

MYŠÍ MODELY SPINOCEREBELÁRNÍ ATAXIE TYPU 2

Z. Houdek

Ústav Patologické fyziologie LF UK v Plzni

Lidský mozeček je nejen centrem řízení motoriky, ale má i kognitivní funkce. Může být postižen mnoha neurodegenerativními chorobami, včetně více než 30 typů spinocerebelárních ataxií, které náleží mezi autozomálně dominantně degenerativní onemocnění a vyskytují se v lidské populaci s prevalencí 3–9/100 000 (9, 13). Tato skupina pomalu se rozvíjejících progresivních neurodegenerativních onemocnění je charakterizována poruchami chůze, držení těla, disartrií a dalšími symptomy (14). Lidská spinocerebelární ataxie typu 2 (SCA2) je způsobena prodlužováním repetice CAG tripletu v oblasti exonu 1 genu pro ataxin-2 na chromozomu 12 (lokus 12q24.1) (2, 11). U zdravých lidí obsahuje tento gen do 31 repetice CAG, nejčastěji 22 (1). U nemocných je počet opakování tripletu CAG obvykle 35–64. Lastres-Becker a spol. (8) uvádějí dokonce 32–200 repetice tohoto tripletu. Mutace vede k prodloužení polyglutaminové sekvence v proteinovém řetězci. Věkový projev postižení záporně koreluje s počtem repetice glutaminu (3).

V raných stádiích spinocerebelární ataxie typu 2 trpí pacienti progresivní ataxií, slábnou šlachové reflexy, zpomaluje se pohyb očí. V dalším stádiu následuje amyotrofie, smyslové poruchy, mimovolní pohyby a mentální rozklad. Substantia nigra je bezbarvá a hmotnost mozku se pohybuje od 690 do 1265 g. Z morfologických znaků vidíme, jak v mozečku postupně mizí Purkyňovy a granulární buňky. Nucleus dentatus zůstává nezměněn, ale silně jsou postižena jádra pontu a dolní oliva. Méně jsou postiženy nucleus ruber, bazální ganglia, talamus a mozková kůra. Různě jsou postiženy přední míšní rohy a hřbetní mícha (14). Relativně málo je známo o dějích v mozečku na celulórní a subcelulórní úrovni vyvolaných přítomností patologického ataxinu (3).

STRUKTURA A FUNKCE ATAXINU-2

Na úrovni sekvence nukleotidů se myší gen pro ataxin-2 shoduje s lidským z 89 %. Shoda aminokyselinového řetězce proteinu je 91 % (10). U myších embryí (v 8. dnu embryonálního vývoje) byly identifikovány 3 isoformy (I, II, III) příslušného transkriptu o molekulárních hmotnostech 136,5; 129 a 122,8 kDa (10). U člověka je nejrozšířenější isoformou ataxin-2 o molekulární hmotnosti 140–150 kDa (1, 6, 8), který je nejpodobnější myší isoformě I (136,5 kDa).

Intenzivní exprese ataxinu-2 byla u myší i lidí prokázána v mozku, minimální naopak v ledvinách a plicích (10). V mozku je jeho exprese rozdílná v různých oblastech. Je přito-

men v pyramidálních buňkách a v neuronech hipokampu, talamu a hypotalamu. Nejvyšší hladina ataxinu-2 byla ovšem nalezena v Purkyňových buňkách mozečku a Betzových buňkách v mozkovém kmeni. Málo je ataxin-2 zastoupen v neuronech granulórní zóny mozečku, gyrus dentatus, hipokampu a mozkové kůře. V gliích nebyl ataxin-2 zjištěn (10).

Fyziologická úloha ataxinu-2 není zcela jasná. Uplatňuje se v metabolických drahách RNA, podílí se na sestřihu pre-mRNA a rozkladu mRNA, hraje důležitou roli při iniciaci translace, protože má schopnost se vázat na RNA. Také je přítomen ve stresových granulích, které obsahují netranslantovanou mRNA a vznikají vlivem stresových situací (8). Ataxin-2 se podílí na endocytóze, protože má schopnost se vázat na endophilin-A. Bylo zjištěno, že přispívá ke sterilitě dospělců, letalitě embryí a brzdí vstup buňky do předčasné meiózy. Reguluje proliferaci zárodečných buněk a samičí determinaci buněk (8). Gen pro ataxin-2 ovlivňuje funkci endoplazmatického retikula, Golgiho komplexu a působí na množství receptoru pro epidermální růstový faktor (EGF) (3).

Normální ataxin-2 je lokalizován v cytoplazmě v perinukleární oblasti buněk (10). Ataxin-2 je napojen na membránu hrubého endoplazmatického retikula a také na polyribosomy (12). Naopak Huynh a spol. uvádí přítomnost ataxinu-2 nejvíce v Golgiho komplexu (5).

Mutovaný ataxin-2 vytváří v cytoplazmě granulórní vesikuly (14). V cytoplazmě buněk linií COS a PC12 byla prokázána agregace mutantního ataxinu-2 s expanzí polyglutaminu, která indukovala buněčnou smrt (5).

Modelem pro studium funkcí ataxinu-2 je kmen myši s knock-outovaným příslušným genem. U tohoto funkčního modelu byl potvrzen nedostatek ataxinu-2 pomocí RT-PCR na 3 různých místech transkriptu a bylo potvrzeno, že chybí exon 1, který kóduje gen *SCA2* a je zodpovědný za syntézu podstatného množství ataxinu-2 (16,6 %). Na dalších místech transkriptu byl zjištěn buď nedostatek nebo nestabilita *SCA2* genu s touto mutací. Podobně pomocí WB, který byl použit na analýzu přítomnosti ataxinu-2 (140–150 kDa) byl prokázán jeho úbytek v mozečku i dalších částech mozku tohoto myšního modelu (8).

U myši s chybějícím ataxinem-2 byl zjištěn nárůst hmotnosti a změna morfologie při krmení vysokotučnou stravou. Nepřítomnost ataxinu-2 odpovídá za predispozici k obezitě v dospělosti. Obezita je dobře pozorovatelným fenotypovým znakem, který byl v minulosti intenzivně zkoumán. Tento myš kmen byl sledován jako model obezity a diabetu, kde nedostatek ataxinu-2 ovlivňuje normální dráhu mezi leptinem a inzulinem, což vede nejen k deregulaci hmotnosti v důsledku hyperfagie, ale i ke změnám chování a metabolických pochodů (8). Chování knock-out myši se vyznačuje motorickou hyperaktivitou a abnormální úzkostí, ale nejsou změněné funkce hipokampu (4).

Na základě výsledků studia knock-out myši pro tento gen, byla provedena sekvenace 25 exonů a hraničních oblastí mezi introny a exony genu pro ataxin-2 u dětí s těžkou obezitou (n = 92). Bylo zjištěno, že gen *ATXN2* nemá hlavní roli pro vznik této obezity (2).

MYŠÍ MODEL Y SCA2

Bylo vytvořeno již několik transgenních myšních modelů *SCA2*, které lze využít ke zkoumání patogeneze onemocnění i jeho terapie. Jednotlivé modely *SCA2* se liší délkou

CAG repetice, místem inzertu, které je obvykle neznámé, promotorem, pod jehož kontrolou je transgen exprimován i základním myším kmenem. Bohužel však žádný z modelů plně neodpovídá neuropatologickým změnám, které nacházíme u člověka (14).

Inzerci repetice 58 CAG (*ATXN2*^{Q58}) odpovídající mutovanému lidskému genu pro SCA2 byly vytvořeny 3 linie transgenních SCA2 myši (Q58–5B, Q58–11, Q58–19) (6). DNA tohoto modelu obsahuje promotor Purkinje-cell-specific (*PcP2/L7*) a vykazují progresivní funkční deficit mozečku, který je spojený s úbytkem až vymizením Purkyňových buněk (14). Při funkčním testování myši tohoto modelu bylo oproti zdravým myším zjištěno, že držení na hrazdě je výrazně kratší nebo se v pozdějším věku myš vůbec nedokáže hrazdy zachytit. Analýza chůze (footprinting) prokázala u postižených myši linie Q58–19 již ve věku 8 týdnů zkrácení kroku, které se s rostoucím věkem zvyrazňovalo. U myši linie Q58–5B a Q58–11 bylo zkrácení kroku signifikantní ve věku 16 týdnů. Motorický deficit byl zjištěn i na akcelerujícím rotarodu. U šestitýdenních myši nebyl nalezen rozdíl mezi postiženými a zdravými kmeny myši, ale s postupujícím věkem se rozdíl projevil a prohluboval. U heterozygotů se latence pádu z rotarodu zkrátila ve věku 26 týdnů, u homozygotů již v 16 týdnech (6).

Další myší model SAC2 byl vytvořen inzercí genu obsahujícího 75 CAG tripletů (1). Projevuje se obdobným motorickým postižením, které bylo zjištěno na rotarodu a zesiluje s věkem. Nemocné myši mají degenerované Purkyňovy buňky, což se projevuje chyběním dendritického stromu a redukcí jejich buněčného těla (1).

Nejnovejší myší model SCA2 (*ATXN2*^{Q127}) nese dokonce gen s 127 opakováními CAG, který je rovněž pod kontrolou promotoru *PcP2* (Hansen et al., 2013). Motorické schopnosti se začínají výrazně zhoršovat již od 8. týdne věku myši a snižování počtu Purkyňových buněk je pozorovatelné od 12. týdne. Vyšetření různě starých myši této linie (12, 24 a 40 týdnů) zjistilo, že se postupně zeslabuje molekulární vrstva mozečkové kůry (3). Bylo zjištěno, že 4 týdny starší mutanti se lišili od stejně starých kontrolních myši přítomností perinukleárního ataxinu-2 v Purkyňových buňkách ve formě inkluzí, jejichž počet rostl s věkem. Jinde v cytoplazmě tento protein zjištěn nebyl (3). Změny týkající se genové exprese se vyskytují specificky pouze v Purkyňových buňkách na úrovni genu pro kalbindin, *PcP2*, *Grid2*, *Grm1* a *Itpr1*. Tato analýza byla prováděna pomocí qPCR. Redukce exprese těchto genů u starých myši byla mírná a nikoliv globální. Přesto byla provázena výše zmíněným zeslabením molekulární vrstvy (3).

U myši linie *ATXN2*^{Q127} došlo i ke změnám charakteristické frekvence akčních potenciálů Purkyňových buněk. U normálních myši se během maturace Purkyňových buněk posouvá frekvence akčních potenciálů od 30 Hz ve 4 týdnech k hodnotě 42 Hz u šestitýdenních myši a dále zůstává v rozmezí 6 až 40 týdnů konstantní na úrovni kolem 45 Hz. Naopak u transgenních myši linie *ATXN2*^{Q127} se frekvence aktivity Purkyňových buněk snižovala z původních 35 Hz na pouhých 6–11 Hz ve věku 40 týdnů (3). Pokles počtu Purkyňových buněk nebyl u tohoto myšího modelu zjištěn až do 40. týdne věku. Změny exprese specifických genů, morfologie i funkce Purkyňových buněk tedy předcházela jejich zániku o řadu týdnů (3). I u těchto myši byl zjevný motorický deficit v testu na akcelerujícím rotarodu, který se s věkem prohluboval (3).

Ataxie v linii ataxinu *ATXN2*^{Q127} se projevuje dříve než u starších modelů linií Q58. Tato skutečnost odpovídá závislosti rychlosti nástupu a progresu onemocnění na počtu opakování CAG tripletu pozorované u lidí.

ZÁVĚR

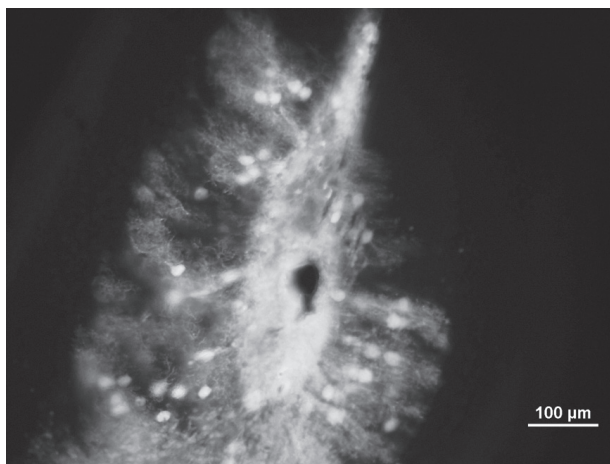
V naší laboratoři zkoumáme SCA2 myši výše zmíněné linie Q58–11 vytvořené a popsané Huynhem a spol. (6) a dodávaná The Jackson Laboratory pod označením *B6D2-Tg(Pcp2SCA2)11Plt/J*. Předběžné výsledky testů motorických funkcí a prostorové orientace, ale i morfologického vyšetření mozečku ukazují, že patologický fenotyp je nevýrazný a neodpovídá dříve popsaným motorickým poruchám a redukci počtu Purkyňových buněk (Cendelín a spol., nepublikovaná data). Zajímavé je i to, že ani u osmiměsíčních myší z těže kolonie nenesoucích transgen nebylo na akcelerujícím rotarodu pozorováno motorické učení, které bylo zcela evidentní u běžných laboratorních myší. Tato vlastnost základního kmene může do jisté míry zastřít případný mírný motorický deficit u jedinců nesoucích transgen. Kromě základních vlastností této linie SCA2 myši byla na našem pracovišti ověřována i jejich využitelnost pro experimentální výzkum neurotransplantační terapie SCA2. Embryonální mozečková tkáň transplantovaná do mozečku homozygotních SCA2 myší přežívala velice dobře (obr. 1). Transplantát však vytvářel poměrně chudé spoje s mozečkovými jádry (Purkartová a spol., nepublikovaná data). Otázkou zůstává, do jaké míry je však přežívání transplantátu i jeho vývoj ovlivněn stavem tkáně hostitele a zda by se transplantát nechoval jinak v mozečku myší SCA2 linie s výraznějším fenotypovým projevem onemocnění.

Transgenní myši modely SCA2 jsou jistě užitečným nástrojem pro výzkum této choroby, a např. optimalizace léčby pomocí nových farmakoterapeutik nebo neurotransplantací. V tomto směru bylo dosaženo již prvních dobrých výsledků, kdy po intravenózní transplantaci mesenchymálních kmenových buněk do myšičího modelu SCA2 byla zjištěna náprava behaviorálních funkcí (7). Je však třeba brát v úvahu jejich nedokonalost, odlišnosti od lidského onemocnění a věnovat pozornost volbě konkrétní linie nebo kmene těchto myší. Proto je potřebná detailní fenotypová charakterizace jednotlivých linií SCA2 myší. Různorodost fenotypových projevů jednotlivých myšičích modelů SCA2 a jejich nestabilita komplikující jejich využití může na druhou stranu být zdrojem zajímavých poznatků – zjištění faktorů, které určují rychlost progresu degenerace, zvyšují nebo snižují intenzitu jednotlivých projevů, které by tedy mohly být cílem terapeutické intervence.

Práce byla podporována grantem COST LD12056 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR a projektem CZ.1.07/2.3.00/30.0022 financovaným Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

SOUHRN

Spinocerebelární ataxie jsou skupinou autosomálně dědičných degenerativních onemocnění mozečku. Spinocerebelární ataxie typu 2 (SCA2) je způsobena zvýšeným opakováním CAG tripletu v genu pro ataxin-2. Existuje několik transgenních myšičích modelů SCA2 s vloženým genem s prodlouženou repeticí CAG, které slouží k výzkumu patogeneze SCA2 i možností její terapie. Jednotlivé linie SCA2 myši se liší délkou počtem opakování CAG ve vloženém genu, základním myšičím kmenem, ale pravděpodobně i místem inserce transgenů. Základní projevy jsou dány degenerativním postižením mozečku



Obr. 1 Embryonální mozečková tkáň (exprimující zelený fluoreskující protein) transplantovaná v mozečku SCA2 myši 2 měsíce po transplantaci (Foto: Z. Purkartová).

a zahrnují tedy především motorický deficit. Jeho progresu se ovšem liší v závislosti na uvedených vlastnostech dané linie.

Mouse models of spinocerebellar ataxia type-2

SUMMARY

Spinocerebellar ataxias are neurodegenerative cerebellar disorders with autosomal dominant heredity. Spinocerebellar ataxia type-2 (SCA2) is caused by expansion of CAG repeat in the ataxin-2 gene. Several mouse transgenic models of the SCA2 have been generated by insertion of gene with enlarged repeat. They serve for investigation of SCA2 pathogenesis and its therapy. Individual lines of SCA2 mice differ in number of CAG repetitions in the transgene, strain of origin and probably also in localisation of the transgene insertion. Basic manifestation is given by cerebellar degeneration and involve first of all motor deficit. Its progress depends on above mentioned characteristics of the particular SCA2 mouse line.

Tato práce byla podporována výzkumným záměrem P36 PRVOUK

LITERATURA

1. Aguiar J., Fernández J., Aguilar A. et al.: Ubiquitous expression of human SCA2 gene under the regulation of the SCA2 self promoter cause specific Purkinje cell degeneration in transgenic mice. *Neurosci. Let.* 392, 2006: 202–206. – 2. Figueroa K. P., Farooqi S., Harrup K. et al.: Genetic Variance in the Spinocerebellar Ataxia Type 2 (ATXN2) Gene in Children with Severe Early Onset Obesity. *PLoS ONE* 2009, 4 (12): e8280. doi:10.1371/journal.pone.0008280. – 3. Hansen S. T., Meera P., Otis T. S. et al.: Changes in Purkinje cell firing and gene expression precede behavioral pathology in a mouse model of SCA2. *Human Molec. Genet.* 22, 2013: 271–283. – 4. Huynh D. P., Maalouf M., Silva A. J. et al.: Dissociated Fear and Spatial Learning in Mice with Deficiency of Ataxin-2. *PLoS ONE* 2009, 4 (7): e6235. doi: 10.1371/journal.pone.0006235. – 5. Huynh D. P., Yang H., Vakharina H. et al.: Expansion of the polyQ repeat in ataxin-2 alters its Golgi localization, disrupts the Golgi complex and causes cell death. *Human Molec. Genet.* 12, 2003: 1485–1496. – 6. Huynh D. P., Figueroa K., Hoang N. et al.: Nuclear localization or inclusion body formation of ataxin-2 are not necessary for SCA2 pathogenesis in mouse or human. *Nat. Genet.* 26, 2000: 44–50. – 7. Chang Y., Chen M., Chian Y. et al.: Mesenchymal stem cell transplantation ameliorates motor function deterioration of spinocerebellar ataxia by rescuing cerebellar Purkinje cells. *J. Biomed. Sci.* 18, 2011: 1–9. – 8. Lastres-Becker I., Brodesser S., Lütjohann D. et al.: Insulin receptor and lipid metabolism pathology in ataxin-2 knock-out mice. *Human Molec. Genet.* 17, 2008: 1465–1481. – 9. Marmolino D., Manto M.: Past, Present and Future Therapeutics for Cerebellar Ataxias. *Current Neuropharmacol.* 8, 2010: 41–61. – 10. Nechiporuk T., Huynh D. P., Figueroa K. et al.: The mouse SCA2 gene: cDNA sequence, alternative splicing and protein expression. *Human Molec. Genet.* 7, 1998: 1301–1309. – 11. Ross O. A., Rutherford N. J., Baker M. et al.: Ataxin-2 repeat-length variation and Neurodegeneration. *Human Molec. Genet.* 2011: 1–6. – 12. Van de Loo S., Eich F., Nonis D. et al.: Ataxin-2 associates with rough endoplasmic reticulum. *Exper. Neurol.* 215, 2009: 110–118. – 13. Vožeh F., Zumrová A.: Animální modely mozečkových dysfunkcí. *Plzeň. lék. Sborn.* 76, 2010: 41–49. – 14. Yamada M., Sato T., Tsuji S. et al.: CAG repeat disorder models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol.* 115, 2008: 71–86.

Adresa autora: Z. H., Alej Svobody 76, 301 66 Plzeň