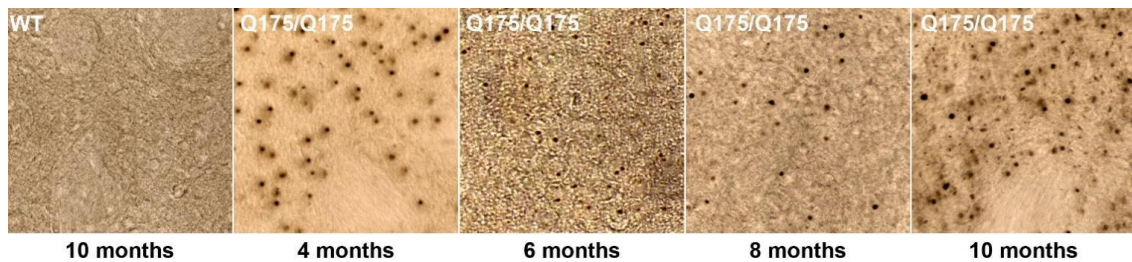
7 MCCOLGAN, P. a S. J. TABRIZI. *Huntington's disease: a clinical review*. European Journal of Neurology. 2018, roč. 25, č. 1. DOI: 10.1111/ene.13413

8 JAN ROTH. *Huntingtonova nemoc*.

9 NANCE, M. A. et al. *Analysis of a very large trinucleotide repeat in a patient with juvenile Huntington's disease*. Neurology. 1999, roč. 52, č. 2. DOI: 10.1212/WNL.52.2.392

| | | | |
|------------------|-----------|--|--|
| HD adultní forma | 40–59 | Většinou po 35. roku. | 90 % případů HD. Triáda symptomů (chorea, kognitivní a psychiatrické symptomy). |
| Juvenilní forma | 60 a více | Do 20 let věku. Kolem a nad 100 CAG: malé děti – věk 2-5 let. | 5 % případů. Především psychiatrické projevy, ataxie a dyskineze. Chybí chorea, hlavně u malých dětí. |
| Myš | | | |
| Normální počet | 7 | - | - |
| zQ175 | 190 | U homozygotů: Q175/Q175 inkluze ve 4 měsících (Obr.1). U heterozygotů Q175/Q7 inkluze v 6 měsících. | U homozygotů (Q175/Q175) je ve věku 4 týdnů pozorován nedostatečně silný úchop. V 8 týdnech jsou pozorovány motorické abnormality. Ve 33 týdnech dochází k poruše schopnosti lezení. Neurologické změny se vyskytují kolem 33. týdne u cca 70 % s projevem třesu těla. Tento projev je zřejmý téměř u všech zvířat kolem 93 týdne. Od 3 měsíce je pozorována ztráta hmotnosti a atrofie mozku pomocí MRI ¹⁰ . Snížení kognitivních funkcí kolem 1 roku. Smrt nastává mezi 74-104 týdny. |

¹⁰ MRI „magnetic resonance imaging“ – magnetická rezonance.



Obr. 1 *Specifické značení jaderných mHTT inkluzí protilátkou MW8. Jaderné inkluze (černé tečky) se nacházejí ve striatu myši zQ175/Q175, kde jsou pozorované od 4 měsíce. U kontrolních myši (wild type, WT) se inkluze nenacházejí. Autor imunobarvení a fotografie: Petr Vodička.*

1.1.2 Protein huntingtin

HTT protein je složen z 3100 aminokyselin s molekulovou hmotností 348 kDa. Tento protein je kódovaný *HTT* genem (IT15). Ve své struktuře je polymorfní, s různou délkou poly-Q traktu (sekvence několika glutaminových jednotek) v proteinu¹¹. Huntingtin přímo interaguje s dalšími proteiny, které jsou používány při transkripci, transportu a buněčné signalizaci. V buňkách byl detekován v jádře, mitochondriích a endoplazmatickém retikulu. Funkce tohoto proteinu není zatím plně známá, ale bylo prokázáno, že má důležitou roli v nervových buňkách a je nezbytný pro normální vývoj embrya/fétu, vývoj mozku a postnatální vývoj¹². V preimplantační fázi vývoje (2,5 dne) je huntingtin detekován v jádrech. Během stádia blastocysty (3,5 dne) z jader zmizí a v dalších fázích vývoje je detekován v cytoplazmě a společně s mitotickými vřeténky, což naznačuje, že huntingtin je potřebný pro mitózu v cytoplazmě¹³. Cílené narušení genu (knock-out) způsobuje u myši vývojovou retardaci a embryonální letalitu mezi 8,5. a 10,5. dnem březosti¹⁴. K tomu dochází kvůli apoptóze a nedostatečnému vezikulárnímu

11 NANCE, M. A. et al. *Analysis of a very large trinucleotide repeat in a patient with juvenile Huntington's disease.*

12 GOEHLER, Heike et al. *A Protein Interaction Network Links GIT1, an Enhancer of Huntingtin Aggregation, to Huntington's Disease.* Molecular Cell. 2004, roč. 15, č. 6.
DOI: 10.1016/j.molcel.2004.09.016

13 JEONG, Sung-Jin et al. *Huntingtin is localized in the nucleus during preimplantation embryo development in mice.* International Journal of Developmental Neuroscience. 2006, roč. 24, č. 1.
DOI: 10.1016/j.ijdevneu.2005.10.001

14 ZEITLIN, Scott et al. *Increased apoptosis and early embryonic lethality in mice nullizygous for the Huntington's disease gene homologue.* Nature Genetics. 1995, roč. 11, č. 2. DOI: 10.1038/ng1095-155

transportu¹⁵. HTT se hojně nachází v mozku, ale i v jiných částech těla, jako je kůže a varlata¹⁶.

Mutovaný huntingtin se od normálního huntingtinu vlivem mutace liší v biochemických vlastnostech, primární struktuře, post-translačním sbalením proteinu a finální lokalizaci v buňce. Pro buňku se tak stává patogenním. Mutace způsobuje poruchy při interakci s jinými proteiny, což vede k negativnímu ovlivnění buněčných pochodů a narušení homeostáze buňky.

Během post-translačních úprav dochází ke štěpení proteinu za vzniku N-terminálních fragmentů, z kterých po oligomeraci a agregaci vznikají větší komplexy – inkluze. Inkluze se kumulují v cytoplazmě, nebo se přemístí do jádra. V jádře brání transkripci a tím způsobují celkové narušení proteostáze buňky¹⁷. Také způsobuje změny v proteinovém transportu neuromodulátorů (neurofinů), jako je mozkový neurotrofický faktor (Brain-derived neurotrophic factor, BDNF), který je důležitý pro přežití a růst neuronů¹⁸. Zuccato a Cattaneo, 2007 poukazují na důležitost BDNF transportovaného z kortexu, který je důležitý pro kortikostriální synapse, a to jak z hlediska udržení jejich správné aktivity, tak přežití MSN¹⁹. Slouží jako modulátor neurotransmiterů a podílí se na neuronální plasticitě, což je nezbytné pro učení a paměť²⁰. Nedostatek BDNF může mít za následek změny cytoskeletálních proteinů, snížení synaptogeneze a presynaptické plasticity, nebo vytvoření abnormálních dendritických trnů²¹. Výrazně snížená hladina

15 REINER, Anton et al. *Wild-Type Huntingtin Plays a Role in Brain Development and Neuronal Survival*. *Molecular Neurobiology*. 2003, roč. 28, č. 3. DOI: 10.1385/MN:28:3:259

16 HTT huntingtin [Homo sapiens (human)] [online]. 2022. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3064>

17 MENALLED, Liliana B a Marie-Françoise CHESSELET. *Mouse models of Huntington's disease*. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2002, roč. 23, č. 1. DOI: 10.1016/S0165-6147(00)01884-8

18 BARRON, Jessica C., Emily P. HURLEY a Matthew P. PARSONS. *Huntingtin and the Synapse*. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2021, roč. 15. DOI: 10.3389/fncel.2021.689332

19 ZUCCATO, C a E CATTANEO. *Role of brain-derived neurotrophic factor in Huntington's disease*. *Progress in Neurobiology*. 2007, roč. 81, č. 5–6. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2007.01.003

20 BATHINA, Siresha a Undurti N. DAS. *Brain-derived neurotrophic factor and its clinical implications*. *Archives of Medical Science*. 2015, roč. 6. DOI: 10.5114/aoms.2015.56342

21 NITHIANANTHARAJAH, J. a A.J. HANNAN. *Dysregulation of synaptic proteins, dendritic spine abnormalities and pathological plasticity of synapses as experience-dependent mediators of cognitive and psychiatric symptoms in Huntington's disease*. *Neuroscience*. 2013, roč. 251. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2012.05.043

BDNF byla prokázána u HD pacientů v oblasti striata. Toto snížení může mít vliv na progres nemoci a přispívat k jejím projevům²².

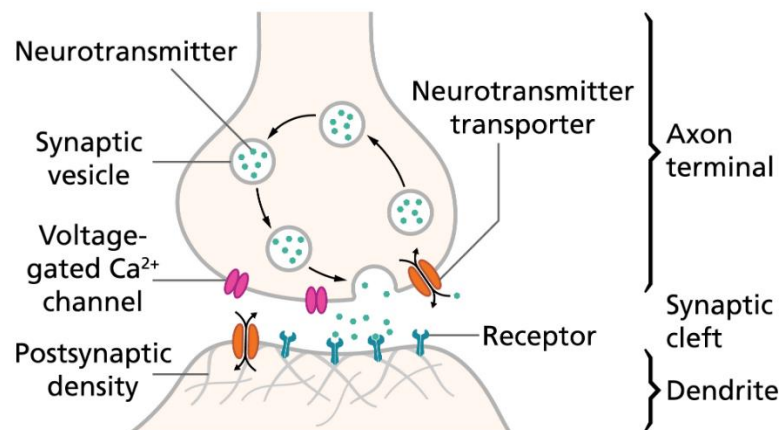
22 ZUCCATO, C a E CATTANEO. *Role of brain-derived neurotrophic factor in Huntington's disease.*

1.3 Synapse a Huntingtonova choroba

1.3.1 Synapse

Neurony mezi sebou musí komunikovat, a to se děje pomocí synapsí. Synapse jsou místem buněčného spojení. Přenášejí informace mezi dvěma neurony, nebo mezi receptorovými buňkami a efektorovými buňkami. Každý neuron má přibližně 1000 synaptických zakončení, ale synapsí může být na jednom postsynaptickém neuronu i několik desítek tisíc²³.

Synapse máme dvojího typu: elektrické a chemické. Elektrické jsou vzácné, jedná se o spojení neuronů, které probíhá jejich vzájemným propojením přes „gap junctions“²⁴. Většinu synapsí tvoří synapse chemické, které komunikují prostřednictvím neurotransmiterů²⁵. Chemické synapse jsou tvořeny presynaptickou částí axonu jednoho



Obr. 2 Převzato z *Action potentials and synapses*. In: *Queensland Brain Institute* [online].

23 SÜDHOF, Thomas C. *The cell biology of synapse formation*. *Journal of Cell Biology*. 2021, roč. 220, č. 7. DOI: 10.1083/jcb.202103052

24 Gap junctions jsou mezibuněčné kanály umožňující přenos iontů nebo malých molekul mezi buňkami.

25 Neurotransmitter je nízkomolekulární chemická látka sloužící k přenosu nervového vzruchu např. kyselina glutamová, serotonin, dopamin.

neuronu a postsynaptickou částí většinou dendritu, ale může to být tělo nebo axon jiného neuronu, které jsou odděleny synaptickou štěrbinou²⁶.

Presynaptická část se nazývá synaptický knoflík a obsahuje synaptické váčky s neurotransmitery. Neurotransmitery se uvolňují ze synaptických váček vlivem akčního potenciálu a přes synaptickou štěrbinu se dostávají na postsynaptickou část neuronu, obvykle dendritickou membránu, kde se navážou na receptory. Morfologie synaptických váček se odvíjí od neurotransmiteru, který obsahují. Synaptické váčky v excitačních synapsích jsou kulovité a v inhibičních oválné. Neurotransmitery se ze synaptických váček uvolňují do synaptické štěrbině v tzv. aktivní zóně. Poté co se neurotransmitery navážou na postsynaptickou část neuronu, dochází k převodu chemického signálu na signál elektrický a následnou odezvu v postsynaptické buňce²⁷.

Synapse vznikají během procesu nazývaného synaptogeneze. U zdravého člověka dochází k synaptogenezi po celý život. K největšímu nárůstu počtu synapsí dochází během novorozeneckého období až do prvních dvou let po narození²⁸.

1.3.2 Synaptosomy

Pro studium synapsí, jejich fyziologických funkcí, ale i patologických změn se používají synaptosomy. Synaptosomy jsou subcelulární frakce izolované z nervových zakončení. Obsahují kompletní presynaptickou část synapse, včetně mitochondrií a synaptických vezikul, spolu s postsynaptickou membránou a postsynaptickou denzitou (**Obr.3**). Také lze nazvat „odstříhnutá nervová zakončení“, protože lipidové dvojvrstvy se znovu přirozeně spojí, poté co jsou odtržena zakončení axonů. Lze je získat homogenizací a gradientovou centrifugací mozkové tkáně²⁹. Jelikož po centrifugaci a homogenizaci všechny molekulární mechanismy pro uvolňování, navazování a ukládání

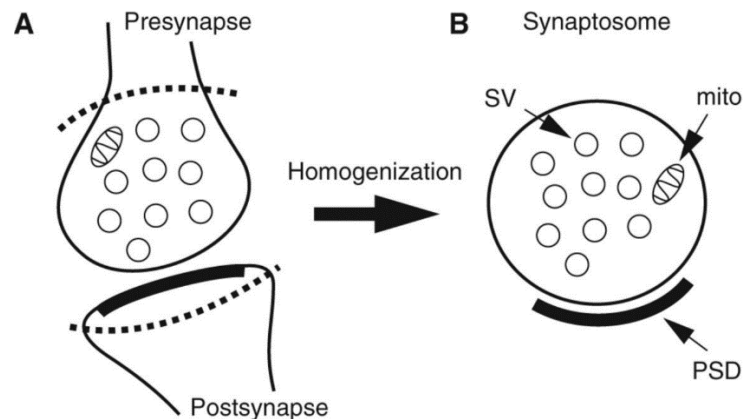
26 SÜDHOF, Thomas C. *The cell biology of synapse formation*.

27 SHIN, Mimi et al. *Electrochemistry at the Synapse*. Annual Review of Analytical Chemistry. 2019, roč. 12, č. 1. DOI: 10.1146/annurev-anchem-061318-115434

28 QI, Cai et al. *Molecular mechanisms of synaptogenesis*. Frontiers in Synaptic Neuroscience. 2022, roč. 14. DOI: 10.3389/fnsyn.2022.939793

29 WHITTAKER, Vp, Ia MICHAELSON a Rja KIRKLAND. *The separation of synaptic vesicles from nerve-ending particles ('synaptosomes')*. Biochemical Journal. 1964, roč. 90, č. 2. DOI: 10.1042/bj0900293

neurotransmiterů zůstávají neporušeny, používají se synaptosomy často ke studiu synaptické fyziologie a dysfunkce³⁰.



Obr. 3 Synaptosom, převzato z publikace od EVANS, Gareth J.O., 2015, *The synaptosome as a model system for studying synaptic physiology*³¹.

1.3.3 Vliv HTT a mHTT na synapse

Normální nepatogenní forma HTT (wtHTT) je nezbytná pro synaptickou neurotransmisi, tedy přenos nervového vzruchu mezi neurony. Ovlivňuje axonální transport synaptických proteinů z a do terminálních knoflíků, dendritický transport, uvolňování neurotransmiterů, recyklaci endocytických vezikul a lokalizaci či recyklaci postsynaptických receptorů. WtHTT funguje jako proteinové lešení váže na sebe další proteiny pro zrychlení axonálního přenosu a upevnění receptorů na plazmatické membráně. Ovlivňuje autofagii, což je důležitý regulátor synaptické homeostázy. Dále také ovlivňuje komunikaci mezi synapsí a jádrem regulací transkripčních faktorů³².

Během presynaptické endocytózy wtHTT interaguje s klíčovými presynaptickými proteiny a reguluje endocytózu synaptických vezikul. V presynapsi se nachází pouze omezený počet synaptických vezikul, které mohou být během dlouhodobé nervové aktivity vyčerpány. Aby nedošlo k jejich vyčerpání, jsou doplňovány během nervové aktivity lokální endocytózou zprostředkovanou proteinem klathrinem. WtHTT interaguje

30 BAI, Fengju a Frank A. WITZMANN. *Synaptosome Proteomics*. In: BERTRAND, Eric a Michel FAUPEL, eds. *Subcellular Proteomics*. 43. Dordrecht: Springer Netherlands, 2007. DOI: 10.1007/978-1-4020-5943-8_6

31 EVANS, Gareth J.O. *The Synaptosome as a Model System for Studying Synaptic Physiology*. Cold Spring Harbor Protocols. 2015, roč. 2015, č. 5. DOI: 10.1101/pdb.top074450

32 BARRON, Jessica C., Emily P. HURLEY a Matthew P. PARSONS. *Huntingtin and the Synapse*. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2021, roč. 15. DOI: 10.3389/fncel.2021.689332

s klathrinovým adaptorovým proteinem AP-2 a slouží jako docking protein, který pomáhá získávat AP-2 do membrány. Vlivem mHTT dochází ke ztrátě docking funkce wtHTT, což má za následek snížení AP-2 na membráně a zhoršuje se tím endocytóza. WtHTT také interaguje s proteinem ADAM10. ADAM10 je transmembránová proteáza štěpící amyloidní prekurzorový protein APP. Interaktomy wtHTT a ADAM10 mají společné proteiny, mezi které patří protein piccolo, nezbytný pro údržbu a recyklaci synaptických vezikul. Snížením hladiny wtHTT nebo expanzí patogenního HTT dochází k narušení ADAM10/HTT/piccolo komplexu, což má za následek vyčerpání synaptických vezikul ze snadno uvolnitelných zásobních vezikul. Dalším následkem narušení tohoto komplexu je negativní vliv na presynaptickou homeostázi. Myši, u kterých byl gen HTT knock-outován (umlčen) se pomaleji zotavují ze synaptické deprese³³.

Dalším dějem probíhajícím v presynaptické části synapse je exocytóza. Proteiny tvořící komplexy s mHTT jsou základními složkami mechanismu pro uvolňování exocytárních neurotransmiterů. WtHTT se váže s proteiny, které snižují rychlost exocytózy, množství glutamátu uvolňovaného v exitačních neuronech, nebo usnadňují presynaptické uvolňování transmiterů. V buňkách HeLa³⁴ se wtHTT podílí na fúzi sekrečních váček s plazmatickou membránou během exocytózy. Presynaptická exprese se podílí na dlouhodobé synaptické plasticitě. A i přes to, že účinky wtHTT na exocytózu zatím nejsou plně pochopeny, bylo zjištěno, že exprese mHTT inhibuje tento proces³⁵.

Jednou z dobře popsaných funkcí wtHTT je intracelulární transport. Komplexy, které jsou tvořeny s wtHTT zajišťují anterográdní (směrem k synapsi) a retrográdní (směrem k tělu buňky) transport. Patogenní polyQ expanze narušuje tento axonový transport. Významný anterográdní transport, ve kterém wtHTT participuje je dodávání BDNF do striata z presynaptických neuronů z kortexu. Dodávání tohoto faktoru do striata je nezbytné, jelikož striatum samo o sobě produkuje pouze malé množství. Dále také wtHTT zajišťuje anterográdní transport prekurzorů synaptických vezikul, což je nutné pro uvolňování z presynapse³⁶.

33 BARRON, Jessica C., Emily P. HURLEY a Matthew P. PARSONS. *Huntingtin and the Synapse*. Frontiers in Cellular Neuroscience. 2021, roč. 15. DOI: 10.3389/fncel.2021.689332

34 HeLa buňky – jedná se nesmrtelnou (buňky mají neomezenou schopnost se dělit) linii epitelových buněk maligního karcinomu děložního čípku, které byly odebrány Henrietě Lacksové v roce 1951.

35 BARRON, Jessica C., Emily P. HURLEY a Matthew P. PARSONS. *Huntingtin and the Synapse*. Frontiers in Cellular Neuroscience. 2021, roč. 15. DOI: 10.3389/fncel.2021.689332

36 BARRON, Jessica C., Emily P. HURLEY a Matthew P. PARSONS. *Huntingtin and the Synapse*. Frontiers in Cellular Neuroscience. 2021, roč. 15. DOI: 10.3389/fncel.2021.689332

Huntingtin je také velmi důležitý pro funkci postsynapse. Spolu s HAP1 reguluje transport receptorů. Dále také s HAP1 a PSD95 reguluje stabilizaci receptoru na postsynaptickém neuronu ³⁷.

1.3.4 Synaptické proteiny

Jedním z charakteristických znaků synaptických specializací je jejich závislost na vysoce organizovaných komplexech proteinů, které se navzájem ovlivňují. Ztráta nebo modifikace klíčových synaptických proteinů ovlivňuje vlastnosti celého komplexu, což v konečném důsledku ovlivňuje synaptickou funkci ³⁸. V následujících kapitolách budou popsány základní proteiny interagující s proteinem huntingtin, jejich vlastnosti a jakým způsobem ovlivňují synaptickou funkci/dysfunkci.

Postsynaptic density protein 95

Postsynaptic density protein 95 (PSD95), který je u lidí kódovaný genem *DLG4* je nejhojnějším proteinem v synaptické denzitě ³⁹. Jedná se o hlavní postsynaptický scaffolding protein ⁴⁰. Interaguje s mnoha proteiny díky PZD doméně, což je běžná strukturální doména aminokyselin důležitá pro formování a modulaci synaptických spojení ⁴¹. Hlavní funkcí PSD95 je regulace přenosu a lokalizace glutamátových

37 Ibid.; MCKINSTY, S. U. et al. *Huntingtin Is Required for Normal Excitatory Synapse Development in Cortical and Striatal Circuits*. *Journal of Neuroscience*. 2014, roč. 34, č. 28.
DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4699-13.2014

38 ANTONUCCI, Flavia et al. *SNAP-25, a Known Presynaptic Protein with Emerging Postsynaptic Functions*. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*. 2016, roč. 8. DOI: 10.3389/fnsyn.2016.00007

39 STATHAKIS, Dean G. et al. *Human Postsynaptic Density-95 (PSD95): Location of the Gene (DLG4) and Possible Function in Nonneural as Well as in Neural Tissues*. *Genomics*. 1997, roč. 44, č. 1.
DOI: 10.1006/geno.1997.4848; YOO, Ki-Seo et al. Postsynaptic density protein 95 (PSD-95) is transported by KIF5 to dendritic regions. *Molecular Brain*. 2019, roč. 12, č. 1. DOI: 10.1186/s13041-019-0520-x

40 PARSONS, Matthew P. et al. *Bidirectional Control of Postsynaptic Density-95 (PSD-95) Clustering by Huntingtin*. *Journal of Biological Chemistry*. 2014, roč. 289, č. 6. DOI: 10.1074/jbc.M113.513945

41 KEITH, Dove. *Excitation control: balancing PSD-95 function at the synapse*. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2008, roč. 1. DOI: 10.3389/neuro.02.004.2008

receptorů⁴². Má důležitou roli při vývoji synapsí, v synaptické plasticitě a při podpoře zrání synapsí⁴³.

PSD95 má klíčovou roli v interakci s mHTT. Přítomnost mHTT oslabuje tuto interakci a také chybně lokalizuje PSD95 do mimosynaptických míst. Chybnou lokalizaci PSD95 může mHTT negativně ovlivnit buněčnou signalizaci NMDA a NMDAR receptorů (glutamátové receptory a i proteinové iontové kanály v nervové buňce)⁴⁴.

Synaptosomal associated protein 25

Synaptosomal associated protein 25 (SNAP 25) je protein s molekulovou hmotností 25 kDa. Tento protein je u lidí kódovaný genem Snap25 na chromosomu 20p12.2⁴⁵. SNAP25 je součástí proteinového komplexu SNARE, který se podílí na uvolňování neurotransmiterů během synaptického přenosu. V presynaptické části se podílí na exocytóze synaptických vezikul a krátkodobé plasticitě synapse. Důležitou roli může mít také v postsynapsi, jelikož udržuje rovnováhu mezi glutamátovými receptory na dané synapsi a tím pádem zajišťuje správnou funkci synapse i na postsynaptické části⁴⁶. Nezbytný je také pro embryonální vývoj, jelikož významně ovlivňuje synaptogenezi a růst axonů⁴⁷.

Synaptofyzin

Synaptofyzin (SYP) nebo také hlavní synaptický vezikulární protein p38 je integrální membránový protein nacházející se v synaptických neurosekrečních váčcích. Molekulová hmotnost tohoto proteinu je 38kDa a kóduje ho gen SYP. Tento protein není

42 YOO, Ki-Seo et al. *Postsynaptic density protein 95 (PSD-95) is transported by KIF5 to dendritic regions*.

43 RUBENSTEIN, John L. R. a Pasko RAKIC, eds. *Comprehensive developmental neuroscience: patterning and cell type specification in the developing CNS and PNS*. Amsterdam: Elsevier/Academic Press, 2013.; YOO, Ki-Seo et al. *Postsynaptic density protein 95 (PSD-95) is transported by KIF5 to dendritic regions*.

44 PARSONS, Matthew P. et al. *Bidirectional Control of Postsynaptic Density-95 (PSD-95) Clustering by Huntingtin*.

45 MAGLOTT, D. R. et al. *Radiation hybrid mapping of SNAP, PCSK2, and THBD (human Chromosome 20p)*. Mammalian Genome. 1996, roč. 7, č. 5. DOI: 10.1007/s003359900120

46 ANTONUCCI, Flavia et al. *SNAP-25, a Known Presynaptic Protein with Emerging Postsynaptic Functions*.

47 WINKLE, Cortney Chelise a Stephanie L. GUPTON. *Membrane Trafficking in Neuronal Development: Ins and Outs of Neural Connectivity*. In: International Review of Cell and Molecular Biology. 322. Elsevier, 2016. DOI: 10.1016/bs.ircmb.2015.10.003

nezbytně nutný pro přenos neurotransmiterů. Přesná funkce tohoto proteinu nebyla zatím odhalena, ale bylo prokázáno, že interaguje s nezbytným vezikulárním proteinem synaptobrevinem 2 (VAMP2). Myši, u kterých byl gen SYP inaktivován se normálně vyvíjely, pouze u nich byly detekovány nižší hladiny synaptobrevinu⁴⁸. Jelikož je synaptofyzin přítomný téměř ve všech axonech nervových buněk, slouží jako marker těchto buněk.

U pacientů s HD byl detekován pokles hladiny synaptofyzinu. To je nejspíše způsobeno ztrátou středně velkých trnitých neuronů ve striatu, nebo degenerativním procesem, kterým procházejí striatální aferentní axonová zakončení, když ztratí své striatální cílové buňky – středně velké trnité neurony⁴⁹.

Synaptobreviny

Synaptobreviny, známe také jako vesicle – associated membrane protein (VAMP1, VAMP2) patří mezi SNARE proteiny. Mají podobnou strukturu a podílejí se na fúzi a dokování synaptických vezikul s presynaptickou membránou, pro kterou jsou nezbytné⁵⁰. Interagují se synaptickými membránovými proteiny syntaxinem I a SNAP25 za vzniku komplexu, který předchází exocytóze. Synaptobrevin také interaguje s vezikulárním proteinem synaptofyzinem⁵¹. MHTT narušuje správnou funkci synaptobrevinů produkcí toxinů, které VAMP1/VAMP2 deaktivují. Podobně je tomu tak u proteinu SNAP25⁵².

48 MCMAHON, H T et al. *Synaptophysin, a major synaptic vesicle protein, is not essential for neurotransmitter release*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1996, roč. 93, č. 10. DOI: 10.1073/pnas.93.10.4760

49 GOTO, S. a A. HIRANO. *Synaptophysin expression in the striatum in Huntington's disease*. Acta Neuropathologica. 1990, roč. 80, č. 1. DOI: 10.1007/BF00294227

50 POLAVARAPU, Kiran et al. *Recessive VAMP1 mutations associated with severe congenital myasthenic syndromes – A recognizable clinical phenotype*. European Journal of Paediatric Neurology. 2021, roč. 31. DOI: 10.1016/j.ejpn.2021.02.005

51 ADAMS, Daniel J., Christopher P. ARTHUR a Michael H. B. STOWELL. *Architecture of the Synaptophysin/Synaptobrevin Complex: Structural Evidence for an Entropic Clustering Function at the Synapse*. Scientific Reports. 2015, roč. 5, č. 1. DOI: 10.1038/srep13659

52 PECHO-VRIESELING, Eline et al. *Transneuronal propagation of mutant huntingtin contributes to non-cell autonomous pathology in neurons*. Nature Neuroscience. 2014, roč. 17, č. 8. DOI: 10.1038/nn.3761

L1CAM

L1CAM je transmembránový protein patřící do L1 proteinové rodiny. Jedná se o adhezní molekulu, která má důležitou úlohu v průběhu vývoje mozku, migraci a diferenciaci buněk, růstu neuritů, synaptické plasticitě a tvorbě synapsí ve spojení s ankyrin vazebnou doménou⁵³⁵⁴. L1CAM má několik domén vystupujících na povrch buňky: 6 imunoglobulinových, 5 fibronektinových (FNIII). Dále má doménu transmembránovou a intracelulární na kterých se nacházejí štěpná místa. Délka proteinu je 200-220 kDa⁵⁵. Vyblokování nebo mutace v L1CAM vede k poruchám během vývoje mozku, vzniká takzvaný CRASH syndrom, který se projevuje mnoha neurologickými defekty jako je hydrocefalus, retardace, abnormality v růstu axonů a myelinizací⁵⁶. Tento protein prodělává mnoho štěpení různými enzymy, kdy vznikají různě dlouhé fragmenty. Štěpený L1CAM může být translokován do jádra. L1CAM protein z NSC izolovaných z fétů E17.5 vykazuje na western blotu mnoho fragmentů na rozdíl od počtu fragmentů izolovaných ze synaptosomů, kde byla zaznamenána plná forma L1CAM a fragment mezi 70-80 kDa⁵⁷.

53 KUDUMALA, Sirisha et al. *Differential Effects of Human L1CAM Mutations on Complementing Guidance and Synaptic Defects in Drosophila melanogaster*. PLoS ONE. 2013, roč. 8, č. 10. DOI: 10.1371/journal.pone.0076974

54 ANGO, Fabrice et al. *Ankyrin-Based Subcellular Gradient of Neurofascin, an Immunoglobulin Family Protein, Directs GABAergic Innervation at Purkinje Axon Initial Segment*. Cell. 2004, roč. 119, č. 2. DOI: 10.1016/j.cell.2004.10.004

55 KIEFEL, Helena et al. *L1CAM: A major driver for tumor cell invasion and motility*. Cell Adhesion & Migration. 2012, roč. 6, č. 4. DOI: 10.4161/cam.20832

56 FRANSEN, Erik et al. *CRASH Syndrome: Clinical Spectrum of Corpus Callosum Hypoplasia, Retardation, Adducted Thumbs, Spastic Paraparesis and Hydrocephalus Due to Mutations in One Single Gene, L1*. European Journal of Human Genetics. 1995, roč. 3, č. 5. DOI: 10.1159/000472311

57 STOYANOVA, Irina I. a David LUTZ. *Functional Diversity of Neuronal Cell Adhesion and Recognition Molecule L1CAM through Proteolytic Cleavage*. Cells. 2022, roč. 11, č. 19. DOI: 10.3390/cells11193085

1.4 Zvířecí model

Pro odhalení příčin neurodegenerativních lidských nemocí na molekulárně genetické úrovni se používají mnohé zvířecí modely, které napomáhají pochopit základní mechanismy dané choroby. Nabízejí také bezpečné testování léčebných procesů.

Jelikož HTT gen je evolučně velmi konzervovaný u všech obratlovců, zavedení mutace, která způsobuje HD do genomu živočichů vede k rozvoji symptomů podobných těm lidským⁵⁸.

Pro studium patogeneze HD bylo vyvinuto mnoho zvířecích modelů zahrnujících nejen myši, prasata⁵⁹, ovce⁶⁰, primáty⁶¹, ale i drozofily⁶². Často se používá myší knock – in linie, což znamená, že požadovaná genová sekvence těchto zvířat je vyměněna jedna za jednu trans genem, nebo jsou přidány genové sekvence, které se nachází v lokusu⁶³. Knock-in s plnou délkou Htt nejlépe napodobují fenotyp lidského onemocnění z hlediska genetiky, jelikož exprese mHtt se vyskytuje ve vhodném genetickém a proteinovém kontextu. Myší modely, u kterých byla rozšířená repetice CAG vložena do myšího *Htt* mají obvykle slabší behaviorální, histologické a molekulární fenotypy než transgenní modely, které nadměrně exprimují mutantní HTT⁶⁴. ZQ175 Knock-in myši byly vytvořeny inzercí lidské sekvence obsahující 140 repetit CAG do myšího genu pro HTT. Po překřížení a selektivním šlechtění se počet repetit ustálil kolem 190⁶⁵.

58 PALLOVÁ, Daniela et al. *Huntingtonova choroba a zvířecí modely*. . roč. 2014, č. 6.

59 YAN, Sen et al. *A Huntingtin Knockin Pig Model Recapitulates Features of Selective Neurodegeneration in Huntington's Disease*. *Cell*. 2018, roč. 173, č. 4. DOI: 10.1016/j.cell.2018.03.005

60 HUNTINGTON'S DISEASE SHEEP COLLABORATIVE RESEARCH GROUP et al. *Further Molecular Characterisation of the OVT73 Transgenic Sheep Model of Huntington's Disease Identifies Cortical Aggregates*. *Journal of Huntington's Disease*. 2013, roč. 2, č. 3. DOI: 10.3233/JHD-130067

61 YANG, Shang-Hsun et al. *Towards a transgenic model of Huntington's disease in a non-human primate*. *Nature*. 2008, roč. 453, č. 7197. DOI: 10.1038/nature06975

62 FARAGÓ, Anikó, Nóra ZSINDELY a László BODAI. *Mutant huntingtin disturbs circadian clock gene expression and sleep patterns in Drosophila*. *Scientific Reports*. 2019, roč. 9, č. 1. DOI: 10.1038/s41598-019-43612-w

63 The Jackson Laboratory [online]. Dostupné z: <https://www.jax.org/strain/027410>

64 PENG, Qi et al. *Characterization of Behavioral, Neuropathological, Brain Metabolic and Key Molecular Changes in zQ175 Knock-In Mouse Model of Huntington's Disease*. *PLOS ONE*. 2016, roč. 11, č. 2. DOI: 10.1371/journal.pone.0148839

65 The Jackson Laboratory [online]. Dostupné z: <https://www.jax.org/strain/027410>

Homozygotní samci i samice vykazují hlavní příznaky HD, které se shodují s příznaky pacientů a tímto onemocněním. U homozygotů zQ175 byl popsán výrazný úbytek hmotnosti už od 3. měsíce života. U WT myši a heterozygotů nebyl tento příznak zpozorován. Hlavním příznakem HD je výrazná atrofie mozku v důsledku odumírání neuronů. K atrofii striata a neokortexu dochází u homozygotních myši již v raném věku, ještě před tím, než byly detekovány motorické deficity. Ve striatu a kortexu homozygotních myši byl zjištěn s věkem zvyšující se nárůst počtu neuronů s jadernými HTT inkluzemi (**obr.1**).

U HD pacientů se 40-50 repeticemi dochází téměř k úplné striatální degeneraci, ale u myši, jejichž repetice jsou mnohem delší (100 repetice a více) nedochází k tak dramatické degeneraci striata⁶⁶.

1.5 Nervové kmenové buňky

Nervové kmenové buňky (NSC) jsou nediferencované, multipotentní buňky, pro které je charakteristická schopnost sebeobnovy, téměř neomezená proliferace a diferenciací⁶⁷.

V organismu se kmenová buňka nachází v anatomicky specifickém místě nazývané „nika kmenových buněk“. Nika, složená z podpůrných buněk, poskytuje kmenové buňce uchycení, výživu a dodává faktory pro regulaci buněčného cyklu. Některé z mechanismů pro regulaci kmenových buněk jsou pro všechny typy kmenových buněk stejné. Jiné se však liší, aby si buňky zachovaly své jedinečné vlastnosti⁶⁸.

NSC vznikají během časného embryonálního vývoje a zůstávají po celý život jedince⁶⁹. V neurální trubici se nachází malý počet kmenových buněk, z kterých je vytvořen celý centrální nervový systém. NSC se dělí symetricky a asymetricky. Při neurogenezi dochází nejdříve k symetrickému dělení, kdy se nervová kmenová buňka rozdělí na dvě identické buňky pro rozšíření zásob NSC. Během neurogeneze, která probíhá u myši v E 9-10 převládá asymetrické dělení. Při asymetrickém dělení vzniká z mateřské kmenové buňky

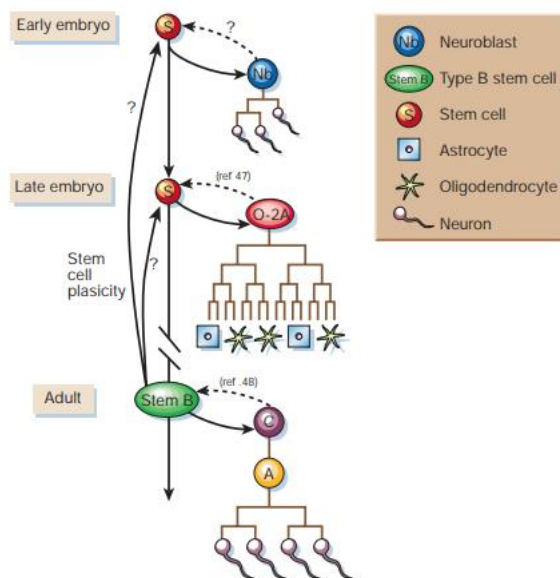
66 PENG, Qi et al. *Characterization of Behavioral, Neuropathological, Brain Metabolic and Key Molecular Changes in zQ175 Knock-In Mouse Model of Huntington's Disease*.

67 ZHAO, Xinyu a Darcie L. MOORE. *Neural stem cells: developmental mechanisms and disease modeling*. *Cell and Tissue Research*. 2018, roč. 371, č. 1. DOI: 10.1007/s00441-017-2738-1

68 BARRON, Jessica C., Emily P. HURLEY a Matthew P. PARSONS. *Huntingtin and the Synapse*.

69 HITOSHI, Seiji et al. *Primitive neural stem cells from the mammalian epiblast differentiate to definitive neural stem cells under the control of Notch signaling*. *Genes & Development*. 2004, roč. 18, č. 15. DOI: 10.1101/gad.1208404

totožná kopie a intermediální progenitor, nebo nezralý neuron⁷⁰. Intermediální progenitory jsou funkčně specializované buňky s omezeným potenciálem se nadále dělit. Diferenční potenciál NSC je tripotentní, což znamená, že se diferencují do tří buněčných typů: neuronů, oligodendrocytů a astrocytů⁷¹. Nejprve se diferencují do neuronů (kolem E13) a poté gliové (astrocytové a oligodendrocytové) linie⁷². Neurony vytváří neuronální síť propojenou synapsemi, které zajišťují komunikaci a přenos nervového signálu mezi jednotlivými neurony⁷³.



Obr. 4 Vývoj kmenových buněk. Převzato z „The development of neural stem cells“, autor: Sally Temple, 2001⁷⁴.

70 BERGSTRÖM, Tobias a Karin FORSBERG-NILSSON. *Neural stem cells: Brain building blocks and beyond*. Upsala Journal of Medical Sciences. 2012, roč. 117, č. 2. DOI: 10.3109/03009734.2012.665096

71 REYNOLDS, Brent A. a Samuel WEISS. *Generation of Neurons and Astrocytes from Isolated Cells of the Adult Mammalian Central Nervous System*. Science. 1992, roč. 255, č. 5052. DOI: 10.1126/science.1553558

72 TEMPLE, Sally. *The development of neural stem cells*. Nature. 2001, roč. 414, č. 6859. DOI: 10.1038/35102174

73 LIEBAU, Stefan et al. *Maturation of Synaptic Contacts in Differentiating Neural Stem Cells*. STEM CELLS. 2007, roč. 25, č. 7. DOI: 10.1634/stemcells.2006-0823

74 TEMPLE, Sally. *The development of neural stem cells*.

V dospělém mozku k neurogenezi dochází ve dvou oblastech mozku, a to v subventrikulární zóně (SVZ) laterálního ventrikulu a subgranulární zóně v gyru dentatu hipokampu a díky nim dochází k neurogenezi po celý život⁷⁵. To je důležité zejména při poškození buněk nebo tkáně vlivem neurodegenerativního onemocnění nebo po traumatickém poškození mozku. Dělení NSC umožňuje produkci buněk, které mohou nahradit poškozené neurony a glie. NSC mohou migrovat do míst, ve kterých je tkáň poškozena a podpořit funkční a strukturální opravu tkáně. Také produkují neurotrofické faktory (BDNF a GDNF), které mohou stimulovat vnitřní opravné mechanismy⁷⁶. Například u HD byla zjištěna vyšší proliferační aktivita (PCNA pozitivní buňky) a vzrůstající počet nových neuronů pocházející ze SVZ⁷⁷.

1.5.1 NSC v *in vitro* podmínkách

NSC se v *in vitro* podmínkách mohou kultivovat dvěma různými metodami, přichycené k povrchu a jako plovoucí ve formě neurosfér. Obě kultivační metody vyžadují specifické médium pro NSC s KSR, suplementy B27 a N2, růstové faktory Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) a Epidermal Growth Factor (EGF). Toto složení média je schopné udržet buňky v proliferačním stavu. Pokud růstové faktory odstraníme z média, NSC začnou spontánně diferencovat.

1. Přichycené k povrchu

In vitro kultivace se provádí na skle nebo ošetřeném povrchu plastiku pro *in vitro* podmínky. Před samotným vysazením buněk se aplikuje potah proteinů extracelulární matrix (ECM), který umožňuje simulovat *in vivo* podmínky v prostředí *in vitro* kultivací. Mezi tyto proteiny patří např. želatina, fibronectin, laminin a Geltrex, který je směsí několika proteinů. Buňky se k ECM přichycují pomocí integrinů. Tyto ECM proteiny

75 ZHAO, Xinyu a Darcie L. MOORE. Neural stem cells.

76 FERNANDEZ-MUÑOZ, Beatriz et al. *Human Neural Stem Cells for Cell-Based Medicinal Products*. Cells. 2021, roč. 10, č. 9. DOI: 10.3390/cells10092377

77 CURTIS, M.A. et al. *The distribution of progenitor cells in the subependymal layer of the lateral ventricle in the normal and Huntington's disease human brain*. Neuroscience. 2005, roč. 132, č. 3. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2004.12.051

ovlivňují adhezi buněk, usnadňují mezibuněčnou komunikaci a poskytují strukturální podporu, regulují buněčnou proliferaci a morfologii buněk⁷⁸.

2. Neurosféry

Jedna ze schopností nervových kmenových buněk, která se využívá při jejich kultivaci je tvorba neurosfér. NSC v bezsérovém médiu s růstovými (epidermální a fibroblastový) faktory se množí (proliferují) a tvoří mnohobuněčné kulovité útvary – neurosféry⁷⁹. Neurosféry mohou tvořit i progenitory, ale na rozdíl od kmenových buněk nemohou vytvořit sekundární neurosféry z primárních neurosfér⁸⁰.

1.5.2 NSC a neurodegenerativní onemocnění

NSC jsou hojně využívány v klinických studiích pro buněčnou terapii neurodegenerativních onemocnění např. Alzheimerovy choroby⁸¹, Parkinsonovy choroby⁸² či roztroušené sklerózy⁸³. Pro studium Huntingtonovy choroby ale i jiných neurodegenerativních onemocnění se používají buňky kultivované v *in vitro*⁸⁴ podmínkách izolované z fetální mozkové tkáně. Při porovnávání linií NSC exprimujících mHTT a wt linií bylo zjištěno, že syntéza patogenního proteinu ovlivňuje buňky v mnoha směrech. Patogenní protein tvoří agregáty v perinukleárním prostoru buněk. mHTT narušuje axonální transport mitochondrií a ovlivňuje mitochondriální dynamiku tím, že zvyšuje štěpení a snižuje fúzi. U HD NSC je narušena funkce ubiquitin-proteazomového

78 *Extracellular Matrix Proteins and Tools for Cell Culture Optimization*. In: MERCK [online]. [cit. 2023-01-28]. Dostupné z: <https://qbi.uq.edu.au/brain-basics/brain/brain-physiology/action-potentials-and-synapses>

79 TAUPIN, Philippe. *Adult neurogenesis and neuroplasticity*. Restorative Neurology and Neuroscience. 2006, roč. 24, č. 1.

80 Ibid.

81 HAYASHI, Yoshihito et al. *Effects of neural stem cell transplantation in Alzheimer's disease models*. Journal of Biomedical Science. 2020, roč. 27, č. 1. DOI: 10.1186/s12929-020-0622-x

82 OLIVER, Darryll a P. REDDY. *Dynamics of Dynamin-Related Protein 1 in Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Diseases*. Cells. 2019, roč. 8, č. 9. DOI: 10.3390/cells8090961

83 PLUCHINO, Stefano, Jayden A. SMITH a Luca PERUZZOTTI-JAMETTI. *Promises and Limitations of Neural Stem Cell Therapies for Progressive Multiple Sclerosis*. Trends in Molecular Medicine. 2020, roč. 26, č. 10. DOI: 10.1016/j.molmed.2020.04.005

84 z latiny "ve skle" mimo živé tělo

systemu a autofágie, které vedou ke snížení odbourávání toxického materiálu a jeho hromadění v cytoplazmě buňky⁸⁵. Tento jev lze pozorovat i u pacientů s HD, u kterých se projevuje progresivní ztrátou neuronů⁸⁶. NSC nesoucí mHTT vykazují snížení hladiny cholesterolu a pohyblivosti buněk a zároveň dochází ke zvýšení hladin reaktivních forem kyslíku, což vede k oxidačnímu poškození buněk. U homozygotních NSC kultivovaných v *in vitro* podmínkách byla zjištěna pomalejší kinetika růstu a po vícenásobných pasážích⁸⁷ poskytly méně neuronů oproti wt NSC. Odlišná je také buněčná struktura ovlivňující diferenciaci do neuronů⁸⁸.

85 LI, Endan et al. *Neural stem cells derived from the developing forebrain of YAC128 mice exhibit pathological features of Huntington's disease*. Cell Proliferation. 2020, roč. 53, č. 10.
DOI: 10.1111/cpr.12893

87 Přenos do nových kultivačních nádob.

88 RITCH, James J. et al. *Multiple phenotypes in Huntington disease mouse neural stem cells*. Molecular and Cellular Neuroscience. 2012, roč. 50, č. 1. DOI: 10.1016/j.mcn.2012.03.011

2 CÍLE PRÁCE

Hlavním cílem práce je sledovat a charakterizovat změny v synaptické funkci pod vlivem mHTT u myšího kmene zQ175 (B6J.129S1-Htttm1Mfc/190ChdiJ⁸⁹).

1. Izolace synaptosomů z myšího striata dospělých zQ175 myší nesoucích mutovanou alelu Q175 v porovnání s kontrolními myšmi Q7.
 - a) Porovnání izolace synaptosomů pomocí sacharózového gradientu a komerčně dostupného Syn-PER Synaptic Protein Extraction Reagent.
2. Vliv mHTT v průběhu neurálního vývoje a synaptogeneze u fétů ve stádiu E17.5 (embryonální den 17.5).
3. *In vitro* kultivace NSC izolovaných z *in vivo* myších fétů zQ175 a Q7 a sledování vlivu Brain-derived neurotrophic factor BDNF na synaptogenezi/synapse.

89 B6J.129S1-Htttm1Mfc/190ChdiJ. In: The Jackson Laboratory [online]. [cit. 2023-01-28]. Dostupné z: <https://www.jax.org/strain/027410>

3 METODY

Pro pokusy byly použity myši zQ175 (The Jackson Laboratory, 027410). Všechny myši jsou genotypizovány pár dní po narození. Pro pokusy na dospělých jedincích jsme použili homozygoty (Q175/Q175), heterozygoty (Q175/Q7) a kontrolní myši (Q7/Q7).

Pro získání fétů byli navzájem připuštěni heterozygoti (Q175/Q7). Féty byly následně získány E17.5 (embryonální den), byla u nich provedena genotypizace a určení pohlaví.

Vzorky získané z dospělých jedinců zahrnovaly striatum a kortex. Striatum bylo použité pro izolaci synaptosomů a western bloty. Kortex pro testování primerů pomocí RT-qPCR.

Z fétů byly použity pro následné pokusy celé mozky. Pokusy zahrnovaly izolaci synaptosomů, izolaci a kultivaci nervových kmenových buněk (NSC) a imunobarvení.

3.1 Izolace synaptosomů

Synaptosomy byly izolovány dvěma různými metodami, 1. sacharózovým gradientem s ultracentrifugací a 2. komerčně dostupným kitem Syn-PER (Syn-PER Synaptic Protein Extraction Reagent kit, Thermo Scientific, 87793).

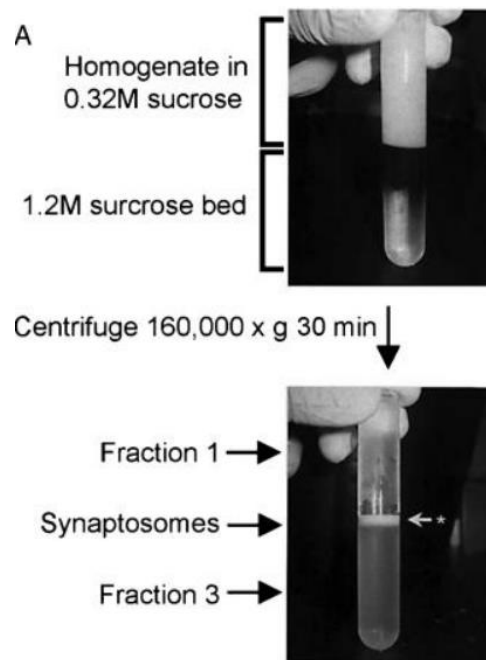
Mozek byl opatrně vyjmut z lebky a udržován na ledu. Striatum bylo vypreparováno pod binokulární lupou Zeiss Stemi 508 Stereo Microscope.

Placenta s féty byla vypreparována z těla matky. Následně byly féty zbaveny plodových obalů a byly z nich vyjmuty mozky pod binokulární lupou.

3.1.1 Sacharózový gradient za použití 0,32 M a 1,2 M sacharózy

Ke vzorkům striata byly přidány 2 ml 0,32 M sacharózy, která obsahovala inhibitory proteáz/fosfatáz (Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitory, Single-Use Cocktail, Thermo Scientific, 1861281) a 70 µl 1M Sample Reducing agent (SRA, 500 mM dithiothreitolu). Vzorky byly homogenizovány pomocí Dounce homogenizátoru s těsným pístem. Každý vzorek byl v homogenizátoru stlačen 8x. Homogenizovaný vzorek byl přenesen do 15 ml zkumavky s 5 ml 0,32M sacharózy s inhibitory a SRA, následně byly homogenizované vzorky centrifugovány 10 min. při teplotě 4 °C na 1000 rcf (Allegra X-22R, Beckman Coulter). Po centrifugaci bylo sebráno 400 µl pro další analýzy (PN vzorek) a 6,5 ml supernatantu a navrstveno na 6,5 ml na 1,2 M sacharózy v ultracentrifugačních zkumavkách. Pelet ze dna zkumavky (P1) byl naředěn 0,32 M sacharózou a uchován pro další analýzy. Navrstvené sacharózy byly centrifugovány 35 min. při 4 °C na 32 000 rpm ve výkyvném rotoru SW32.1 a ultracentrifuze Optima XPN90 (Beckman Coulter). Pomocí ultracentrifugace došlo k oddělení synaptosomové části mezi 1,2 M a 0,32 M sacharózu. Synaptosomová část byla sebrána pomocí injekční

jehly a stříkačky přes stěnu zkumavky. Následně byly sebrány jednotlivé frakce 1 a 3 a pelet 2, který byl rozpuštěn v sacharóze. Vzorky byly zmrazeny a uchovány při teplotě -80 °C do použití.



Obr. 5 A) ukazuje navrstvení homogenátu v 0,32M sacharóze po první centrifugaci na 1,2M sacharózu. Po ultracentrifugaci vznikají dvě různé frakce (1 a 3) mezi kterými se nachází vrstva synaptosomů. Na dně zkumavky vzniká pelet. Převzato z článku VALENCIA, Antonio et al. *Striatal Synaptosomes from Hdh140Q/140Q Knock-in Mice have Altered Protein Levels, Novel Sites of Methionine Oxidation, and Excess Glutamate Release after Stimulation*. *Journal of Huntington's Disease*. 2013, roč. 2, č. 4. DOI: 10.3233/JHD-130080⁹⁰.

Pro následné metody a analýzy byly sebrány vzorky ze všech frakcí: Po první centrifugaci: supernatant (PN, postnuclear), Pelet 1 (P1). Po ultracentrifugaci: Frakce 1(F1), synaptosomy (SYN), Frakce 3 (F3) a pelet 2 (P2) (**Obr. 5**).

3.1.2 Izolace synaptosomů pomocí Syn-PER Synaptic Protein Extraction Reagent kit

Ke vzorkům bylo přidáno 10 ml Syn-Per reagent (čínidla) s inhibitory proteáz a fosfatáz na 1 gram tkáně. Striatum dospělého jedince váží kolem 40 mg. Poté byly vzorky

⁹⁰ VALENCIA, Antonio et al. *Striatal Synaptosomes from Hdh140Q/140Q Knock-in Mice have Altered Protein Levels, Novel Sites of Methionine Oxidation, and Excess Glutamate Release after Stimulation*. *Journal of Huntington's Disease*. 2013, roč. 2, č. 4. DOI: 10.3233/JHD-130080

homogenizovány Dounce homogenizátorem – 10 pomalých stlačení. Následně byly vzorky centrifugovány 10 min. na 1200 rfc (Allegra X-22R, Beckman Coulter) při teplotě 4 °C. Po centrifugaci byl odebrán supernatant a přemístěn do nové zkumavky, ve které byl centrifugován 20 min. na 15 000 rcf (Allegra X-22R, Beckman Coulter) při teplotě 4 °C. Synaptosomy byly získány po dvou centrifugacích ve formě peletu. K synaptosomovému peletu bylo přidáno 1–2 ml Syn-Per reagent (činidla) s inhibitory na 1 gram vzorku. Vzorky byly zmrazeny při teplotě -80 °C do následného použití.

3.2 *In vitro* kultivace NSC

Buňky byly izolovány z mozků myších fétů (E17.5). Mozky byly ponechány ve 12 jamkové destičce (TPP) ve studeném HBSS na ledu do použití. Poté byly mozky opláchnuty 2 ml oplachovým médiem obsahujícím DMEM/F12 (Gibco, 31330038), 50 µg/ml Gentamicin (Sigma-Aldrich), 5 µg/ml Heparinu (Sigma- Aldrich, H3149) a 5 % KnockOut serum replacement (KSR, Gibco, A31815-02), následně bylo médium nahrazeno kultivačním NSC médiem obsahující DMEM/F12, 50 µg/ml Gentamicinu, 5 µg/ml Heparinu a 1 % B27 (Gibco, 12587-010) a 0,5 % N2 (Gibco, 17502-048), 5 % fetal bovine serum (Sigma- Aldrich, F7524) a 20 ng/ml Basic Fibroblast Growth Factor (, PeproTech, 100-18C) a 20 ng/ml Epidermal Growth Factor (EGF, PeproTech, 3015-09). Mozky byly pomocí 1 ml špičky mechanicky rozvolněny, následně 10x propipetovány a přefiltrovány přes 70 µm cell strainer. Přefiltrovaná buněčná suspenze z každého mozku byla vysazena na kultivační jamku 6 jamkové destičky s dvěma různými potahy: 1. potažené 1 h při pokojové teplotě 5 µg/cm² fibronectinem (Sigma-Aldrich, F1141), 2. 2 % GelTrexem (Gibco, A14132) 1 h při 37 °C. Dále byla část buněk vysazena na 24 jamkovou destičku (TPP) bez potahu pro tvorbu neurosfér (NS). NSC byly kultivovány v NSC médiu v termostatu při 37 °C/5 % CO₂. Po 24 h bylo NSC médium s 5 % FBS nahrazeno za NSC médium s 5 % KSR. V průběhu kultivace byly obden přidávány růstové faktory (bFGF a EGF) v koncentraci 20 ng/ml nebo vyměněna ½ NSC média. Při konfluenci kolem 90 % procent byly buňky pasážovány akutázou (Sigma Aldrich, A6964) a následně centrifugovány 450 g (Hettich, Universal 320R, Schoeller), 5 min., pokojová teplota s obvyklou pasáží 1:3.

NSC pro následnou charakterizaci pomocí qPCR a western blotů

Buňky byly vysazeny na kultivační misky o velikosti 22,1 cm² (TPP, 93060) v počtu 30 000 buněk/cm² a kultivovány v NSC médiu s přidanými růstovými faktory bFGF a EGF o koncentraci 20 ng/ml média. Pro následné pokusy bylo médium na miskách vyměněno: 1. za NSC médiu bez faktorů, kdy buňky spontánně diferencují (SD) 2. NSC médium s přidaným BDNF (Peprotech, 450-02) o koncentraci 10 ng/ml média. Výměna média nebo přidání BDNF probíhalo v intervalech obden po dobu 10 dnů. Den 10 byly buňky sklizené na sucho.

Skližení buněk na sucho:

Z NSC bylo odsáto médium a buňky byly opláchnuty PBS, nejprve pokojové teploty a následně studeným PBS. Na buňky byl přidán 1 ml studeného PBS a buňky byly seškrábnuty buněčnou škrabkou (TPP, 99002) a přeneseny do 2 ml zkumavky. Následovala centrifugace 700xg/5 min./4°C (Allegra X-22R, Beckman Coulter). Po centrifugaci se udělal na dně zkumavky buněčný pelet, PBS bylo odsáto a buňky ihned zamrazeny v suchém ledu a přeneseny do -80 °C, kde byly uchovány do následného použití.

NSC pro imunobarvení

Buňky byly vysazeny na LabTeky (Thermo Scientific, 154941), které jsou kupovány s potahem polylysinu. LabTeky byly před použitím potáhnuty 1 % GelTrexem. Na potažené LabTeky byly NSC vysazené v koncentraci 30 000 buněk/cm² a kultivovány v NSC médiu s růstovými faktory bFGF a EGF o koncentraci 20 ng/ml média. Pro následné pokusy bylo médium na miskách vyměněno: 1. za NSC médiu bez faktorů – SD, 2. NSC médium s přidáním BDNF (Peprotech, 450-02) o koncentraci 10 ng/ml média. Výměna média nebo přidání BDNF probíhalo v intervalech obden po dobu 10 dnů. D10 byly NSC fixovány 4 % paraformaldehydem (PFA, Sigma-Aldrich, P-6148).

Fixace NSC za použití 4 % PFA:

Médium bylo z buněk odsáto a buňky byly následně opláchnuty PBS (pokojové teploty). Po oplachu bylo do každé jamky přidáno 200 µl 4 % studeného PFA a buňky byly s PFA inkubovány po dobu 10 min. při pokojové teplotě. Po inkubaci bylo PFA odstraněno a buňky opláchnuty studeným PBS (2x5 min. a 1x10 min.). Po oplachu bylo na buňky přidáno studené PBS a uchováno v lednici do následného imunobarvení.

3.3 Molekulární a biochemické metody

K identifikaci synaptických změn z izolovaných synaptosomů a NSC byly použity tyto molekulární metody:

1. Real-time qPCR pro zjištění úrovně exprese genů.
2. Western bloty k identifikaci specifických proteinů.
3. Imunofluorescence k vizualizaci cílového proteinu na histologických řezech mozku u fetů E17.5 a nervových kmenových buňkách.

3.3.1 Real – time qPCR

Real-time qPCR byla použita pro sledování změn v genové expresi v synapsích, a to na úrovni zahrnující synaptické váčky, pre-synaptické a post-synaptické geny. Dále byla sledována exprese genů pro NSC (Nestin), neuronů (β III tubulin, DARPP-32) a BDNF. Primery na tyto geny byly navrženy v LAPA a jsou znázorněny v **příloze č. 1**.

Buňky byly lyzovány v RLT pufru s β -Merkaptoetanolem (Serva, 28625) a následně homogenizovány přes QIAshredder (Qiagen, 79654) kolonky. Po homogenizaci byly vzorky nanášeny na kolonky pro DNA eliminaci (gDNA Eliminator spin) a následně byla izolována RNA pomocí RNeasy Plus Mini kit (Qiagen, 74136) dle manuálu výrobce. Po nanášení vzorku na membránu (po RW1 a RPE pufru) byly eluáty skladovány pro analýzu proteinů western blot metodou. Vzorky byly eluovány ve 30 μ l Nuclease-free H₂O (Life Technologies, AM9937), 2x na kolonku nanášen stejný eluát. Následně byla změřena koncentrace izolované RNA pomocí spektrometru (NanoDrop, software ND-1000 V3.7.1, Thermo Fisher Scientific).

Do reverzní transkripce (QuantiTect Reverse Transcription Kit, Qiagen, 205313) byly použity 2 μ g RNA jednotlivých vzorků. Reverzní transkripce se skládá ze dvou kroků, nejprve dochází k eliminaci genomické DNA (gDNA) a v následném kroku k samotné reverzní transkripci.

RT-qPCR byla provedena na přístroji CFX96 (BioRad) s detekcí pomocí barvy Eva Green (5 \times Hot FIREPol EvaGreen qPCR mix, Solid Biodyne, 08-24-00020). Samotná reakce obsahovala 4 μ l EvaGreen Supermix, 125 nM obou primerů (0,25 μ l forward a 0,25 μ l reverse) a 14,5 μ l H₂O (nuclease free) a vzorek cDNA odpovídající koncentraci 25 ng původní RNA. Pomocí software BioRad CFX Manager byly nastaveny následující **parametry reakce**: 95 °C, 12 min pro aktivaci polymerázy, **cyklování**: 95 °C 15 sec (denaturace), 57 °C 30 sec (nasednutí primeru), 72 °C 30 sec (elongace produktu). Cyklování bylo nastaveno na 40 cyklů. Melting analýza: 72 °C 10 sec. Kvantifikace každého genu byla normalizována na tři housekeeping geny: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), β -actin (ACTB) a ribosomal protein L13A (Rpl13a).

Z programu CFX Manager byly exportovány Ct hodnoty, tedy číslo cyklu, kdy hodnota detekované fluorescence přesáhla detekční limit (čím vyšší Ct, tím méně bylo v původním vzorku analyzované RNA/cDNA).

3.3.2 Western bloty

Metoda western blot byla použita pro detekci a kvantifikaci specifických proteinů. Vzorky byly lyzovány v RIPA pufru s přidáním Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitory, Single-Use Cocktail (Thermo), následně byla změřena koncentrace proteinů pomocí BCA metody.

Příprava vzorků

Ke vzorkům byl přidán lyzační pufr RIPA s inhibitory o koncentraci 10 µl/ml. Vzorky byly následně vortexovány a inkubovány 15 min na ledu. Po inkubaci byly vzorky sonikovány ponorným sonikátorem (UP200St, Hielscher) s nastavením: čas 10 sec, cyklus 40 %, amplituda 20 %. Následovala 15 min. inkubace na ledu a změření koncentrace proteinů BCA metodou.

Příprava vzorků a stanovení koncentrace proteinů

Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, 23225), Pre-Diluted Protein Assay Standards BSA (Thermo Scientific, 23208). Standardy byly použity v rozmezí od 125 do 2000 µg/ml. BCA assay byla inkubována 30 min, při 250 rpm a 37 °C. Po inkubaci následovalo měření koncentrace proteinů ve spektrometru (Multidetekční reader Synergy HTX, BioTek) pomocí softwaru Gen5 (v. 2.09) pro měření absorbance při 562 nm.

Western blot

Vzorky byly zahřáty na 70 °C po dobu 5 min, schlazeny na ledu a následně naneseny na gel v množství 5 µg/jamku. Jako markery byly použity PageRuller (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa, Thermo, 26616) a Sharp (Novex, Sharp Pre-Stained Protein Standard, LC5800). Gely a pufry byly vybrány v závislosti na délce analyzovaného proteinu. Pro separaci proteinů byly použity 4-12 % Bis Tris gely (Invitrogen, NP0323BOX) nebo 12 % (Invitrogen, NW00120BOX) s MES SDS (Thermo, NP0002) nebo MOPS SDS (Thermo, NP0001) pufrem⁹¹. Protein huntingtin vzhledem k jeho délce (350 kDa) byl separován na 3-8 % Tris-acetátovém gelu (Invitrogen, EA03785BOX) s tris-acetátovým pufrem (Thermo, LA0041). Do všech pufřů byl přidán antioxidant (Thermo, NP0005). Separace jednotlivých proteinů probíhá pomocí elektroforézy (Elektroforéza Power/PAC 1000, BioRad), která byla vždy nastavena na konstantní napětí 150 V. Celkový čas rozdělení proteinů byl kolem 1:10 h. Po separaci byly proteiny z gelu přeneseny na nitrocelulósovou membránu pomocí přístroje Trans-blot Turbo (BioRad) a Transfer buffer for Turbo blot (BioRad, 10026938) s nastavením dle tloušťky gelu (1,5 mm). Poté byla membrána několikrát opláchnuta v dH₂O a obarvena Novex Reversible Membrane Protein Stain kitem (Invitrogen, IB7710) podle instrukcí výrobce. Membrána byla následně blokována 5 % sušeným mlékem (NutriStar, 8592310621621) v TTBS (0,05 % Tween 20 v Tris-buffered saline) pro zabránění nescifických vazeb. Po blokování byla membrána inkubována se specifickou primární protilátkou (**příloha č. 2**) přes noc na válečkovém míchadle při teplotě 4° C. Membrána

91 Pro proteiny L1CAM, PDLIM5 SYP, SNAP25 a PSD95 byl použit MOPS SDS pufr a 4-12 % Bis Tris gel. Pro proteiny VAMP1 a VAMP2 byl použit pufr MES SDS pufr a 12 % gel.

byla promyta od primární protilátky TTBS pufrem 6x5 min. Po promytí od primární protilátky byla membrána inkubována se sekundární protilátkou s HRP⁹². Membrána byla promyta od sekundární protilátky TTBS pufrem 6x5 min a inkubována 5 min. s ECL (GE Healthcare, 28980926) pro vznik světelné reakce, která byla detekována v chemiluminiscenční komoře (BioRad ChemiDoc MP Imaging system, BioRad) a pomocí softwaru Image Lab (verze 5.2.1, Bio-Rad) s nastavením ChemiHi Resoultion. Následně byly membrány připraveny pro detekci kontrolního proteinu (GAPDH, β tubulin). Membrány byly opláchnuty v dH₂O a inkubovány 15 min v 15 % H₂O₂ pro inaktivaci HRP s následným oplachem v dH₂O a TTBS, následovala inkubace s příslušnou sekundární protilátkou proti kontrolnímu proteinu. Promytí po sekundární protilátce, vyvolání membrány v ECL a vyfocení. Po vyfocení byla membrána opláchnuta v dH₂O a usušena.

Pomocí softwaru Fiji/ImageJ (<https://fiji.sc/>) byla z obrázků western blot stanovena densitometrie specifických proteinů a jejich příslušných kontrol: byla změřena integrovaná optická denzita jako součet intenzity všech pixelů, které odpovídají signálu daného proteinu (patří do proteinového bandu).

3.3.3 Imunofluorescence

Imunofluorescence na řezech mozků

Celé hlavičky fétů (E17.5) byly opláchnuty 1xPBS (phosphate buffer saline, Sigma-Aldrich, P4417), následně fixovány 4 % paraformaldehydem (PFA, Sigma-Aldrich, P-6148) přes noc ve 4 °C. Druhý den byly hlavičky promyty 2x5 min v 1x PBS a přeneseny do 30 % sacharózy a ponechány do úplného prosycení ve 4 °C. Den 3 byly hlavičky prosyceny a zality do OCT (23-730-571) média a do použití uchovány při -80 °C. Vzorky byly krájeny na kryostatu (40 μ m silné řezy) a řezy byly přeneseny do 24 jamkové destičky s 1x PBS. Řezy byly blokovány 1 hodinu v BPS (5 % kozí sérum, 0,3 % TritonX-100, 1 % BSA v 1x PBS) při pokojové teplotě. Poté byly řezy promývány 3x5 minut v promývacím roztoku (0,05 % Tween 20 v 1xPBS). Řezy byly inkubovány v primární protilátce (**příloha č. 3**) 1:500 s ABD (0,1 % TritonX-100, 1 % BSA v 1xPBS) po dobu 15 min. při pokojové teplotě a přes noc při teplotě 4 °C.

Po primární protilátce byly vzorky promývány 4x10 minut v promývacím roztoku a následně inkubovány se sekundárními protilátkami Goat-anti-rabbit, AF647 (A32733), Goat anti-rabbit IgG, AF488 (A32731), Goat anti-mouse IgG, AF647 (A32728), Goat

⁹² HPR je enzym, který se běžně nachází v křenu (horseradish). Sekundární protilátky jsou konjugovány s HPR, aby se zvýšila jejich citlivost a zesílení signálu při testování.

anti-mouse AF488 (A28175). Všechny sekundární protilátky byly ředěny 1:1000 a bylo k nim přidáno DAPI (4',6-diamidin-2-fenylindol) v koncentraci 1 µg/ml pro obarvení jaderné DNA. Inkubace se sekundárními protilátkami: 15 min při pokojové teplotě a 1 noc při teplotě 4 °C ve tmě. Poté byly řezy promývány 4×10 minut v promývacím roztoku, 1x10 min v 1xPBS a následně přeneseny na mikroskopická sklička a zamontovány montovacím médiem ProLong Glass Antifade Mountant (Invitrogen, P36980). Řezy byly naskenovány konfokálním mikroskopem Leica TCS SP5.

Féty byly genotypizovány a bylo u nich určeno pohlaví.

Imunofluorescence na buňkách

Po fixaci NSC, SD a kultivovaných BDNF buněk 4 % PFA následovala permeabilizace buněk 0,1 % Triton-X100 (Sigma-Aldrich, T8787) 10 min/RT a odstranění aldehydových skupin 50 mM NH₄Cl v 1xPBS (2,28mg/ml) 10 min/RT, poté byly buňky promyté PBS po dobu 5 min. a blokovány po dobu 1 h při pokojové teplotě v 5 % kozím séru, které bylo rozpuštěné v 1 % BSA v PBS. Po blokování byla na buňky přidána příslušná primární protilátka (**příloha č.4**) v 1 % BSA v PBS. NSC byly inkubovány v primární protilátce 3 h při pokojové teplotě. Následně byly buňky promyty v roztoku 0,05 % Tween20 (Sigma-Aldrich, P7949) v PBS 3x 5 min. Po promytí byly buňky inkubovány se sekundárními protilátkami Goat anti-mouse IgG, AF647 (A32728) a Goat anti-rabbit IgG, AF488 (A32731). Sekundární protilátky byly ředěny 1:1000 v 1 % BSA v PBS. K sekundárním protilátkám bylo přidáno DAPI o koncentraci 1 µg/ml. Inkubace se sekundárními protilátkami probíhala 45 min za pokojové teploty a ve tmě. Po inkubaci byly buňky promyty v roztoku 0,05 % Tween20 v PBS 3x 5 min. a 1x 5 v PBS. Po promytí byla odříznuta vrchní část LabTeku. Na buňky (jednotlivé jamky) byla přidána kapička montovacího média ProLong Glass Antifade Mountant a přiloženo krycí skličko. Buňky byly naskenovány konfokálním mikroskopem Leica TCS SP5.

Pomocí softwaru Fiji/ImageJ (<https://fiji.sc/>) byly z konfokálních z-stacků připraveny maximální projekce (obrázek, kde se v každém obrazovém bodě zobrazuje nejsilnější signál z jednotlivých rovin z-stacku) a vloženy kalibrační úsečky. Finální obrázky byly složeny a popisky přidány v programu Inkscape (<https://inkscape.org/>).

Konfokální mikroskopie

Software Leica LAS-AF

Proteinová exprese pomocí imunobarvení byla vizualizována využitím konfokální mikroskopie. Konfokální data byla snímána pomocí mikroskopu Leica TCS SP5 za použití objektivu pro olejovou imerzi HCX PL APO lambda blue 20x/ NA0.7. Fluorescenční kanály, které byly snímány: DAPI (Ex. 405 nm/ Em. 415-490 nm),

AlexaFluor 488 (Ex. 488 nm/ Em. 495-560 nm) a AlexaFluor 647 (Ex. 633 nm/Em. 640-750 nm). Rozlišení pořízených fotek je 1024x1024 pixelů při 12bitovém rozlišení intenzity a byly nasnímány jako z-stack. Mezi jednotlivými optickými řezy byla vzdálenost 1-1,5 μm . Pro zpracování dat byl použit program Fiji/ImageJ a jednotlivých z-stacků byla generována maximální projekce.

3.3.4 Analýza dat a příprava grafů

Western blot

Další zpracování dat a příprava grafů probíhala v statistickém prostředí R (<https://cran.r-project.org/>). Pro data z metody western blot byly hodnoty integrované optické denzity nejprve znormalizovány v rámci každého gelu škálováním (vydělením hodnot druhou odmocninou sumy čtverců) a dále vydělena data pro sledovaný protein hodnotou příslušné nanášecí kontroly. Toto zpracování umožňuje porovnávat hodnoty mezi vzorky i jednotlivými gely.

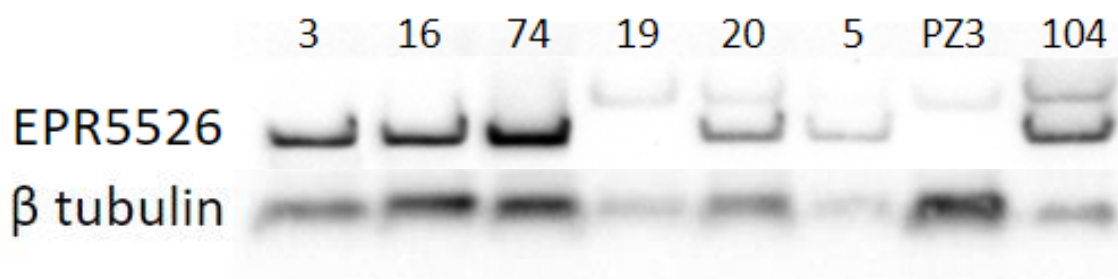
Pro metodu PCR byly z Ct hodnot exportovaných z programu CFX manager spočítány ΔCt hodnoty (rozdíl mezi průměrnou Ct housekeeping genů a Ct hodnotou sledovaného transkriptu). Protože PCR amplifikace probíhá exponenciálně (zdvojnásobení množství produktu v každém cyklu reakce), ΔCt hodnoty odpovídají \log_2 transformovanému normalizovanému množství transkriptu a $\Delta\Delta\text{Ct}$ hodnoty (ΔCt v jedné podmínce – ΔCt v druhé podmínce) odpovídají \log_2 FC (fold-change, násobku změny). $\text{FC}_{\text{AB}} = 1$ tedy odpovídá 2^1 , dvojnásobnému množství transkriptu ve vzorku A oproti vzorku B, $\text{FC}_{\text{AB}} = -1$ pak polovičnímu množství ve vzorku A oproti B.

4 VÝSLEDKY

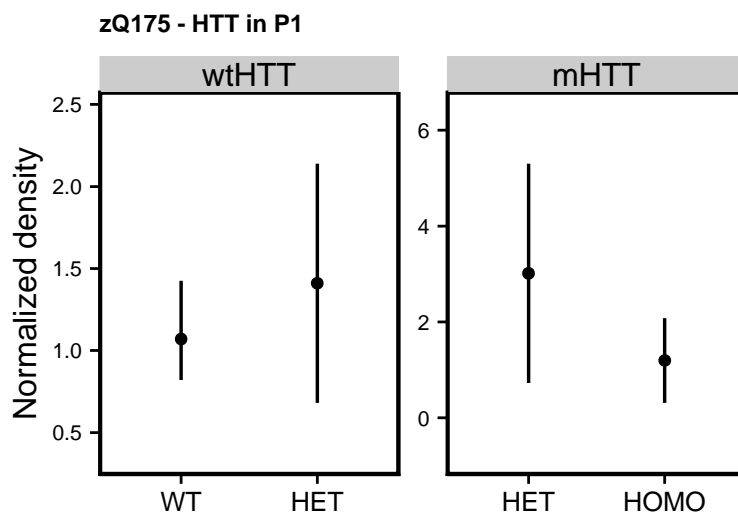
4.1 Synaptické proteiny

4.1.1 Stanovení hladiny wtHTT a mHTT

Protein huntingtin byl detekován v peletu 1 vznikajícím v průběhu izolace synaptosomů pomocí western blotu. Za použití EPR5526 protilátky rozlišíme wtHTT od mHTT (**Obr.6**). Po normalizaci intenzity HTT na intenzitu kontrolního proteinu B-TUBULINU (normalized density – normalizovaná denzita) vykazují Q175/Q7 myši vyšší hladinu wtHTT oproti Q7/Q7 a zároveň i vyšší hladinu mHTT v porovnání s Q175/Q175 (**Obr.7**).



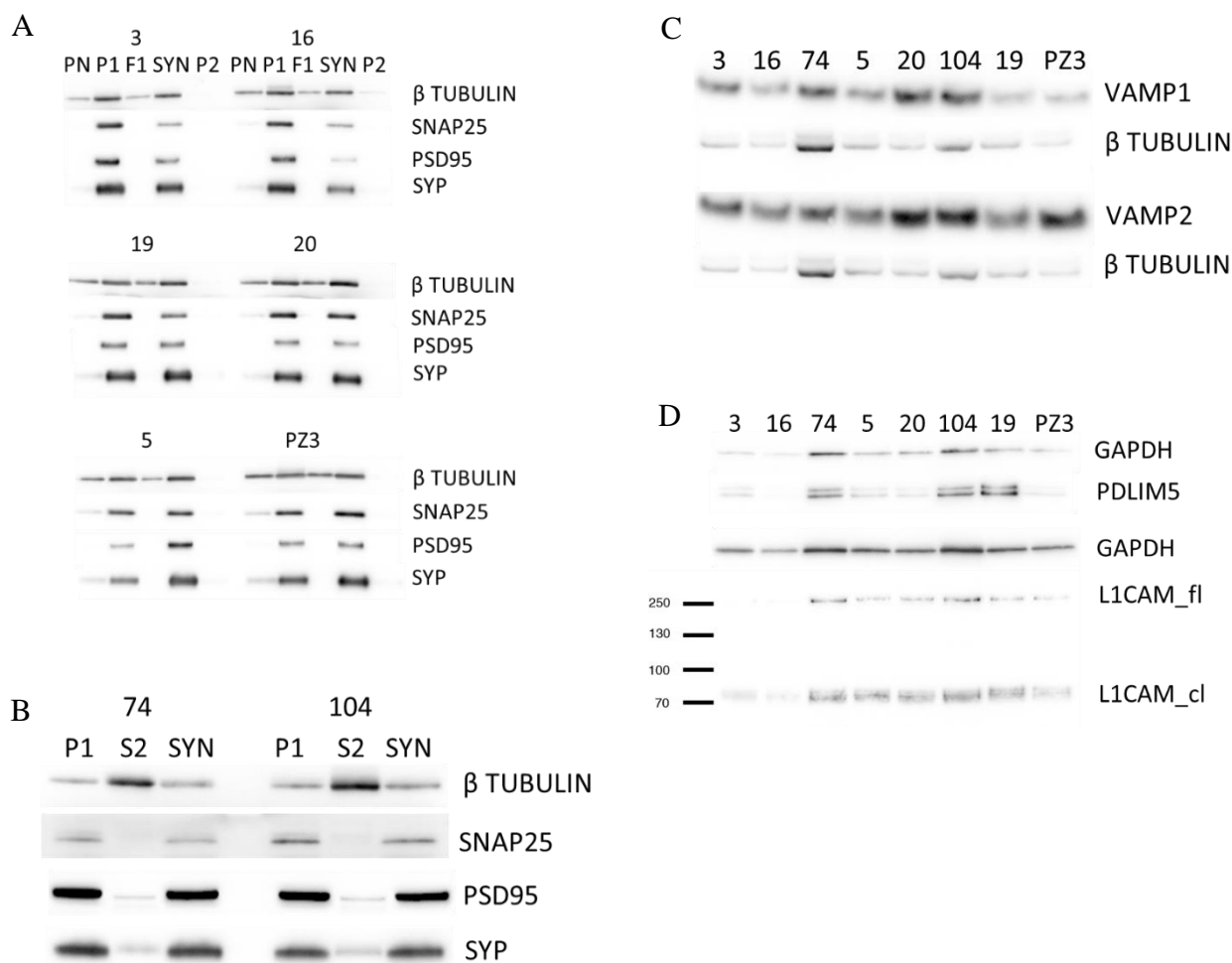
Obr. 6 Membrána s detekovaným proteinem HTT, a to ve formě wtHTT a mHTT. U vzorků č. 3, 16, 74 a 5 je detekován pouze wtHTT, jedná se kontrolní myši (Q7/Q7). U vzorků č. 19 a PZ3 je detekován jen mHTT, homozygotní myši (Q175/Q175). U vzorků č. 20 a 104 jsou detekovány obě formy HTT (wtHTT i mHTT), jedná se o heterozygotní myši (Q175/Q7). Ve spodní části obrázku je k tomu příslušná nanášecí kontrola B-TUBULIN.



Obr. 7 Protein HTT byl detekován z peletu 1. Po normalizaci signálu HTT na signál kontrolního proteinu (normalizovaná denzita) byla prokázána vyšší hladina wtHTT u heterozygotů (Q175/Q7) v porovnání se zdravými homozygoty (Q7/Q7). MHTT je detekován o vyšší hladině u heterozygotů (Q175/Q7) v porovnání s jedinci nesoucími obě mutované alely (Q175/Q175).

4.1.2 Detekce synaptických proteinů Western bloty

Pomocí western blotů byly detekovány specifické synaptické proteiny získané po izolaci sacharózovým gradientem a komerčně dostupným Syn-PER kitem. Vzorky 3, 16, 19, 20, 3 a PZ3 byly izolovány sacharózovým gradientem (**Obr. 8 A**) a vzorky 74 a 104 byly získány izolací Syn-PER kitem (**Obr. 8 B**). Pro ověření nabohacení specifických synaptických proteinů v určitých frakcích byly detekovány proteiny SNAP25, PSD95, SYP na všech synaptických frakcích po izolaci oběma metodami. Bylo ověřeno, že k nabohacení specifických synaptických proteinů dochází ve dvou frakcích, P1 a synaptosomové frakci. Po tomto ověření jsme následně detekovali specifické synaptické proteiny pouze na synaptosomové frakci, kde byly detekovány proteiny VAMP1, VAMP2 (**Obr. 8 C**), PDLIM5 a L1CAM (**Obr. 8 D**). L1CAM je znázorněn ve dvou formách, v plné délce (L1CAM_{fl}) a ve štěpené formě (L1CAM_{cl}). Detekce proteinu L1CAM u vzorků 3 a 16 vykazuje nízkou hladinu u proteinu v jeho plné délce.

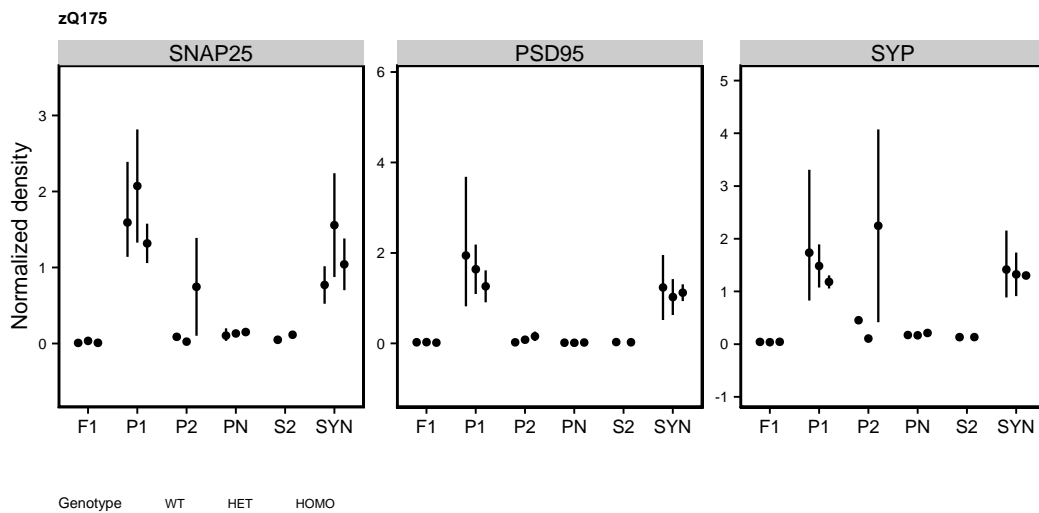


Obr. 8 Western bloty: **A)** na specifické synaptické proteiny SNAP25, PSD95 a SYP po izolaci sacharózovým gradientem na všech izolovaných frakcích vykazují nabohacení proteinů v P1 a synaptosomové frakci. **B)** na specifické synaptické proteiny SNAP25, PSD95 a SYP po izolaci kitem Syn-PER dochází k nabohacení těchto proteinů v P1 a synaptosomové frakci. **C)** na synaptosomové frakci byly detekovány proteiny VAMP1 a VAMP2. **D)** Synaptosomová frakce u proteinů PDLIM5 a L1CAM. L1CAM je znázorněn v plné délce (L1CAM-fl) a ve štěpené formě (L1CAM-cl). Detekce proteinu L1CAM u vzorků 3 a 16 vykazuje nízkou hladinu u proteinu v jeho plné délce.

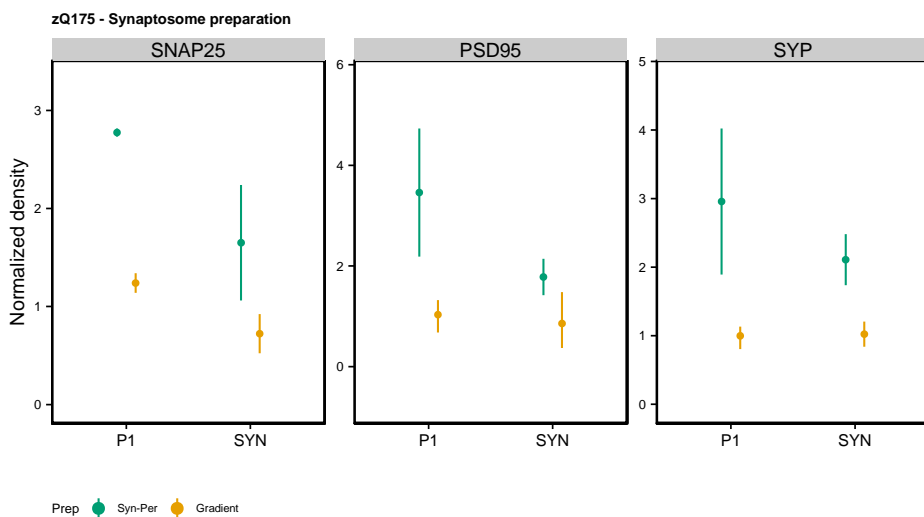
4.1.2.1 Ověření nabohacení specifických proteinů v určitých frakcích

Izolace frakcí SynPER kitem i pomocí gradientové metody vede k nabohacení synaptických proteinů v P1 a synaptosomové frakci. **Obrázek 9** znázorňuje kvantifikaci synaptických proteinů (signál normalizován na množství kontrolního proteinu – normalizovaná denzita) a prokazuje jejich nabohacení v synaptosomové a P1 frakci oproti ostatním frakcím po izolaci sacharózovým gradientem. **Obr.10** znázorňuje porovnání nabohacení specifických synaptických proteinů po izolaci sacharózovým gradientem a komerčně dostupným Syn-Per kitem. Komerčně dostupný kit vykazuje navýšení

specifických synaptických proteinů oproti izolaci metodou sacharózového gradientu.



Obr. 9 Porovnání hladiny specifických synaptických proteinů v jednotlivých frakcích po izolaci sacharózovým gradientem, který ukazuje nabohacení v P1 a synaptosomové frakci.



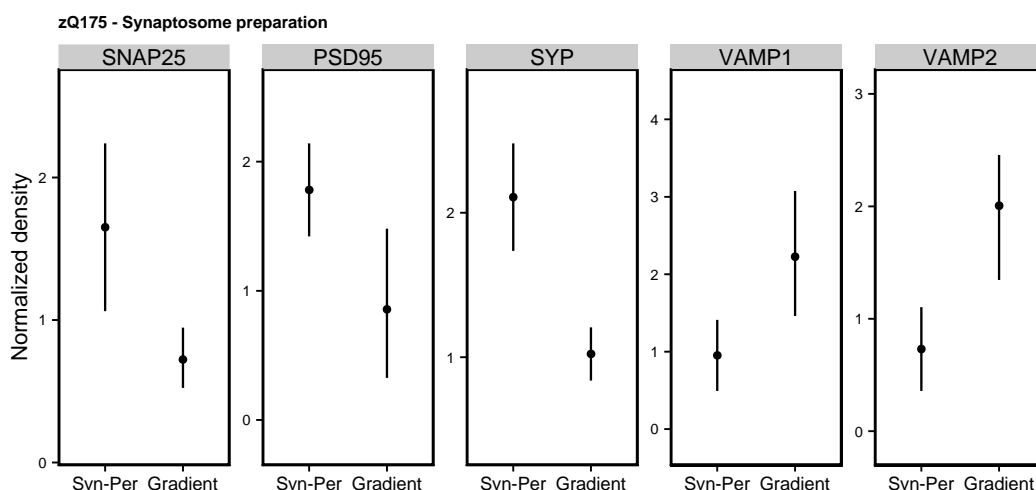
Obr. 10 Porovnání hladiny specifických synaptických proteinů v peletu 1 a v synaptosomové frakci po izolaci Syn-PER kitem (zelená barva) a pomocí

sacharózového gradientu (žlutá barva). U Syn-PER kitu pozorujeme nabohacení specifických proteinů v porovnání s izolací pomocí sacharózového gradientu.

4.1.2.2 Porovnání hladiny proteinů v synaptosomech připravených Syn-PER kitem a sacharózovým gradientem

Porovnání rozdílů mezi izolacemi synaptosomů pomocí kombinace sacharózového gradientu s ultracentrifugací a komerčně dostupného kitu Syn-PER na úrovni proteinů pomocí metody western blot.

V synaptosomech připravených komerčně dostupným kitem Syn-PER jsme zjistili vyšší zastoupení pre- a post-synaptických proteinů (SNAP25, PSD95 a SYP) oproti sacharózovému gradientu, kde bylo větší množství vesicle-associated membrane proteinů (VAMP1 a VAMP2) (Obr.11).

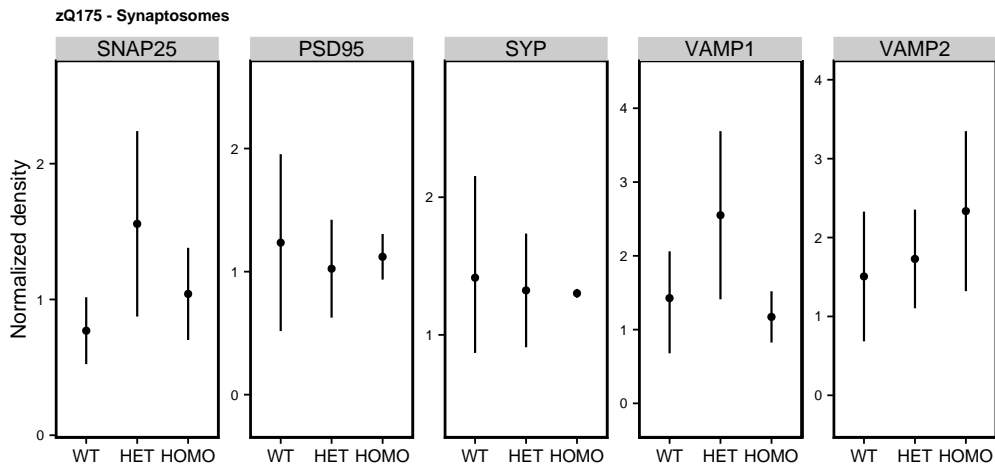


Obr. 11 Porovnání hladiny specifických synaptických proteinů v synaptosomech připravených pomocí kitu Syn-PER a sacharózového gradientu. Vyšší hladina proteinů po izolaci Syn-PER byla zaznamenána u SNAP25, PSD95 a SYP, oproti vyšší hladině VAMP1 a 2 po izolaci sacharózovým gradientem.

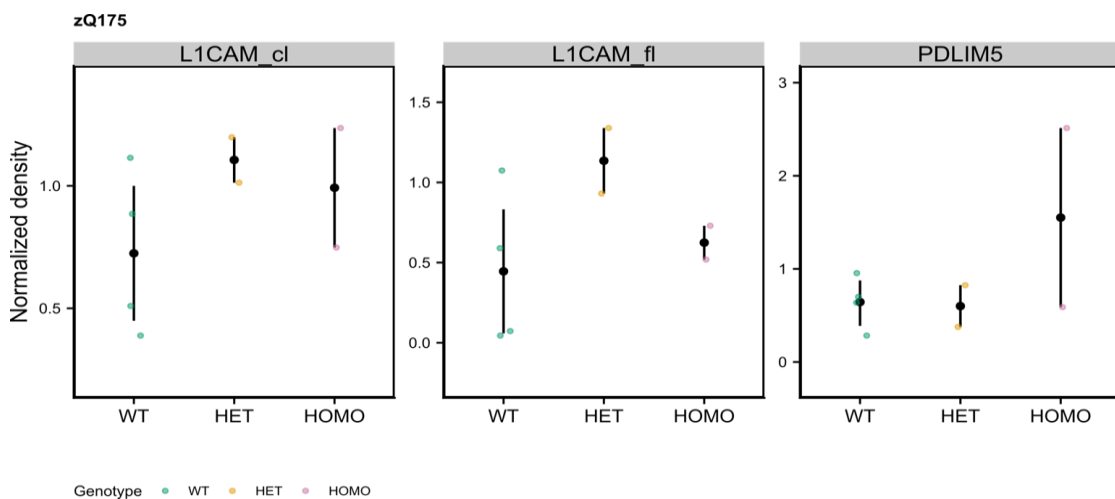
4.1.2.3 Synaptické proteiny v synaptosomové frakci pod vlivem mHTT

Normalizované hladiny proteinů ve vzorcích synaptosomů byly detekovány pomocí metody western blot a srovnány mezi vzorky z kontrolních a HD myši. Zjistili jsme, že hladina specifických synaptosomálních proteinů se s přítomností mHTT mění. Hladina

proteinů SNAP25, VAMP1 (**Obr.12**) a L1CAM (v plné délce, **Obr. 13**) stoupá u heterozygotů. U štěpené formy proteinu L1CAM vidíme nárůst i u homozygotní populace (**obr.13**). Hladina proteinu VAMP2 stoupá s mHTT (**obr.12**). U proteinů SYP, PSD95 a PDLIM5 se hladina téměř nemění. (**Obr.12 a obr.13**).



Obr. 12 Znárodnuje rozdilné koncentrace specifických synaptických proteinů pod vlivem mHTT u SNAP25, VAMP1 a VAMP2. Proteiny PSD95 a SYP zůstávají nezměněny.

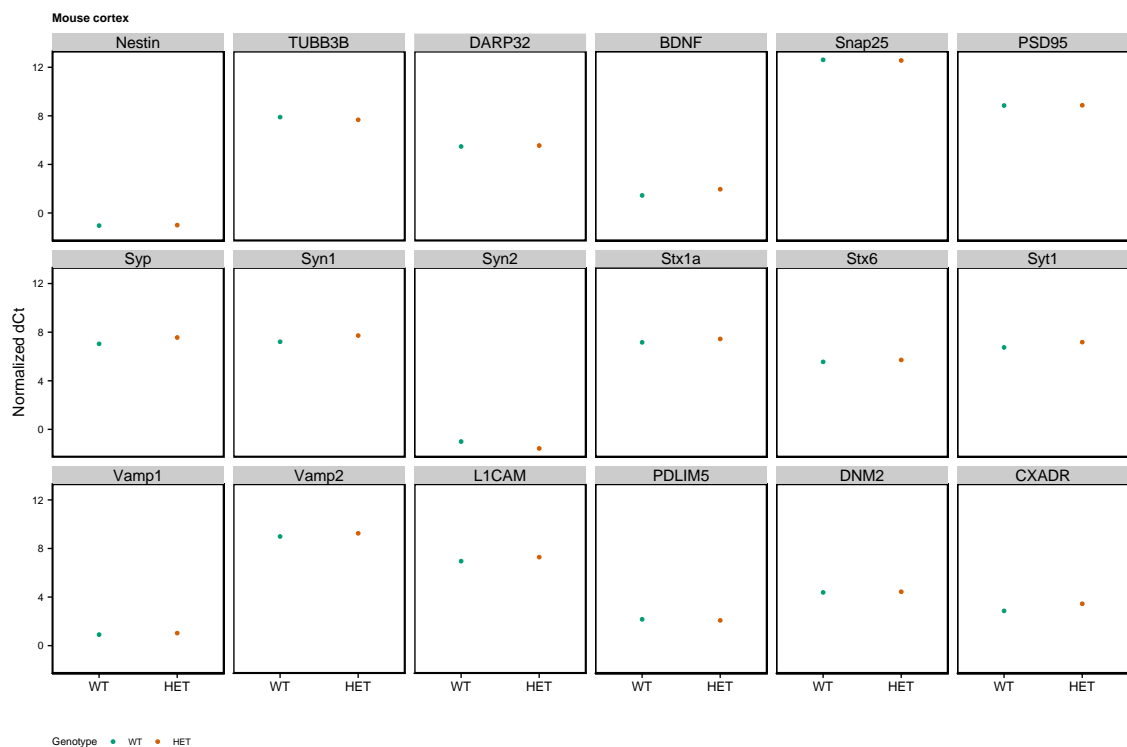


Obr. 13 Rozdily v koncentraci specifických synaptických proteinů mezi kontrolními a HD zvířaty. Hladina PDLIM5 se nemění, ale protein L1CAM se zvyšuje v přítomnosti mHTT

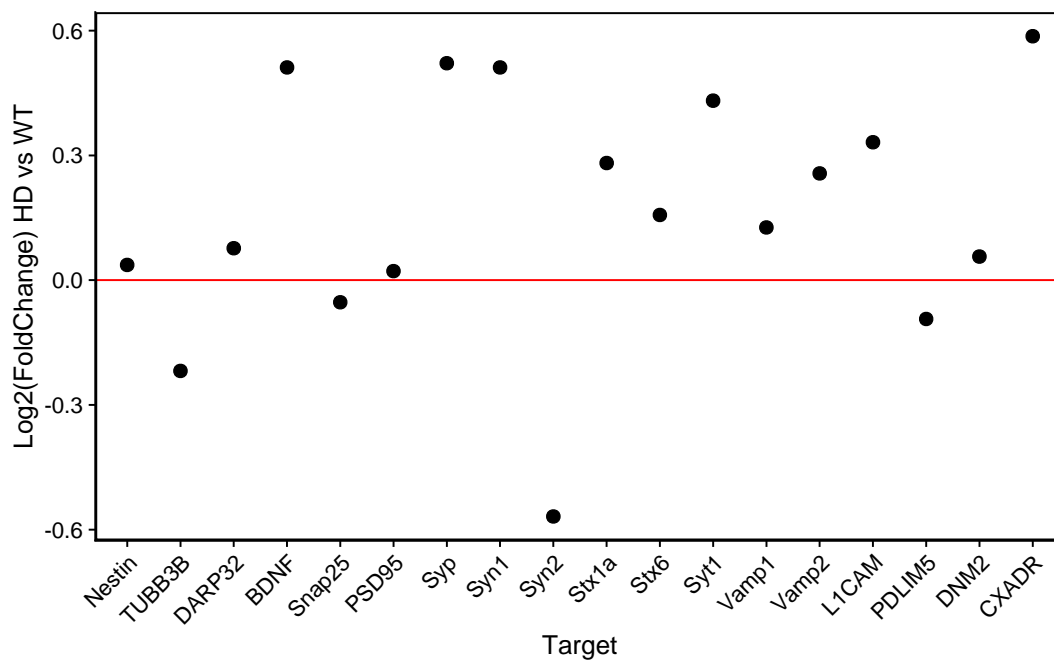
a to zejména u heterozygotní populace u plné délky proteinu a u štěpené formy dochází ke zvýšení L1CAM proteinu i homozygotů.

4.1.3 Genová exprese

Pro stanovení genové exprese jsme vybrali geny na úrovni nervových kmenových buněk (*Nestin*), neuronů (*Tubb3*, *Darp32*), *Bdnf*, synaptických proteinů (*Snap25*, *Psd95*, *Syp*, *Syn1*, *Syn2*, *Stx1a*, *Syx6*, *Syt*, *Vamp1*, *Vamp2*, *L1cam*, *Pdlim5*), *Dnm2*, *Cxadr*. Výsledky testování primerů na tyto geny na kortexu dospělých myší Q7/Q7 a Q175/Q7 znázorňuje **Obr. 14** s normalizovanou expresí daných genů, kde nevidíme velké rozdíly mezi Q7/Q7 a Q175/Q7. Pro zvýraznění malých rozdílů jsou v **Obr. 15** data znázorněna formou relativní exprese (log2 poměr, kde 0 odpovídá nezměněné expresi).



Obr. 14 Normalizovaná genová exprese na vzorcích kortexů dospělých myší (Q7/Q7) a heterozygotní populací (Q175/Q7).

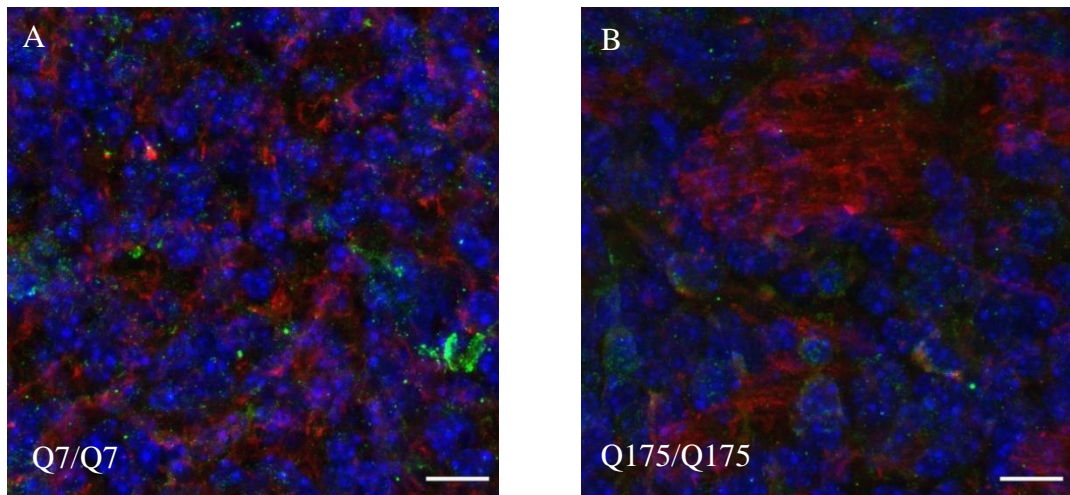


Obr. 15 Relativní genová exprese na kortexu dospělého mozku (Q7/Q7) a heterozygotní populací (Q175/Q7).

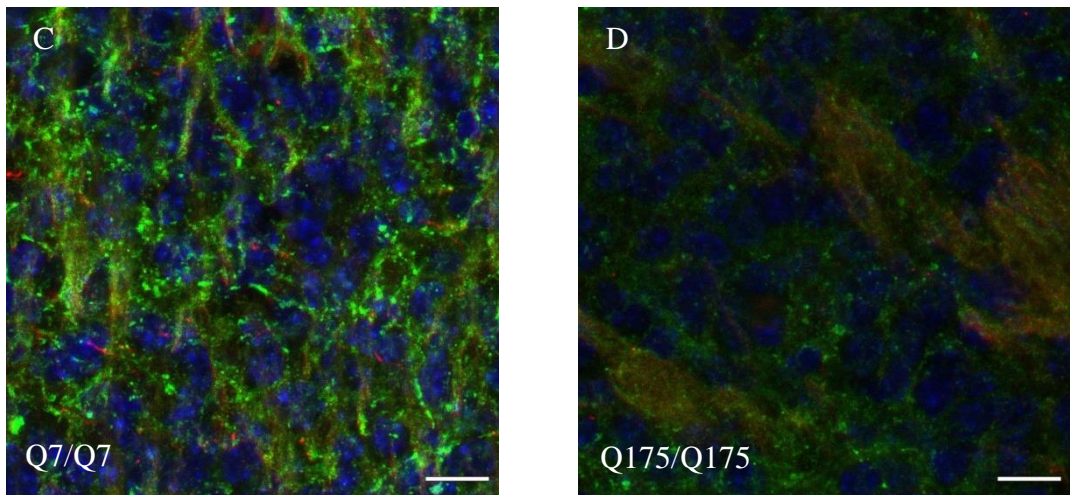
4.1.4 Imunofluorescence

Pomocí konfokální mikroskopie jsme detekovali vybrané proteiny přímo v histologickém řezu mozku fětu ve stáří E17.5. Na histologických řezech mozků byly detekovány cílové proteiny (SNAP 25, ACETYLOVANÝ TUBULIN, SYP, L1CAM). U řezů wtHTT (Q7/Q7) byl detekován vyšší signál u pre-synaptického proteinu SNAP25 a proteinu SYP (**obr. 16 A a C**) oproti signálu detekovaném v řezech mHTT (Q175/Q175) zobrazeném v **obr. 16 B a D**.

SNAP 25 (zelená), ACETYLOVANÝ TUBULIN (červená), DAPI (modrá)



SYP (zelená), L1CAM (červená), DAPI (modrá)



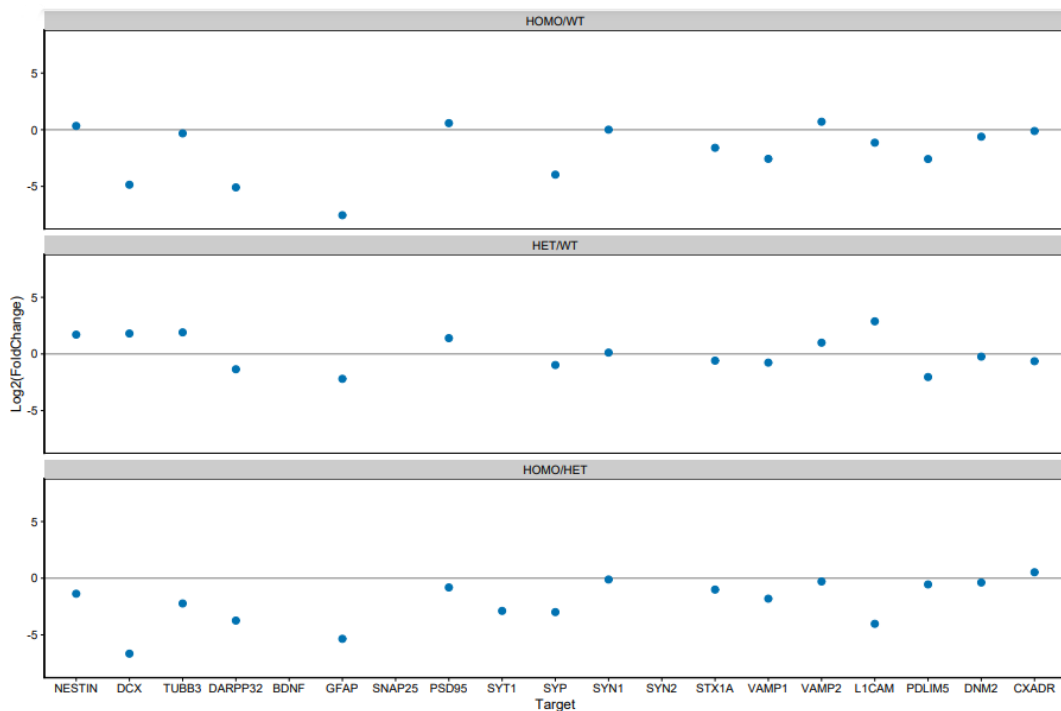
Obr. 16 *Imunobarvení histologických řezů mozku fětu ve věku E17.5 specifickými protilátkami vykazuje vyšší signál SNAP25 (zelená) u Q7/Q7 (A) oproti Q175/Q175 (B) a silnější signál proteinu SYP u Q7/Q7 (C) v porovnání s Q175/Q175 (D). Měřítka je 100 μ m.*

4.2 Nervové kmenové buňky

4.2.1 *In vitro* kultivace NSC izolovaných z *in vivo* myších fétů zQ175 a Q7 a sledování vlivu Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) na synaptogenezi/synapse

4.2.2 Genová exprese

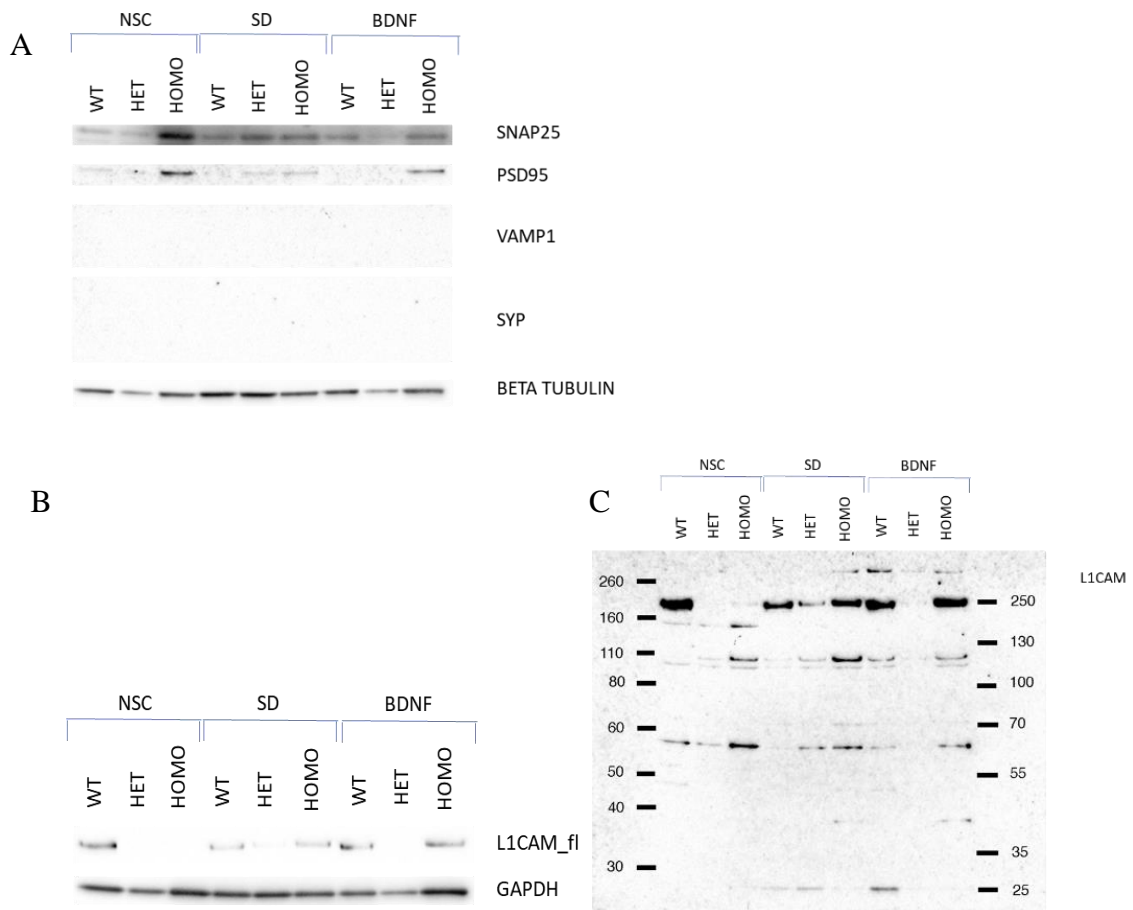
Pro stanovení hladiny genové exprese byly vybrány vzorky buněk (Q175/Q175 (HOMO), Q175/Q7 (HET) a Q7/Q7 (WT)) po 10denní *in vitro* kultivaci v BDNF o koncentraci 10 ng/ml média. Pro určení genové exprese jsme vybrali geny otestované na kortexu dospělých jedinců (viz. kapitola 4.2). **Obr.18** znázorňuje rozdíly v expresi sledovaných genů při porovnání jednotlivých linií HOMO/WT, HET/WT a HOMO/WT. U žádného genu nebyla zaznamenána výraznější hladina transkripce u homozygotní linie. Nejvýraznější rozdíly byly zaznamenány u genů *Dcx*, *Gfap*, *Darpp32*, *Syp* a *L1CAM*. U heterozygotní linie byla zaznamenána zvýšená hladina exprese u genů *Dcx* a *L1cam* u kontrolní linie (WT) k vyšší expresi dochází u genů *Gfap*, *Darpp32* a *Syp*.



Obr. 18 Ukazuje rozdíly v expresi genů mezi jednotlivými genotypy (HOMO/WT, HET/WT a HOMO/WT). Pro zvýraznění rozdílů jsou data znázorněna formou relativní exprese (\log_2 poměr, kde 0 odpovídá nezměněné expresi).

4.2.3 Detekce specifických synaptických proteinů pomocí western blotů

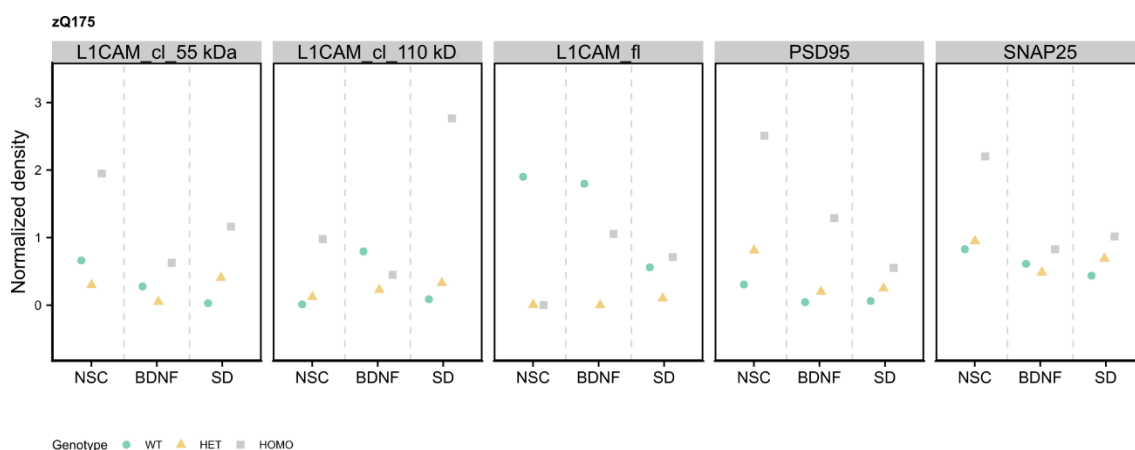
Pro detekci specifických synaptických proteinů byly použity buňky z *in vitro* kultivací ve stádiu NSC, po 10denní kultivaci bez růstových faktorů (SD) a 10denní kultivaci s 10 ng/ml BDNF. **Obr.19 A, B** znázorňují detekci synaptických proteinů a příslušných nanášecích kontrol (BETA TUBULIN A GAPDH) u NSC a buněk s rozdílnou kultivací (SD a BDNF) v různých liniích (homozygotní, heterozygotní a kontrolní). Proteiny VAMP1 a SYP nebyly detekovány v žádném vzorku. V ostatních vzorcích jsou detekované proteiny PSD95 a SNAP25, které před normalizací vykazují zvýšenou hladinu u NSC v homozygotní linii. Protein L1CAM (v plné délce) je nejvíce nabohacen u WT linie. Buňky kultivované v BDNF mají detekovaný PSD95 a SNAP25 u homozygotů. **Obr.19 C** znázorňuje celou membránu s detekovaným proteinem L1CAM. Jedná se o obrázek membrány s prodlouženou délkou expozice pro zviditelnění štěpených forem proteinu (110 a 55 kDa).



Obr. 19 Membrány s detekovanými proteiny ve vzorcích NSC, SD a BDNF ve vzorcích Q7/Q7 (WT), Q175/Q7 (HET) a Q175/Q175 (HOMO). A) Zobrazení detekce SNAP25

a PSD95 proteinu. Proteiny VAMP1 a SYP nebyly pomocí western blotů detekovány. BETA TUBULIN je příslušná nanášecí kontrola. B) Detekce L1CAM_{fl} s příslušnou nanášecí kontrolou GAPDH. C) Celá membrána s detekcí L1CAM_{fl} a jeho štěpených forem. Jedná se o detekci L1CAM s prodlouženou délkou expozice na 700 sec.

Pro porovnání hladin proteinů byly vybrány následující proteiny: PSD95, SNAP25 a L1CAM_{fl}, L1CAM_{cl} 55 kDa a L1CAM_{cl} 110 kDa. Po normalizaci na nanášecí kontrolu byla zjištěna zvýšená hladina proteinu PSD95 ve vzorcích NSC a BDNF u homozygotní linie. SNAP25 vykazuje zvýšenou hladinu u NSC v homozygotní linii. L1CAM_{fl} měl nejvyšší hladinu u kontrolní linie ve vzorcích NSC a BDNF. Oproti tomu štěpené formy L1CAM o délce 55 kDa jsou zvýšené ve všech vzorcích homozygotní linie, zejména NSC a SD, a štěpené formy s délkou 110 kDa v homozygotní linii ve vzorcích NSC a výrazně zvýšené ve vzorku SD.



Obr. 20 Porovnání hladiny detekovaných proteinů u NSC, SD a BDNF. Po normalizaci na nanášecí kontrolu byla zaznamenána vyšší hladina PSD95 ve vzorcích NSC a BDNF u homozygotní linie. Homozygotní linie má vyšší hladinu proteinu SNAP25 ve vzorku NSC. Protein L1CAM_{fl} vykazuje vyšší hladinu v kontrolních (WT) vzorcích NSC a BDNF. L1CAM_{cl} o délce 55 kDa má vyšší hladinu ve všech vzorcích u homozygotní linie a L1CAM_{cl} o délce 110 kDa je zvýšen u homozygotní linie v NSC a výrazně vyšší hladina byla zaznamenána v SD vzorku homozygotní linie.

4.2.4 Imunobarvení

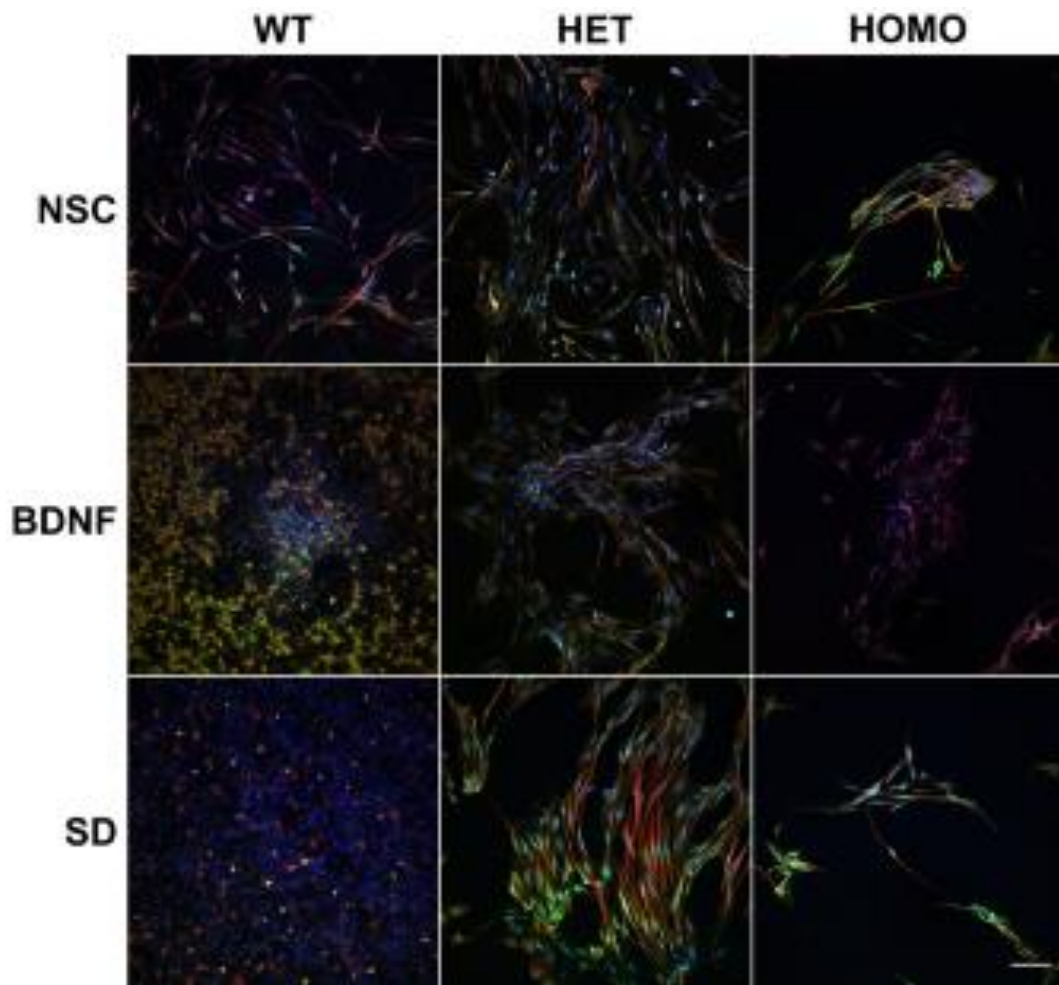
Specifické proteiny byly detekovány ve vzorcích NSC a následné 10denní kultivaci bez růstových faktorů (SD) a 10denní kultivaci v 10 ng/ml BDNF. V **Tab. 2** je znázorněn

seznam všech detekovaných proteinů zahrnující detekci proteinu huntingtin, specifické markery NSC (SOX2 a NESTIN), markery pro NSC a neurony (ACETYLOVANÝ TUBULIN a N-CADHERIN). Specifické markery: neuronů (TUBBIII), astrocytů (GFAP), oligodendrocytů (CNPase) a synaptických proteinů (PSD95, SYP, SNAP25, VAMP2, L1CAM a PDLIM). V tabulce je vyznačena síla signálu (+++ nejsilnější, ++ střední, + je detekován, - není detekován). Ve všech liniích je detekován protein huntingtin. Markery NSC, SOX2 a NESTIN jsou detekovány nejen v NSC, ale přetrvávají i v SD a BDNF vzorcích, kromě WT linie u BDNF, kde není detekován SOX2. Všechny linie ve všech vzorcích mají silný signál ACETYLOVANÉHO TUBULINU. Hladina N-CADHERINU je nejvyšší u NSC homozygotní linie. Nejvíce diferencující linie je linie kontrolní (WT) kultivovaná v SD podmínkách, u které jsou detekovány markery pro neurony, astrocyty a oligodendrocyty. U synaptických proteinů vidíme nejvyšší hladinu proteinu SNAP25 u všech vzorků a linií, k jeho mírnému snížení dochází po kultivaci v BDNF u heterozygotní a homozygotní linie. Proteiny PSD95 a SYP mají nízký nebo žádný signál. VAMP2 protein byl detekován v NSC a BDNF všech linií, nižší hladina byla detekovaná v SD u heterozygotů a bez signálu u vzorků SD kontrolní (WT) linie. Proteiny L1CAM a PDLIM byly detekovány ve všech vzorcích všech linií.

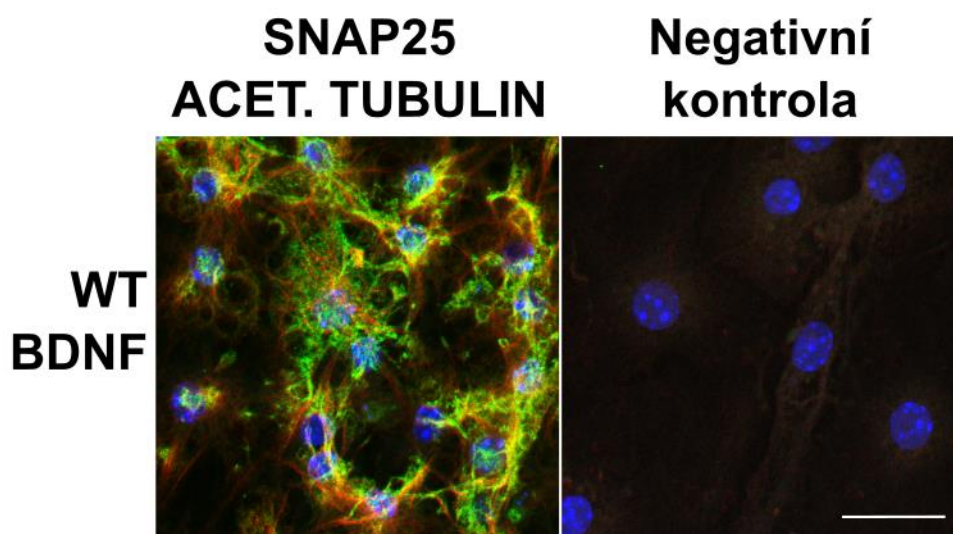
Tabulka 2 Zobrazuje sílu signálů proteinů ve vzorcích (NSC, SD a BDNF) v jednotlivých liniích (homozygoti, heterozygoti a kontroly), zahrnující protein huntingtin, markery NSC, markery diferencovaných buněk (TUBIII, GFAP a CNPase) a synaptických proteinů. Síla signálu (+++ nejsilnější, ++ střední, + je detekován, - není detekován).

| Primární protilátka | Detekce | NSC | | | SD | | | BDNF | | |
|----------------------------|-----------------|-----|-----|------|-----|-----|------|------|-----|------|
| | | WT | HET | HOMO | WT | HET | HOMO | WT | HET | HOMO |
| EPR5526 | Huntingtin | + | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | + | + | ++ |
| SOX2 | NSC | + | + | + | + | + | + | - | + | + |
| NESTIN | NSC | ++ | + | +++ | ++ | + | ++ | ++ | ++ | ++ |
| ACETYLOVANÝ TUBULIN | NSC/neurony | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| N-CADHERIN | NSC/neurony | - | + | +++ | + | + | - | + | + | - |
| TUBBIII | neurony | - | - | - | ++ | - | - | + | - | - |
| GFAP | astrocyty | ++ | - | + | +++ | - | - | ++ | + | - |
| CNPASE | oligodendrocyty | - | + | ++ | ++ | + | + | + | - | - |
| Synaptické proteiny | | | | | | | | | | |
| PSD-95 | | - | - | - | ++ | - | - | + | - | + |
| SYP | | ++ | + | - | - | + | - | + | + | - |
| SNAP25 | | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | + |
| VAMP2 | | ++ | +++ | ++ | - | + | ++ | ++ | ++ | ++ |
| L1CAM | | +++ | ++ | ++ | +++ | + | + | ++ | ++ | ++ |
| PDLIM | | ++ | ++ | ++ | +++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |

A



B



Obr. 21 *Imunobarvení na vzorcích NSC, SD a BDNF v jednotlivých liniích (homozygotní, heterozygotní a kontrolní). A) Imunobarvení na proteiny ACETYLOVANÝ TUBULIN (červená), SNAP25 (zelená), DAPI (modrá). Signál je zaznamenán ve všech vzorcích. Měřítka je 100 μm . B) Stejné imunobarvení na proteiny ACETYLOVANÝ TUBULIN (červená), SNAP25 (zelená), DAPI (modrá) u kontrolní line v BDNF a k tomu negativní kontrola. Měřítka 20 μm .*

Obrázky z konfokální mikroskopie jsou zobrazeny v **Obr. 21 A)**, kde je znázorněno imunobarvení na proteiny ACETYLOVANÝ TUBULIN (červená), SNAP25 (zelená), DAPI (modrá) na všech vzorcích (NSC, SD a BDNF) ve všech liniích (homozygotní, heterozygotní a kontrolní). V **Obr 21 B)** je stejné barvení při větším zvětšení 40x pro lepší zobrazení detekovaných proteinů a příslušná negativní kontrola.

5 DISKUSE

Cílem mé práce bylo sledovat a charakterizovat vliv mHTT na vývoj mozku a synaptogenezi. Pro sledování vlivu mHTT na tyto děje byla zvolena myší embrya ve stádiu 17.5 a dospělí jedinci ve věku 1 rok a 2 měsíce. Byli použity tři linie: homozygotní (Q175/Q175), heterozygotní (Q7/Q175), a kontrolní (Q7/Q7). Tito jedinci byli následně porovnání z hlediska specifických synaptických proteinů z izolovaných synaptosomů pomocí metody western blotu a buněk. Cílem bylo identifikovat změny v koncentracích detekovaných proteinů souvisejících s rozvojem onemocnění.

Aby bylo možné porovnávat koncentrace proteinů v mozkové tkáni, bylo potřeba izolovat synaptosomy, na kterých byly následně prováděny experimenty a analýzy potřebné pro můj výzkum. Synaptosomy jsou dlouhodobě využívány jako výzkumné objekty neurovědy. Pro odlišné výzkumné cíle a metodické postupy se využívají různé metody, protože ne každá metoda je vhodná pro každý směr výzkumu. V experimentech, které se zaměřují na biologii synapsí je nutné, aby vzorek synaptosomů obsahoval dostatek proteinového materiálu pro následnou analýzu, byl nabohacen o synaptické struktury a proteiny. Také je nutné, aby byl vzorek zbaven jiných typů buněk a kontaminujících subcelulárních organel⁹³.

Z tohoto důvodu jsem v práci porovnávala izolaci synaptosomů pomocí kombinace sacharózového gradientu s ultracentrifugací⁹⁴ a komerčně dostupného Syn-PER kitu na úrovni proteinů pomocí metody western blot. Obě tyto metody jsou funkční a vhodné k izolaci synaptosomů. Izolace SynPER kitem i pomocí gradientové metody vykazovaly nabohacení synaptických proteinů v synaptosomové frakci. Komerčně dostupným kitem Syn-PER bylo zjištěno vyšší zastoupení presynaptických a postsynaptických proteinů oproti sacharózovému gradientu. Po izolaci za pomoci sacharózového gradientu vzorky obsahovaly větší množství vesicle-associated membrane protein (VAMP1 a VAMP2).

Gulyássy et al., 2020 ve své studii porovnávali různé metody přípravy synaptosomů z mozku krysy na úrovni proteinů. Výsledky vyhodnocovali pomocí western blot analýzy. Jako presynaptický proteinový marker zvolili synaptofyzin a postsynaptický proteinový marker zvolili PSD95, jelikož je hlavní složkou postsynaptické denzity. Z jejich výsledků vyplývá, že po izolaci Syn-PER kitem jsou vzorky více kontaminovány ve srovnání se vzorky, které byly izolovány za pomoci sacharózového gradientu. Izolace synaptosomů pomocí sacharózového gradientu dle jejich výsledků poskytl

93 GULYÁSSY, Péter et al. *Proteomic comparison of different synaptosome preparation procedures*. *Amino Acids*. 2020, roč. 52, č. 11–12. DOI: 10.1007/s00726-020-02912-6

94 HAJÓS, F. *An improved method for the preparation of synaptosomal fractions in high purity*. *Brain Research*. 1975, roč. 93, č. 3. DOI: 10.1016/0006-8993(75)90186-9

presynaptické i postsynaptické proteiny v nejvyšším poměru⁹⁵. V tomto případě se mé výsledky patrně liší od zmiňované studie.

Studie Valencia et al. (2013) uvádí, že synaptosomová frakce byla nabohacena o presynaptické i postsynaptické proteiny⁹⁶, což se shoduje s našimi výsledky. Tato studie také uvádí, že hladina mHTT u HD linie byla vyšší než hladina wtHTT u wt linie. Z našich výsledků vyplývá, že hladina wtHTT i mHTT je vyšší u dospělých heterozygotů. Domníváme se, že je to způsobeno rozdílným stářím myši použitých pro experimenty. Jedna z námi použitých myši byla stará 1 rok a ta druhá pouze 2 měsíce. Stáří myši ovlivňuje míru agregace mHTT. Ve vzorku, který byl odebrán ze starší myši se nachází více inkluzí, které jsou tvořeny agregovaným mHTT a ten tedy není detekován western blotem.

Protein huntingtin je scafolldový protein, jehož funkce významně ovlivňuje synaptickou neurotransmisi. Patogenní expanze mHTT ovlivňuje funkce a působení proteinů, které tvoří komplexy s HTT. Časná synaptická dysfunkce charakteristická pro Huntingtonovu chorobu je způsobena změnou hladin klíčových proteinů pro synaptickou neurotransmisi⁹⁷. V této práci jsem zkoumala, jak přítomnost mHTT ovlivňuje hladinu proteinů, které interagují s HTT. Pro výzkum byly vybrány hlavní presynaptické i postsynaptické proteiny: SNAP25, PSD95, synaptofyzin, VAMP1, VAMP2, L1CAM a PDLIM5. Bylo zjištěno, že hladina proteinů SNAP25 a L1CAM (v plné délce) je nejvyšší u heterozygotů. Hladina proteinů synaptofyzin a PSD95 se téměř nemění. Protein PDLIM5 má nejvyšší hladinu u heterozygotů a hladina proteinu VAMP2 roste s přítomností mHTT. Hladina proteinu VAMP1 nepatrně klesla u homozygotů.

Valencia et al., (2013) ve své studii také zkoumali vliv mHTT na hladinu 11ti synaptických proteinů. 5 z nich jsou shodné s mnou zkoumanými proteiny. V této studii byly použity 3, 6 a 12 měsíců staré myši HD linie Q140. Pro izolaci synaptosomů byla využita metoda sacharózového gradientu kombinovaného s ultracentrifugací. Kvalita synaptosomálního preparátu byla vyhodnocena western blot analýzou. Valencia et al. (2013) uvádí, že hladiny synaptosomálních proteinů se významně liší u HD linie ve věku 12 měsíců oproti wt linii. Významný pokles hladiny zaznamenali u proteinů SNAP25, VAMP1, synaptofyzin a PSD95. Protein VAMP2 byl výrazně nabohacen⁹⁸.

95 GULYÁSSY, Péter et al. *Proteomic comparison of different synaptosome preparation procedures.*

96 VALENCIA, Antonio et al. *Striatal Synaptosomes from Hdh140Q/140Q Knock-in Mice have Altered Protein Levels, Novel Sites of Methionine Oxidation, and Excess Glutamate Release after Stimulation.*

97 BARRON, Jessica C., Emily P. HURLEY a Matthew P. PARSONS. *Huntingtin and the Synapse.*

98 VALENCIA, Antonio et al. *Striatal Synaptosomes from Hdh140Q/140Q Knock-in Mice have Altered Protein Levels, Novel Sites of Methionine Oxidation, and Excess Glutamate Release after Stimulation.*

Mnou získané výsledky po western blot analýze se shodují pouze u proteinů VAMP1, VAMP2 a PSD95. Výsledky imunofluorescenční mikroskopie naznačují nižší hladinu proteinů SNAP25 a synaptofyzin u fetů E17,5, což odpovídá výsledkům výše zmíněné studie. To, že naše výsledky a výsledky Valencia et al., 2013 nejsou naprosto shodné je nejspíše způsobeno rozdílným stářím myši použitých pro experimenty, různou délkou polyQ oblasti a také nízkým počtem námi provedených experimentů.

Technologie založené na nervových kmenových buňkách představují nový nadějný způsob léčby. U HD je cílem nahradit ztracené neurony anebo zabránit smrti nervových kmenových buněk. Fetální tkáň se v základním výzkumu využívá již mnoho let. Klinické studie zaměřující se na fetální tkáň se zabývají přestavbou mozkových struktur a nervových okruhů transplantací fetální tkáně do poškozeného nervového systému⁹⁹. Významnou roli při přežití, expanzi a diferenciaci má neurotrofický faktor BDNF. BDNF je široce distribuován v mozku dospělých savců¹⁰⁰. Je velmi důležitý pro neurogenezi, synaptickou plasticitu a synaptickou transmisí.^{101,102} WtHTT je nutný pro správný vezikulární transport BDNF a mHTT tento transport blokuje, jelikož zpomaluje rychlost transportovaných vezikul¹⁰³.

Chen et al. (2012) ve své studii zkoumali, zdali přidání BDNF stimuluje proliferaci a diferenciaci nervových kmenových buněk. Z jejich výsledků vyplývá, že BDNF stimuluje proliferaci a diferenciaci neuronálním směrem a oligodendrocytálním směrem, ale neovlivňuje diferenciaci do astrocytů¹⁰⁴. Další studie zabývající se diferenciací HD NSC v embryonálním stádiu (E16) popisuje, že buněk s markerem TUBBIII (neuronový marker) z HD linie (Q140/Q140) bylo po 20denní kultivaci v 100ng/ml BDNF výrazně

99 HADDAD, Mônica Santoro et al. *Cell-based technologies for Huntington's disease*. Dementia & Neuropsychologia. 2016, roč. 10, č. 4. DOI: 10.1590/s1980-5764-2016dn1004006

100 KIM, Hyun Sook et al. *Intracerebral Transplantation of BDNF-overexpressing Human Neural Stem Cells (Hb1.F3.BDNF) Promotes Migration, Differentiation and Functional Recovery in a Rodent Model of Huntington's Disease*. Experimental Neurobiology. 2020, roč. 29, č. 2. DOI: 10.5607/en20011

101 KOWIAŃSKI, Przemysław et al. *BDNF: A Key Factor with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity*. Cellular and Molecular Neurobiology. 2018, roč. 38, č. 3. DOI: 10.1007/s10571-017-0510-4

102 LEAL, Graciano et al. *Regulation of hippocampal synaptic plasticity by BDNF*. Brain Research. 2015, roč. 1621. DOI: 10.1016/j.brainres.2014.10.019

103 *Mutant Huntingtin Blocks BDNF Transport*. Science's STKE. 2004, roč. 2004, č. 241. DOI: 10.1126/stke.2412004tw250

¹⁰⁴ CHEN, Bei-Yu et al. *Brain-derived neurotrophic factor stimulates proliferation and differentiation of neural stem cells, possibly by triggering the Wnt/ β -catenin signaling pathway*. Journal of Neuroscience Research. 2012. DOI: 10.1002/jnr.23138

méně oproti kontrolní linii. Buňky s trofickou podporou BDNF více diferenciovaly do neuronů u HD linie i kontrolní linie. Na proteinové úrovni bylo více GFAP pozitivních buněk v HD linii oproti kontrolní linii Q7¹⁰⁵.

V naší práci jsme porovnávali buňky po spontánní diferenciaci (bez růstových faktorů EGF, bFGF) a buňky s trofickou podporou BDNF. Byla použita homozygotní linie Q175/Q175, heterozygotní Q175/Q7 linie a kontrolní wt linie Q7/Q7. U všech linií jsme sledovali vybrané markery, které jsou charakteristické pro průběh buněčné diferenciaci do neuronálních linií. Sledování těchto markerů probíhalo na úrovni genové exprese a hladiny proteinů pomocí metody Western blot a imunobarvení buněk. Vybrali jsme geny, které jsou markery určitých druhů diferenciaci. Gen *Dcx* je exprimován neuronálními prekurzory a nematurovanými neurony. TUBBIII (v některých studiích Tuj1) je markerem neuronů. GFAP je marker zralých neuronů a CNPase je marker oliodendrocytů. Přítomnost huntingtin proteinu jsme ověřili pomocí imunobarvení.

Z našich výsledků vyplývá, že u žádného genu nebyla zaznamenána výrazná změna hladiny transkripce v homozygotní linii. V heterozygotní linii došlo k vyšší expresi genu *Dcx*, což je prekursor neuronů a také došlo k mírnému zvýšení exprese TUBBIII. To může být způsobeno působením BDNF, jelikož ve výše zmíněné studii došli ke stejným závěrům. Gen *Gfap* byl více exprimován u wt linie. V tomto případě se naše výsledky liší od studie Ritch et al. (2012). Rozdíly mezi našimi výsledky a výsledky Ritch et al. (2012) jsou nejspíše způsobeny tím, že Ritch et al. (2012) použili více koncentrovaný roztok BDNF a také buňky kultivovali téměř dvakrát déle. Nestin přetrvává i v diferencovaných buňkách, což se shoduje s výsledky už zmíněných studií.

To, že dodávání BDNF podporuje NSC dokazují i studie Zimmerman et al. (2016), ve které byly NSC overexprimující BDNF transplantovány do mozku dvou linií HD myší (R6/2 a N172-82Q) a myší u kterých byla provedena léze pomocí quinolinic acid, která má neurotoxický účinek a v mozku vyvolává změny, které jsou podobné změnám jako u HD. Ve studii bylo prokázáno, že NSC migrovaly do místa poškození a byly schopné diferencovat do specifických striatálních buněk (Darpp-32 pozitivních buněk), což vedlo ke zlepšení behaviorálních testů, motorických funkcí a snížení zánětu¹⁰⁶.

Kim et al. (2020) se ve své studii zabývali užitečností lidských kmenových buněk s overexpresí BDNF. Nervové progenitory s nadměrnou expresí BDNF pocházející

¹⁰⁵ RITCH, James J. et al. *Multiple phenotypes in Huntington disease mouse neural stem cells*.

¹⁰⁶ ZIMMERMANN, Tina et al. *ESC-Derived BDNF-Overexpressing Neural Progenitors Differentially Promote Recovery in Huntington's Disease Models by Enhanced Striatal Differentiation*. *Stem Cell Reports*. 2016, roč. 7, č. 4. DOI: 10.1016/j.stemcr.2016.08.018

z embryonálních kmenových buněk prokázaly účinnost při podpoře zotavení kvůli preferenční diferenciaci neurálním směrem¹⁰⁷.

L1CAM protein nebyl dosud podrobně zkoumán ve vztahu k HD. U všech linií NSC (WT, HET a HOMO) byl zaznamenán fragment kolem 140-150 kDa, který odpovídá posttranslačnímu štěpení plazminem v myším mozku v podmínkách *in vivo*¹⁰⁸. Zajímavé jsou fragmenty kolem 110 kDa, jde převážně o ten výrazně zvýšený u homozygotů v SD podmínkách a fragmenty kolem 55 kDa, které vykazují vyšší hladinu u NSC, SD i BDNF homozygotní linie. Zde bude muset proběhnout další bližší zkoumání, o jaký fragment se jedná, protože máme zvýšenou proteinovou úroveň v bandu kolem 55 kDa. Zde vyvstává otázka, jestli se může jednat o produkt štěpení proteázou PC5A¹⁰⁹. Kleene, 2021 ve své práci popisuje interakci fragmentu L1CAM o délce 55 kDa s heterochromatinovým proteinem HP1 v jádrech neuronů. Tato interakce ovlivňuje migraci neuronů a růst axonů¹¹⁰.

107 KIM, Hyun Sook et al. *Intracerebral Transplantation of BDNF-overexpressing Human Neural Stem Cells (HB1.F3.BDNF) Promotes Migration, Differentiation and Functional Recovery in a Rodent Model of Huntington's Disease.*

108 NAYEEM, N. et al. *A potential role for the plasmin(ogen) system in the posttranslational cleavage of the neural cell adhesion molecule L1.* Journal of Cell Science. 1999, roč. 112, č. 24.
DOI: 10.1242/jcs.112.24.4739

109 STOYANOVA, Irina I. a David LUTZ. *Functional Diversity of Neuronal Cell Adhesion and Recognition Molecule L1CAM through Proteolytic Cleavage.*

110 KLEENE, Ralf et al. *Cell adhesion molecule L1 interacts with the chromo shadow domain of heterochromatin protein 1 isoforms α , β , and γ via its intracellular domain.* The FASEB Journal. 2022, roč. 36, č. 1. DOI: 10.1096/fj.202100816R

6 ZÁVĚR

Porovnali jsme izolaci synaptosomů ze striata dospělých myší pomocí ultracentrifugace v sacharózovém gradientu a komerčně dostupným kitem Syn-PER Synaptic Protein Extraction Reagent. Oba typy izolací ukázaly nabohacení synaptických proteinů v synaptosomové frakci. Pomocí western blotů bylo zjištěno vyšší zastoupení pre- a post-synaptických proteinů (SNAP25, PSD95 a SYP) po izolaci komerčně dostupným kitem Syn-PER oproti sacharózovému gradientu, kde bylo větší množství synaptobrevinů (VAMP1 a VAMP2).

Genová exprese na úrovni porovnání kortexů dospělých jedinců mezi heterozygotní a kontrolní linií neukázala žádné významné rozdíly transkripce v synaptických genech ani v genech nervových kmenových buněk a neuronů.

V průběhu vývoje mozku dochází ke změnám na úrovni proteinu, které jsme pozorovali ve fetálních (E17.5) mozcích pomocí imunobarvení. Tyto mozky vykazují změny v proteinu Syp a SNAP25 u kterých byl zaznamenán silnější signál v kontrolní linii v porovnání s homozygotní linií.

Z fetálních mozků (E17.5) jsme také izolovali NSC, kde jsme na úrovni genové exprese zaznamenali nejvýraznější rozdíly u genů *Dcx*, *Gfap*, *Darpp32*, *Syp* a *L1cam* mezi jednotlivými genotypy.

Ve vzorcích NSC nebyly pomocí Western blot detekovány proteiny VAMP1 a SYP na rozdíl od proteinů PSD95 a SNAP25, které byly detekovány ve všech vzorcích. Protein L1CAM (v plné délce) byl nejvíce nabohacen u kontrolní linie. U buněk kultivovaných v BDNF byly detekovány proteiny PSD95 u homozygotů. L1CAM_{fl} měl nejvyšší koncentraci u kontrolní linie ve vzorcích NSC a BDNF. Oproti tomu štěpené formy L1CAM_{cl} 55 kDa měla zvýšenou koncentraci ve všech vzorcích homozygotních linií a L1CAM_{cl} 110 kDa v NSC a zejména v SD vzorku. Pomocí imunobarvení bylo zjištěno, že nejvíce diferencující linie je kontrolní, u které jsou detekovány markery pro neurony, astrocyty a oligodendrocyty. Ze synaptických proteinů byla zjištěna nejvyšší hladina proteinu SNAP25 u všech vzorků a linií, k jeho mírnému snížení dochází po kultivaci v BDNF u heterozygotní a homozygotní linie. Proteiny PSD95 a SYP měly sníženou nebo téměř žádnou koncentraci. Protein VAMP2 byl detekován v NSC a kultivaci s BDNF u všech linií, nižší hladina byla detekovaná v buňkách po spontánní diferenciaci (SD) u heterozygotů. Nenacházel se u vzorků SD kontrolní linie. Proteiny L1CAM a PDLIM byly detekovány ve všech vzorcích všech linií.

Na základě v této práci popsanych výsledků můžeme potvrdit hypotézu, že syntéza patogenního proteinu huntingtinu ovlivňuje synaptickou funkci a synaptogenezi v průběhu neuronálního vývoje. *In vitro* kultivace v SD a BDNF podmínkách probíhaly po dobu 10 dnů, zde nemůžeme prokázat vliv BDNF na synaptickou funkci, protože délka

kultivace nebyla dostačující na vznik synapsí. Na základě dosažených výsledků jsme získaly spoustu informací, které povedou k dalším experimentům v LAPA, zejména co se týká synaptogeneze a L1CAM proteinu na myším zQ175 modelu.

POUŽITÁ LITERATURA

ADAMS, Daniel J., Christopher P. ARTHUR a Michael H. B. STOWELL. Architecture of the Synaptophysin/Synaptobrevin Complex: Structural Evidence for an Entropic Clustering Function at the Synapse. *Scientific Reports*. 2015, roč. 5, č. 1, s. 13659. ISSN 2045-2322. DOI: 10.1038/srep13659

ANGO, Fabrice et al. Ankyrin-Based Subcellular Gradient of Neurofascin, an Immunoglobulin Family Protein, Directs GABAergic Innervation at Purkinje Axon Initial Segment. *Cell*. 2004, roč. 119, č. 2, s. 257–272. ISSN 00928674. DOI: 10.1016/j.cell.2004.10.004

ANTONUCCI, Flavia et al. SNAP-25, a Known Presynaptic Protein with Emerging Postsynaptic Functions. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*. 2016, roč. 8. ISSN 1663-3563. DOI: 10.3389/fnsyn.2016.00007

BAI, Fengju a Frank A. WITZMANN. Synaptosome Proteomics. In: BERTRAND, Eric a Michel FAUPEL, eds. *Subcellular Proteomics*. 43. Dordrecht: Springer Netherlands, 2007, s. 77–98. Subcellular Biochemistry. ISBN 978-1-4020-5942-1. DOI: 10.1007/978-1-4020-5943-8_6

BANO, D et al. Neurodegenerative processes in Huntington's disease. *Cell Death & Disease*. 2011, roč. 2, č. 11, s. e228–e228. ISSN 2041-4889. DOI: 10.1038/cddis.2011.112

BARRON, Jessica C., Emily P. HURLEY a Matthew P. PARSONS. Huntingtin and the Synapse. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2021, roč. 15, s. 689332. ISSN 1662-5102. DOI: 10.3389/fncel.2021.689332

BATHINA, Siresha a Undurti N. DAS. Brain-derived neurotrophic factor and its clinical implications. *Archives of Medical Science*. 2015, roč. 6, s. 1164–1178. ISSN 1734-1922. DOI: 10.5114/aoms.2015.56342

BERGSTRÖM, Tobias a Karin FORSBERG-NILSSON. Neural stem cells: Brain building blocks and beyond. *Uppsala Journal of Medical Sciences*. 2012, roč. 117, č. 2, s. 132–142. ISSN 0300-9734, 2000-1967. DOI: 10.3109/03009734.2012.665096

CURTIS, M.A. et al. The distribution of progenitor cells in the subependymal layer of the lateral ventricle in the normal and Huntington's disease human brain. *Neuroscience*. 2005, roč. 132, č. 3, s. 777–788. ISSN 03064522. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2004.12.051

EVANS, Gareth J.O. The Synaptosome as a Model System for Studying Synaptic Physiology. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2015, roč. 2015, č. 5, s. pdb.top074450. ISSN 1940-3402, 1559-6095. DOI: 10.1101/pdb.top074450

FARAGÓ, Anikó, Nóra ZSINDELY a László BODAI. Mutant huntingtin disturbs circadian clock gene expression and sleep patterns in *Drosophila*. *Scientific Reports*. 2019, roč. 9, č. 1, s. 7174. ISSN 2045-2322. DOI: 10.1038/s41598-019-43612-w

FERNANDEZ-MUÑOZ, Beatriz et al. Human Neural Stem Cells for Cell-Based Medicinal Products. *Cells*. 2021, roč. 10, č. 9, s. 2377. ISSN 2073-4409. DOI: 10.3390/cells10092377

FRANSEN, Erik et al. CRASH Syndrome: Clinical Spectrum of Corpus Callosum Hypoplasia, Retardation, Adducted Thumbs, Spastic Paraparesis and Hydrocephalus Due to Mutations in One Single Gene, L1. *European Journal of Human Genetics*. 1995, roč. 3, č. 5, s. 273–284. ISSN 1018-4813, 1476-5438. DOI: 10.1159/000472311

GOEHLER, Heike et al. A Protein Interaction Network Links GIT1, an Enhancer of Huntingtin Aggregation, to Huntington's Disease. *Molecular Cell*. 2004, roč. 15, č. 6, s. 853–865. ISSN 10972765. DOI: 10.1016/j.molcel.2004.09.016

GOTO, S. a A. HIRANO. Synaptophysin expression in the striatum in Huntington's disease. *Acta Neuropathologica*. 1990, roč. 80, č. 1, s. 88–91. ISSN 0001-6322, 1432-0533. DOI: 10.1007/BF00294227

GULYÁSSY, Péter et al. Proteomic comparison of different synaptosome preparation procedures. *Amino Acids*. 2020, roč. 52, č. 11–12, s. 1529–1543. ISSN 0939-4451, 1438-2199. DOI: 10.1007/s00726-020-02912-6

HADDAD, Mônica Santoro et al. Cell-based technologies for Huntington's disease. *Dementia & Neuropsychologia*. 2016, roč. 10, č. 4, s. 287–295. ISSN 1980-5764. DOI: 10.1590/s1980-5764-2016dn1004006

HAJÓS, F. An improved method for the preparation of synaptosomal fractions in high purity. *Brain Research*. 1975, roč. 93, č. 3, s. 485–489. ISSN 00068993. DOI: 10.1016/0006-8993(75)90186-9

HAYASHI, Yoshihito et al. Effects of neural stem cell transplantation in Alzheimer's disease models. *Journal of Biomedical Science*. 2020, roč. 27, č. 1, s. 29. ISSN 1423-0127. DOI: 10.1186/s12929-020-0622-x

HITOSHI, Seiji et al. Primitive neural stem cells from the mammalian epiblast differentiate to definitive neural stem cells under the control of Notch signaling. *Genes & Development*. 2004, roč. 18, č. 15, s. 1806–1811. ISSN 0890-9369, 1549-5477. DOI: 10.1101/gad.1208404

HUNTINGTON'S DISEASE SHEEP COLLABORATIVE RESEARCH GROUP et al. Further Molecular Characterisation of the OVT73 Transgenic Sheep Model of Huntington's Disease Identifies Cortical Aggregates. *Journal of Huntington's Disease*. 2013, roč. 2, č. 3, s. 279–295. ISSN 18796397. DOI: 10.3233/JHD-130067

CHEN, Bei-Yu et al. Brain-derived neurotrophic factor stimulates proliferation and differentiation of neural stem cells, possibly by triggering the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Journal of Neuroscience Research*. 2012, s. n/a-n/a. ISSN 03604012. DOI: 10.1002/jnr.23138

JAN ROTH. Huntingtonova nemoc. . 2010

JEONG, Sung-Jin et al. Huntingtin is localized in the nucleus during preimplantation embryo development in mice. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 2006, roč. 24, č. 1, s. 81–85. ISSN 0736-5748, 1873-474X. DOI: 10.1016/j.ijdevneu.2005.10.001

KEITH, Dove. Excitation control: balancing PSD-95 function at the synapse. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2008, roč. 1. ISSN 1662-5099. DOI: 10.3389/neuro.02.004.2008

KIEFEL, Helena et al. L1CAM: A major driver for tumor cell invasion and motility. *Cell Adhesion & Migration*. 2012, roč. 6, č. 4, s. 374–384. ISSN 1933-6918, 1933-6926. DOI: 10.4161/cam.20832

KIM, Hyun Sook et al. Intracerebral Transplantation of BDNF-overexpressing Human Neural Stem Cells (HB1.F3.BDNF) Promotes Migration, Differentiation and Functional Recovery in a Rodent Model of Huntington's Disease. *Experimental Neurobiology*. 2020, roč. 29, č. 2, s. 130–137. ISSN 1226-2560, 2093-8144. DOI: 10.5607/en20011

KLEENE, Ralf et al. Cell adhesion molecule L1 interacts with the chromo shadow domain of heterochromatin protein 1 isoforms α , β , and γ via its intracellular domain. *The FASEB Journal*. 2022, roč. 36, č. 1. ISSN 0892-6638, 1530-6860. DOI: 10.1096/fj.202100816R

KOWIAŃSKI, Przemysław et al. BDNF: A Key Factor with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2018, roč. 38, č. 3, s. 579–593. ISSN 0272-4340, 1573-6830. DOI: 10.1007/s10571-017-0510-4

KUDUMALA, Sirisha et al. Differential Effects of Human L1CAM Mutations on Complementing Guidance and Synaptic Defects in *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE*. 2013, roč. 8, č. 10, s. e76974. ISSN 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0076974

- LEAL, Graciano et al. Regulation of hippocampal synaptic plasticity by BDNF. *Brain Research*. 2015, roč. 1621, s. 82–101. ISSN 00068993.
DOI: 10.1016/j.brainres.2014.10.019
- LI, Endan et al. Neural stem cells derived from the developing forebrain of YAC128 mice exhibit pathological features of Huntington's disease. *Cell Proliferation*. 2020, roč. 53, č. 10. ISSN 0960-7722, 1365-2184. DOI: 10.1111/cpr.12893
- LIEBAU, Stefan et al. Maturation of Synaptic Contacts in Differentiating Neural Stem Cells. *STEM CELLS*. 2007, roč. 25, č. 7, s. 1720–1729. ISSN 1066-5099, 1549-4918.
DOI: 10.1634/stemcells.2006-0823
- MAGLOTT, D. R. et al. Radiation hybrid mapping of SNAP, PCSK2, and THBD (human Chromosome 20p). *Mammalian Genome*. 1996, roč. 7, č. 5, s. 400–401. ISSN 0938-8990, 1432-1777. DOI: 10.1007/s003359900120
- MCCOLGAN, P. a S. J. TABRIZI. Huntington's disease: a clinical review. *European Journal of Neurology*. 2018, roč. 25, č. 1, s. 24–34. ISSN 13515101.
DOI: 10.1111/ene.13413
- MCKINSTRY, S. U. et al. Huntingtin Is Required for Normal Excitatory Synapse Development in Cortical and Striatal Circuits. *Journal of Neuroscience*. 2014, roč. 34, č. 28, s. 9455–9472. ISSN 0270-6474, 1529-2401. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4699-13.2014
- MCMAHON, H T et al. Synaptophysin, a major synaptic vesicle protein, is not essential for neurotransmitter release. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996, roč. 93, č. 10, s. 4760–4764. ISSN 0027-8424, 1091-6490.
DOI: 10.1073/pnas.93.10.4760
- MENALLED, Liliana B a Marie-Françoise CHESSELET. Mouse models of Huntington's disease. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2002, roč. 23, č. 1, s. 32–39. ISSN 01656147. DOI: 10.1016/S0165-6147(00)01884-8
- NANCE, M. A. et al. Analysis of a very large trinucleotide repeat in a patient with juvenile Huntington's disease. *Neurology*. 1999, roč. 52, č. 2, s. 392–392. ISSN 0028-3878, 1526-632X. DOI: 10.1212/WNL.52.2.392
- NAYEEM, N. et al. A potential role for the plasmin(ogen) system in the posttranslational cleavage of the neural cell adhesion molecule L1. *Journal of Cell Science*. 1999, roč. 112, č. 24, s. 4739–4749. ISSN 1477-9137, 0021-9533.
DOI: 10.1242/jcs.112.24.4739
- NITHIANANTHARAJAH, J. a A.J. HANNAN. Dysregulation of synaptic proteins, dendritic spine abnormalities and pathological plasticity of synapses as experience-

dependent mediators of cognitive and psychiatric symptoms in Huntington's disease. *Neuroscience*. 2013, roč. 251, s. 66–74. ISSN 03064522.

DOI: 10.1016/j.neuroscience.2012.05.043

OLIVER, Darryll a P. REDDY. Dynamics of Dynamin-Related Protein 1 in Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Diseases. *Cells*. 2019, roč. 8, č. 9, s. 961. ISSN 2073-4409. DOI: 10.3390/cells8090961

PALLOVÁ, Daniela et al. Huntingtonova choroba a zvířecí modely. . roč. 2014, č. 6. ISSN 0044-4812.

PARSONS, Matthew P. et al. Bidirectional Control of Postsynaptic Density-95 (PSD-95) Clustering by Huntingtin. *Journal of Biological Chemistry*. 2014, roč. 289, č. 6, s. 3518–3528. ISSN 00219258. DOI: 10.1074/jbc.M113.513945

PECHO-VRIESELING, Eline et al. Transneuronal propagation of mutant huntingtin contributes to non-cell autonomous pathology in neurons. *Nature Neuroscience*. 2014, roč. 17, č. 8, s. 1064–1072. ISSN 1097-6256, 1546-1726. DOI: 10.1038/nn.3761

PENG, Qi et al. Characterization of Behavioral, Neuropathological, Brain Metabolic and Key Molecular Changes in zQ175 Knock-In Mouse Model of Huntington's Disease. *PLOS ONE*. 2016, roč. 11, č. 2, s. e0148839. ISSN 1932-6203.

DOI: 10.1371/journal.pone.0148839

PLUCHINO, Stefano, Jayden A. SMITH a Luca PERUZZOTTI-JAMETTI. Promises and Limitations of Neural Stem Cell Therapies for Progressive Multiple Sclerosis. *Trends in Molecular Medicine*. 2020, roč. 26, č. 10, s. 898–912. ISSN 14714914. DOI: 10.1016/j.molmed.2020.04.005

POLAVARAPU, Kiran et al. Recessive VAMP1 mutations associated with severe congenital myasthenic syndromes – A recognizable clinical phenotype. *European Journal of Paediatric Neurology*. 2021, roč. 31, s. 54–60. ISSN 10903798.

DOI: 10.1016/j.ejpn.2021.02.005

QI, Cai et al. Molecular mechanisms of synaptogenesis. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*. 2022, roč. 14, s. 939793. ISSN 1663-3563.

DOI: 10.3389/fnsyn.2022.939793

RAWLINS, Michael D. et al. The Prevalence of Huntington's Disease. *Neuroepidemiology*. 2016, roč. 46, č. 2, s. 144–153. ISSN 0251-5350, 1423-0208.

DOI: 10.1159/000443738

REINER, Anton et al. Wild-Type Huntingtin Plays a Role in Brain Development and Neuronal Survival. *Molecular Neurobiology*. 2003, roč. 28, č. 3, s. 259–276.

ISSN 0893-7648. DOI: 10.1385/MN:28:3:259

- REYNOLDS, Brent A. a Samuel WEISS. Generation of Neurons and Astrocytes from Isolated Cells of the Adult Mammalian Central Nervous System. *Science*. 1992, roč. 255, č. 5052, s. 1707–1710. ISSN 0036-8075, 1095-9203. DOI: 10.1126/science.1553558
- RITCH, James J. et al. Multiple phenotypes in Huntington disease mouse neural stem cells. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 2012, roč. 50, č. 1, s. 70–81. ISSN 10447431. DOI: 10.1016/j.mcn.2012.03.011
- RUBENSTEIN, John L. R. a Pasko RAKIC, eds. *Comprehensive developmental neuroscience: patterning and cell type specification in the developing CNS and PNS*. First edition. vyd. Amsterdam: Elsevier/Academic Press, 2013. ISBN 978-0-12-397265-1.
- SHIN, Mimi et al. Electrochemistry at the Synapse. *Annual Review of Analytical Chemistry*. 2019, roč. 12, č. 1, s. 297–321. ISSN 1936-1327, 1936-1335. DOI: 10.1146/annurev-anchem-061318-115434
- STATHAKIS, Dean G. et al. Human Postsynaptic Density-95 (PSD95): Location of the Gene (DLG4) and Possible Function in Nonneural as Well as in Neural Tissues. *Genomics*. 1997, roč. 44, č. 1, s. 71–82. ISSN 08887543. DOI: 10.1006/geno.1997.4848
- STOYANOVA, Irina I. a David LUTZ. Functional Diversity of Neuronal Cell Adhesion and Recognition Molecule L1CAM through Proteolytic Cleavage. *Cells*. 2022, roč. 11, č. 19, s. 3085. ISSN 2073-4409. DOI: 10.3390/cells11193085
- SÜDHOF, Thomas C. The cell biology of synapse formation. *Journal of Cell Biology*. 2021, roč. 220, č. 7, s. e202103052. ISSN 0021-9525, 1540-8140. DOI: 10.1083/jcb.202103052
- TAUPIN, Philippe. Adult neurogenesis and neuroplasticity. *Restorative Neurology and Neuroscience*. 2006, roč. 24, č. 1, s. 9–15. ISSN 0922-6028.
- TEMPLE, Sally. The development of neural stem cells. *Nature*. 2001, roč. 414, č. 6859, s. 112–117. ISSN 0028-0836, 1476-4687. DOI: 10.1038/35102174
- VALENCIA, Antonio et al. Striatal Synaptosomes from Hdh140Q/140Q Knock-in Mice have Altered Protein Levels, Novel Sites of Methionine Oxidation, and Excess Glutamate Release after Stimulation. *Journal of Huntington's Disease*. 2013, roč. 2, č. 4, s. 459–475. ISSN 18796397. DOI: 10.3233/JHD-130080
- WHITTAKER, Vp, Ia MICHAELSON a Rja KIRKLAND. The separation of synaptic vesicles from nerve-ending particles ('synaptosomes'). *Biochemical Journal*. 1964, roč. 90, č. 2, s. 293–303. ISSN 0006-2936. DOI: 10.1042/bj0900293

WINKLE, Cortney Chelise a Stephanie L. GUPTON. Membrane Trafficking in Neuronal Development: Ins and Outs of Neural Connectivity. In: *International Review of Cell and Molecular Biology*. 322. Elsevier, 2016, s. 247–280. ISBN 978-0-12-804809-2. DOI: 10.1016/bs.ircmb.2015.10.003

YAN, Sen et al. A Huntingtin Knockin Pig Model Recapitulates Features of Selective Neurodegeneration in Huntington's Disease. *Cell*. 2018, roč. 173, č. 4, s. 989-1002.e13. ISSN 00928674. DOI: 10.1016/j.cell.2018.03.005

YANG, Shang-Hsun et al. Towards a transgenic model of Huntington's disease in a non-human primate. *Nature*. 2008, roč. 453, č. 7197, s. 921–924. ISSN 0028-0836, 1476-4687. DOI: 10.1038/nature06975

YOO, Ki-Seo et al. Postsynaptic density protein 95 (PSD-95) is transported by KIF5 to dendritic regions. *Molecular Brain*. 2019, roč. 12, č. 1, s. 97. ISSN 1756-6606. DOI: 10.1186/s13041-019-0520-x

ZEITLIN, Scott et al. Increased apoptosis and early embryonic lethality in mice nullizygous for the Huntington's disease gene homologue. *Nature Genetics*. 1995, roč. 11, č. 2, s. 155–163. ISSN 1061-4036, 1546-1718. DOI: 10.1038/ng1095-155

ZHAO, Xinyu a Darcie L. MOORE. Neural stem cells: developmental mechanisms and disease modeling. *Cell and Tissue Research*. 2018, roč. 371, č. 1, s. 1–6. ISSN 0302-766X, 1432-0878. DOI: 10.1007/s00441-017-2738-1

ZIMMERMANN, Tina et al. ESC-Derived BDNF-Overexpressing Neural Progenitors Differentially Promote Recovery in Huntington's Disease Models by Enhanced Striatal Differentiation. *Stem Cell Reports*. 2016, roč. 7, č. 4, s. 693–706. ISSN 22136711. DOI: 10.1016/j.stemcr.2016.08.018

ZUCCATO, C a E CATTANEO. Role of brain-derived neurotrophic factor in Huntington's disease. *Progress in Neurobiology*. 2007, roč. 81, č. 5–6, s. 294–330. ISSN 03010082. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2007.01.003

HTT huntingtin [Homo sapiens (human)] [online]. 2022. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3064>

Mutant Huntingtin Blocks BDNF Transport. *Science's STKE*. 2004, roč. 2004, č. 241. ISSN 1525-8882. DOI: 10.1126/stke.2412004tw250

The Jackson Laboratory [online]. Dostupné z: <https://www.jax.org/strain/027410>

PŘÍLOHY

Příloha 1 Seznam primerů použitých při analýze genové exprese pomocí qRT-PCR:

| Zkratka | Foward (F) Reverse (R) | Primery | Délka produktu | Accession number NCBI |
|---------------|---------------------------|--------------------------|-------------------|--------------------------|
| <i>Syp</i> | F | ATCAACCCGATTACGGGCAG | 141 | NM_009305.2 |
| | R | GTGGGCTTCACTGACCAGAT | | |
| <i>Vamp2</i> | F | ACTGGTGGAAAAACCTCAAGATGA | 176 | NM_009497.3 |
| | R | GGGGGCTGAAAGATATGGCT | | |
| <i>Syn1</i> | F | CTGGACGTCCCGCCAAAC | 114 | NM_013680.4 |
| | R | GAGACTGGGATTTGTTGAGCTG | | |
| <i>Stx1a</i> | F | TCGCTCCAAGCTAAAGAGCAT | 155 | NM_016801.4 |
| | R | AGTCTGACTGAGTGGCGTTG | | |
| <i>Stx6</i> | F | AGCTGAGGAACAATCTCCGC | 171 | NM_021433.3 |
| | R | TCTGATCCTTCATGTCCCTGAC | | |
| <i>Syt1</i> | F | GACCATGAAGGATCAGGCC | 168 | NM_001252341.1 |
| | R | TCAGCAGCCTGGATGATTCC | | |
| <i>Syn2</i> | F | AGCTTCTTCAGCTCGCTGTC | 148 | NM_013681.3 |
| | R | GAAAGCATTGCGCCAGTCG | | |
| <i>Vamp1</i> | F | TGGTGGAAAACTGCAAGATGAT | 109 | NM_001080557.1 |
| | R | CCACCTCTTCACCCCATCAG | | |
| <i>Snap25</i> | F | GGATGAGCAAGGCGAACAAC | 134 | NM_011428.3 |
| | R | GCTTGTTACAGGGACACACAC | | |
| <i>Psd95</i> | F | AGCCCAGGATATGAGTTGC | 132 | NM_007864.3 |
| | R | TCACCGATGTGTGGGTTGTC | | |
| <i>Nes</i> | F | CGGGAGAGTCGCTTAGAGGT | 141 | NM_016701.3 |
| | R | TTCCACAGCCAGCTGGAAC | | |
| <i>Tubb3</i> | F | GCCAAGTCTGGGAGGTCAT | 132 | NM_023279.3 |

| | | | | |
|-----------------|---|-------------------------|-----|----------------|
| | R | GGGCACATACTTGTGAGAGGA | | |
| <i>Bdnf</i> | F | GAGCAAAGCCGAACTTCTCA | 129 | NM_007540.4 |
| | R | CTCACCTGGTGGAAACATTGTGG | | |
| <i>Darpp-32</i> | F | CCCGACAGGTGGAGATGATCC | 177 | NM_144828.2 |
| | R | CTTTCAGTGATGGGGGCGTA | | |
| <i>Gapdh</i> | F | GCCCTTGAGCTAGGACTGGA | 174 | NM_008084.3 |
| | R | TCTACGGGACGAGGCTGG | | |
| <i>Actb</i> | F | TATAAAACCCGGCGGCGCA | 117 | NM_007393.5 |
| | R | TCATCCATGGCGAACTGGTG | | |
| <i>Rpl13a</i> | F | GCGGATGAATACCAACCCCT | 179 | NM_009438.5 |
| | R | CCACCATCCGCTTTTTCTTGT | | |
| <i>L1cam</i> | F | CTTCGGCGAGTACAGGTCC | 171 | NM_008478.3 |
| | R | TACTGGCCGATGAAAGAGCC | | |
| <i>Pdlim5</i> | F | TTTCCGTCCAGAAGCCCAC | 137 | NM_001190856.1 |
| | R | GTTGCGCTCCACAATGTGTT | | |
| <i>Dnm2</i> | F | CCATACCCAATCAGGGGGAG | 173 | NM_001253893.1 |
| | R | GTCCAGTGGCAGCATGTACT | | |
| <i>Dcx</i> | F | CTCCTTGGATGAGAATGAATGC | 145 | NM_001110223.1 |
| | R | GTTACCTGAGTCAGCTGGAG | | |

Příloha 2 Seznam protilátek použitých při analýzách hladin proteinů metodou western blot:

| Primární protilátka | Molekulová hmotnost | Výrobce | Katalogové číslo | Ředění |
|---------------------|---------------------|-----------------|------------------|--------|
| PSD95 | 95kDa | Abcam | An13552 | 1:1000 |
| B-TUBULIN | 55kDa | Sigma – Aldrich | T4023 | 1:3000 |
| SYNAPTOFYZIN | 39kDa | Cell Signaling | 36406S | 1:1000 |
| SNAP25 | 23kDa | Abcam | Ab109105 | 1:1000 |

| | | | | |
|--------|-----------------------|-----------------|-----------|---------|
| VAMP1 | 13kDa | Abcam | Ab1517112 | 1:1000 |
| VAMP2 | 13kDa | Abcam | Ab181869 | 1:30000 |
| L1CAM | 200, 220, 140, 80 kDa | Abcam | ab24345 | 2:1000 |
| PDLIM5 | 64 kDa | Abcam | ab24345 | 1:1000 |
| GAPDH | 37 kDa | Sigma – Aldrich | G9545 | 1:1000 |

Příloha 3 *Seznam použitých primárních protilátek pro imunobarvení na řezech mozku myších fetů.*

| Primární protilátka | Výrobce | Kat.č. | Ředění |
|---------------------|----------------|----------|--------|
| L1CAM | Abcam | Ab24345 | 1:100 |
| SYNAPTOPHYSIN | Cell Signaling | 36406S | 1:100 |
| ACETYL TUBULIN | Sigma | T6793 | 1:500 |
| SNAP 25 | Abcam | Ab109105 | 1:150 |

Příloha 4 *Seznam primárních protilátek pro imunobarvení NSC, SD a BDNF.*

| Primární protilátka | Výrobce | Kat.č. | Ředění |
|---------------------|----------------|-------------|--------|
| N-CADHERIN | Cell Signaling | 14215 | 1:200 |
| SOX2 | Cell Signaling | 3579S | 1:400 |
| TUBBIII | Exbio | 11-264-C100 | 1:500 |
| EPR5526 | Abcam | Ab109115 | 1:1000 |
| PSD-95 | Abcam | ab13552 | 1:100 |
| PDLIM | Abcam | ab196559 | 1:50 |
| L1CAM | Abcam | ab24345 | 1:100 |
| SYNAPTOPHYSIN | Cell Signaling | 36406S | 1:100 |
| ACETYLOVANÝ TUBULIN | Sigma-Aldrich | T6793 | 1:500 |
| SNAP25 | Abcam | Ab109105 | 1:150 |
| CNPASE | Abcam | ab6319 | 1:100 |
| NESTIN | Cell Signaling | 10959 | 1:100 |

| | | | |
|-------|---------------|----------|--------|
| GFAP | Sigma-Aldrich | G3893 | 1:1000 |
| VAMP2 | Abcam | ab181869 | 1:500 |