



VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Symantas Ragauskas

**MUTAVUSIO HUNTINGTINO BALTYMO AGREGATAI R6/2 PELIŲ
TINKLAINĖJE IR REGOS NERVE**

**MUTATIVE HUNTINGTIN PROTEIN AGGREGATES IN R6/2 MICE
RETINAS AND OPTIC NERVE**

Baigiamasis magistro darbas

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 621J76001

Biotechnologijos studijų kryptis

Vilnius, 2012

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS

CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

TVIRTINU

Katedros vedėjas

(Parašas)

prof. habil. dr. Juozas Kulys

(Vardas, pavardė)

(Data)

Symantas Ragauskas

**MUTAVUSIO HUNTINGTINO BALTAMO AGREGATAI R6/2 PELIŲ
TINKLAINĖJE IR REGOS NERVE**

**MUTATIVE HUNTINGTIN PROTEIN AGGREGATES IN R6/2 MICE
RETINAS AND OPTIC NERVE**

Baigiamasis magistro darbas

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 621J76001

Biotechnologijos studijų kryptis

Vadovas

dr. Giedrius Kalesnykas

(Moksl. laipsnis/pedag. vardas, vardas, pavardė)

(Parašas)

(Data)

Konsultantas

dr. Evaldas Liutkevičius

(Moksl. laipsnis/pedag. vardas, vardas, pavardė)

(Parašas)

(Data)

Lietuvių kalbos konsultantas dr. doc. Angelė Kaulakienė

(Moksl. laipsnis/pedag. vardas, vardas, pavardė)

(Parašas)

(Data)

Vilnius, 2012

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMRNTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

TVIRTINU
Katedros vedėjas

Biotechnologijos studijų kryptis
Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 621J76001

(Parašas)
prof. habil. dr. Juozas Kulys
(Vardas, pavardė)

(Data)

**BAIGIAMOJO MAGISTRO DARBO
UŽDUOTIS**

.....Nr.
Vilnius

Studentui (ei)..... Symantui Ragauskui
(Vardas, pavardė)

Baigiamojo darbo tema: **Mutavusio huntingtino baltymo agregatai R6/2 pelių tinklainėje ir regos nerve**

patvirtinta 2011 m. spalio 26 d. dekanų potvarkiu Nr. 380 fm

Baigiamojo darbo užbaigimo terminas 2012 m. gegužės 31 d.

BAIGIAMOJO DARBO UŽDUOTIS:

1. Nustatyti, ar mutavęs huntingtino baltymas kaupiasi tinklainės ganglinėse ląstelėse, regos nerve ir glijos ląstelėse;
2. Nustatyti, ar tinklainės ganglinės ląstelės žūva Huntingtono ligos metu;
3. Aptikti pokyčius baltymų perdirbimo mechanizmuose.

Baigiamojo darbo rengimo konsultantai:

.....dr. Evaldas Liutkevičius.....
(Moksl. laipsnis/pedag. vardas, vardas, pavardė)

Vadovas
(Parašas)

.....dr. Giedrius Kalesnykas.....
(Moksl. laipsnis, vardas, pavardė)

Užduotį gavau

.....
(Parašas)
.....Symantas Ragauskas.....
(Vardas, pavardė)
.....
(Data)

Vilniaus Gedimino technikos universitetas
Fundamentinių mokslų fakultetas
Chemijos ir bioinžinerijos katedra

ISBN ISSN
Egz. sk.
Data-.....-.....

Antrosios pakopos studijų **Bioinžinerijos** programos baigiamasis darbas

Pavadinimas **Mutavusio huntingtino baltymo agregatai R6/2 pelių tinklainėje ir regos nerve**

Autorius **Symantas Ragauskas**

Vadovas **dr. Evaldas Liutkevičius**

Kalba: lietuvių

Anotacija

Šio darbo tikslas įvertinti mutavusio huntingtino baltymo įtaką tinklainės ganglinėms ląstelėms ir regos nervui. Tinklainės ir regos nervai buvo išpreparuoti iš skirtingo amžiaus R6/2 (Huntingtono ligos modelis pelėse) ir laukinio tipo pelių. TUNEL metodu buvo nustatyta, kad tinklainės nervinės ląstelės nežūsta, nors jose ir kaupiasi mutavęs huntingtino (mHtt) baltymas. Ligai progresuojant ląstelėse kaupiasi vis daugiau mHtt ir palaipsniui tirpi baltymo forma pereina į agreguotą formą. Imunofluorescenciniu dažymu buvo nustatyta, kad tinklainės astrocitai neturi savo somoje mHtt, o regos nervo astrocitai kaupia mHtt. Taip pat buvo pastebėta, kad optiniame nerve mHtt depozitų skaičius didėja ligai progresuojant. Imunohistochemiškai nudažius ląsteles Lamp2 ir ubikvitinu nebuvo pastebėta jokių ženklų pakitimų, tačiau buvo žymiai padidėjęs p62 baltymo kiekis transgeninėse pelėse. Tiek dryžuotame kūne tiek tinklainėje LC3-I, LC3-II ir Hsp70 pokyčiai nebuvo reikšmingi lyginant skirtumus tarp atskirų amžiaus grupių ir tarp laukinio tipo ir transgeninių pelių. Tačiau nors šiuose mechanizmuose yra sutrikimų, tinklainės ganglinės ląstelės nežūsta.

Darbą sudaro: įvadas, literatūros apžvalga, medžiagos, metodai ir įranga, rezultatai ir jų aptarimas, išvados, literatūros sąrašas.

Darbo apimtis: 47 p. teksto be priedų, 16 paveikslų, 1 lentelė, 62 bibliografiniai šaltiniai

Prasminiai žodžiai: Huntingtono liga, mutavęs huntingtinas, R6/2 pelės, autofagija, tinklainės ganglinės ląstelės, LC3, p62, Hsp70

Vilnius Gediminas Technical University
Faculty of Fundamental Sciences
Department of Chemistry and Bioengineering

ISBN _____ ISSN _____
Copies No.
Date-.....-.....

Master Degree Studies **Bioengineering** study programme Master's Thesis

Title **Mutative Huntingtin protein aggregates in R6/2 mice retinas and optic nerves.**

Author **Symantas Ragauskas**

Academic supervisor **Dr. Evaldas Liutkevičius**

Thesis language:
Lithuanian

Annotation

The aim of this work was to examine the effect of mutant huntingtin (mHtt) protein on retinal ganglion cell survival and optic nerve degeneration. Retinas and optic nerves were isolated from different age R6/2 transgenic mice and their wild type (WT) littermates. TUNEL staining showed that young 4-week-old animals had the lowest number of TUNEL-positive cells in the outer nuclear layer (ONL), whereas the 12-week-old R6/2 mice had the highest number of apoptotic cells in the ONL. However, no TUNEL positive cells were found in the retinal ganglion cell layer (RGCL). The mHtt staining in retinas of R6/2 mice was found at the age of 4 weeks with only a few cells having aggregates that are positive for mHtt. At the age of 8 weeks the number of RGCL cells that had mHtt positive aggregates significantly increased as compared to the 4-week group. At later age groups the majority of RGCL cells contained aggregated form of mHtt. The R6/2 mice did not differ from their WT littermates in the total number of retinal astrocytes or total number of cells in the RGCL at any age. Immunohistochemical stainings of Lamp2, p62, ubiquitin, LC3 and Hsp70 proteins were performed to detect changes in protein degradation pathways. The number of RGCL cells that had p62 - immunoreactivity was significantly increased in the 4-week, 12-week and 16-week R6/2 retinas as compared to WT mice. Expressions of Lamp2 and ubiquitin in the cells were the same in R6/2 and WT mice.

Structure: Introduction, literature review, materials, experimental procedures and equipment, results and discussion, conclusions, references

Thesis consists of: 47 p. text without appendixes, 16 figures, 1 table, 62 bibliographical entries

Keywords : Huntington disease, mutant huntingtin protein, autophagy, retinal ganglion cells, R6/2 mice, LC3, p62, Hsp70

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

Symantas Ragauskas, 20064792

(Studento vardas ir pavardė, studento pažymėjimo Nr.)

Fundamentinių mokslų fakultetas

(Fakultetas)

Bioinžinerija, BIfm-10

(Studijų programa, akademinė grupė)

BAIGIAMOJO DARBO (PROJEKTO) SAŽININGUMO DEKLARACIJA

2012 m. gegužės 14 d.

Patvirtinu, kad mano baigiamasis darbas tema „Mutavusio huntingtino baltymo agregatai R6/2 pelių tinklainėje ir regos nerve“ patvirtintas 2011 m. spalio 26 d. dekanų potvarkiu Nr. 380fm, yra savarankiškai parašytas. Šiame darbe pateikta medžiaga nėra plagijuota. Tiesiogiai ar netiesiogiai panaudotos kitų šaltinių citatos pažymėtos literatūros nuorodose.

Prenkant ir įvertinant medžiagą bei rengiant baigiamąjį darbą, mane konsultavo mokslininkas ir specialistas dr. Evaldas Liutkevičius. Mano darbo vadovas dr. Giedrius Kalesnykas.

Kitų asmenų indėlio į parengtą baigiamąjį darbą nėra. Jokių įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs (-usi).

(Parašas)

Symantas Ragauskas

(Vardas ir pavardė)

TURINYS

PAVEIKSLŲ SĄRAŠAS	9
SANTRUMPOS.....	10
ĮVADAS	12
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	13
1.1. Huntingtono liga	13
1.1.1. <i>Huntingtino</i> genas	14
1.1.2. Huntingtino baltymas.....	15
1.1.3. Mutavęs huntingtino baltymas.....	16
1.1.4. R6/2 transgeninės pelės.....	18
1.2. Baltymų degradavimo mechanizmai.....	18
1.2.1. Autofagija.....	19
1.2.2. Proteasominis baltymų degradavimo kelias.....	23
1.3. Akies sandara	23
2. MEDŽIAGOS, METODAI, ĮRANGA	28
2.1. Reagentai, įranga, eksperimentiniai gyvūnai	28
2.1.1. Medžiagos	28
2.1.2. Aparatūra.....	29
2.1.3. Laboratoriniai gyvūnai	30
2.2. Metodai	30
2.2.1. Audinių paruošimas	30
2.2.2. Visos tinklainės imunofluorescencinis dažymas	30
2.2.3. Parafinizuotų tinklainių imunohistocheminis dažymas	31
2.2.4. Apoptotinių ląstelių nustatymas TUNEL metodu.....	31
2.2.5. Gallyas sidabrinis dažymas.....	31
2.2.6. Ląstelių skaičiavimas stereologiniu mikroskopu	32
2.2.7. Regos nervo imunofluorescencinis dažymas	32
2.2.8. Imunoblotingas	33

2.2.9. Statistinė rezultatų analizė	33
3. Rezultatai ir jų aptarimas	34
3.1. Mutavusio huntingtino baltymo depozitai tinklainės ganglinėse ląstelėse	34
3.2. Apoptotinių ląstelių detekcija tinklainėje ir pažeistų aksonų aptikimas regos nerve	35
3.3. Mutavusio huntingtino baltymo akumuliacija tinklainės ir regos nervo astrocituose	36
3.4. Glijos ląstelių pokyčių nustatymas	37
3.5. Lamp2, ubikvitino ir p62 raiškos pokyčių nustatymas	39
3.6. Autofagijos markerių LC3 ir Hsp70 raiškos lygio nustatymas	40
IŠVADOS	41
LITERATŪROS SĄRAŠAS	42
1 PRIEDAS	48
2 PRIEDAS	49

PAVEIKSLŲ SĄRAŠAS

1 pav. Huntingtono liga sergančių pacientų išgyvenamumo kreivė pasireiškus primiesiems simptomams (Ross <i>et. al.</i> 1997)	13
2 pav. Autofagijos rūšys (Pedersen <i>et. al.</i> 2009)	20
3 pav. Autofagosomos formavimasis	21
4 pav. A. P62 molekulės struktūra. B. Ubikvitinu pažymėtų baltumų atpažinimo ir prijungimo prie autofagosomos mechanizmas (Ichimura <i>et. al.</i> 2010)	22
5 pav. Akies sandara	24
6 pav. Tinklainės vidinę dalį sudarantys neuronai	26
7 pav. RGCL neuronų skaičius, turintis tirpią ir netirpią mutavusio huntingtino baltymo formą.....	34
8 pav. Ląstelės branduolių ir mutavusio huntingtino kolokalizacija	35
9 pav. Tunel metodu nudažytos 18 sav. tinklainės	35
10 pav. Aksonų degeneracija regos nerve	36
11 pav. Astrocitų ir mutavusio huntingtino baltymo imunofluorescencinis dažymas	36
12 pav. MHtt baltymo agregatų skaičiaus didėjimas regos nerve progresuojant huntingtono ligai (A). Regos nervo astroцитai kolokalizuoja su mutavusiu huntingtinu (B)..	37
13 pav. Parafinizuotos tinklainės imunohistocheminis dažymas anti-gfap antikūnais	38
14 pav. Imunofluorescencinis visos tinklainės dažymas anti-gfap antikūnais	38
15 pav. A. Tinklainės imunohistocheminis dažymas anti-p62 antikūnais R6/2 ir WT pelėse. B. Transgeninėse pelėse p62 ekspresijos lygis ganglinėse ląstelėse yra žymiai aukštesnis negu WT pelėse	39
16 pav. Dryžuotojo kūno ir tinklainės imunoblotingas nustatant LC3 ir Hsp70	40

SANTRUMPOS

Atg – autofagijoje dalyvaujantys baltymai

ATP (*angl.* adenosine-5'-triphosphate) – adenzin-5`-trifosfatas

BDNF (*angl.* brain-derived neurotrophic factor, BDNF) - iš smegenų kilęs neurotrofinis faktorius

CAG – citozinas – adeninas – guaninas

CMA (*angl.* chaperone – mediated autophagy, CMA) – šaperonų reguliuojama autofagija

CNS – centrinė nervų sistema

DAB – 3,3`-diaminobenzidinas

DAPI – 4` ,6-diamidino-2-fenilindolas

EDTA – etilendiamintetraacto rūgštis;

GABARAP (*angl.* γ aminobutyric acid type A receptor-associated protein) – su gama aminobutrinės rūgšties A tipo receptoriais susijęs baltymas

GATE-16 (*angl.* Golgi- associated ATPase enhancer of 16kDa) – 16kDa dydžio su goldžio aparatu susijęs ATPazės stipriklis;

HAP1 (*angl.* huntingtin associated protein 1) –su huntingtinu asocijuotas baltymas 1

HD (*angl.* Huntington disease) - Huntingtono liga

HIP1 (*angl.* huntingtin-interacting protein 1) –su huntingtinu sąveikaujantis baltymas

Hsp (*angl.* heat shock protein) – karščio šoko baltymai

Htt – huntingtino baltymas

JSA – jaučio serumo albuminas

Lamp2a (*angl.* lysosome – associated membrane protein 2a) – 2a tipo lizosomos paviršiuje esantis receptoriaus

LC3 (*angl.* microtubule – associated protein 1 light chain 3, LC3) – su mikrovamzdeliais susijusio baltymo 1 lengvoji grandinė 3l

LGN (*lot.* lateral geniculate nucleus, LGN) – lateralinis kelinis branduolys

mHtt – mutavęs huntingtino baltymas

NGS (*angl.* normal goat serum) – normalus ožio serumas

NSF (*angl.* N-ethylmaleimide-sensitive factor) – N-etilmaleimidui jautrus faktorius

OCT (*angl.* optimal cutting temperature) – optimalią pjaušymo temperatūrą palaikantis tirpalas

PB (*angl.* phpsphate buffer) – fosfatinis buferinis tirpalas

PBS (*angl.* phosphate buffered saline) – fosfatinis buferinis tirpalas

PE (*angl.* phosphatidylethanolamine) – fosfatidiletanolaminas

PolyQ – baltymo seka turinti daug glutamino liekanų

RGC (*angl.* retinal ganglion cell) – tinklainės ganglinės ląstelės

RGCL (*angl.* retinal ganglion cell layer) – tinklainės ganglinių ląstelių sluoksnis

RT (*angl.* room temperature) – kambario temperatūra

SNARE (*angl.* soluble NSF attachment protein receptor) – prie tirpaus NSF prisitvirtinusio baltymo receptoriaus

SUMO (*angl.* small ubiquitin- related protein modifier) – maža su ubikvitinu susijusi molekulė

TBS (*angl.* Tris buffered saline) – Tris buferinis tirpalas

Tris (*angl.* tris(hydroxymethyl)aminomethane)– tris(hidroksimetil)aminometanas

UPP (*angl.* ubiquitin proteasome pathway, UPP) –ubikvitino proteosominis kelias

WT (*angl.* wild type) – laukinis tipas

IVADAS

Kasmet nuo neurodegeneracinių ligų, tokių kaip Parkinsono, Alzheimerio, Huntingtono, pasaulyje miršta daugybė žmonių. Neurodegeneracinių ligų metu yra pažeidžiamos smegenyse esančios nervinės ląstelės. Alzheimerio ligos atveju prarandami smegenų žievės neuronai, Parkinsono ligos metu žūsta *substantia nigra* neuronai, o Huntingtono liga pažeidžia dryžuotojo kūno GABAergines ląsteles. Kadangi pažeidžiamos smegenys, todėl šiomis ligomis sergantys žmonės praranda gebėjimą vaikščioti, valdyti galūnes, kalbėti, suprastėja atmintis, išsivysto diabetas, žmonės tampa irzlūs, pikti, nesiorientuoja aplinkoje. Iki šiol nėra surasto vaisto, kuris padėtų išgydyti ar sustabdytų šių ligų daromą žalą organizmui.

Tačiau norint gerai ištirti ligą ir jos daromą poveikį organizmui, reikia geros modelinės sistemos, su kuria būtų galima nesudėtingai atlikti eksperimentus. Akis yra puikus tokios sistemos pavydys. Tai yra uždara sistema, į kurią galima injekuoti norimą vaistinį preparatą ir, nesukėlus uždegiminio atsako atlikti išsamius tyrimus. Taip pat akyje esančios tinklainės ganglinės ląstelės priklauso centrinei nervų sistemai. Dirbant su smegenimis iškyla didelė problema dėl kontrolės, kadangi kiekvieno individo smegenys yra skirtingos (net ir tos pačios linijos pelių). Tačiau kiekviena pelė turi dvi akis, iš kurių viena gali būti naudojama kaip kontrolinė.

Huntingtono liga yra gerai ištirtinėta neurodegeneracinė liga, tačiau iki šiol yra labai daug neatsakytų klausimų, susijusių su šia nepagydoma liga ir koks yra jos poveikis akies tinklainei. Ar mutavęs huntingtino baltymas, kuris yra būdingas šiai ligai, kaupiasi tinklainės nervinėse ląstelėse ir jei taip, ar jos žūsta jam esant. Galbūt šios ląstelės yra atsparios mutavusiai baltymo formai ir sugeba apsisaugoti nuo jos.

Šio darbo tikslas ir yra įvertinti mutavusio huntingtino baltymo įtaką tinklainės ganglinėms ląstelėms ir regos nervui.

Tikslui įgyvendinti buvo iškelti keli uždaviniai:

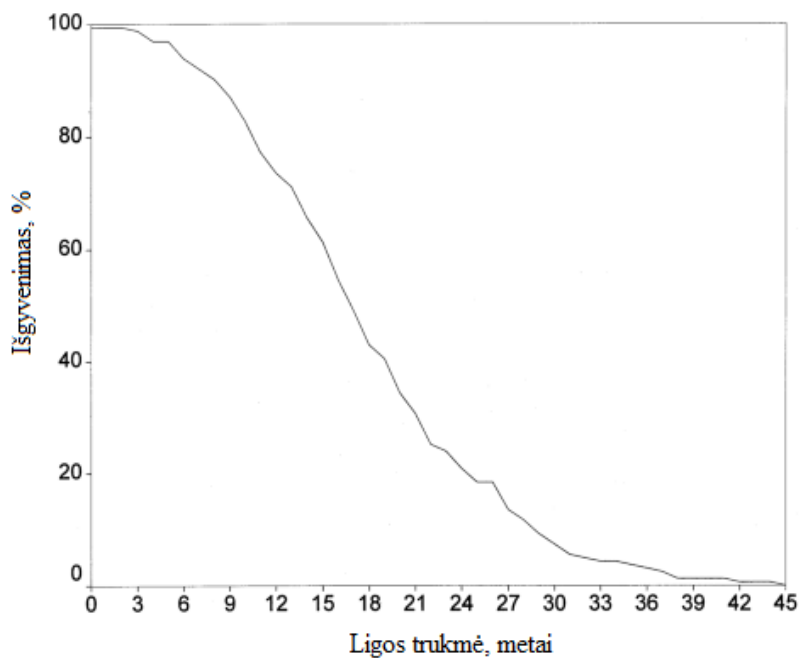
1. Nustatyti, ar mutavęs huntingtino baltymas kaupiasi tinklainės ganglinėse ląstelėse, regos nerve ir glijos ląstelėse
2. Nustatyti, ar tinklainės ganglinės ląstelės žūva Huntingtono ligos metu
3. Aptikti pokyčius baltymų perdirbimo mechanizmuose.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Huntingtono liga

Huntingtono liga (*angl.* Huntington disease, toliau – HD) yra reta, paveldima ir gerai ištyrinėta neurodegeneracinė liga. Paveldėtas alelis yra dominuojantis ir tikimybė perduoti mutavusį geną palikuonims yra 50 %. Yra atvejų (1 – 3 %), kai žmogus susergera HD, nors jo šeimoje prieš tai niekas nesirgo. Tai įvyksta dėl atsitiktinės mutacijos *huntingtino* gene. HD sukelia citozino – adenino – guanino (toliau – CAG) tripleto, kuris koduoja glutaminą, pasikartojimų skaičiaus didėjimas *huntingtino* gene. Šiuo sutrikimu serga 3 – 10 žmonių iš 100 000 Europoje ir Šiaurės Amerikoje (Vonsattel *et. al.* 1998; Ho *et. al.* 2001). Afrikoje ir Azijoje šia liga sergama 10 kartų rečiau, o Australijoje ir Okeanijoje sergamumas yra dvigubai didesnis. Pirmą kartą 1872 metais Džordžas Huntingtonas (George Huntngton) išaiškino HD. Jis nustatė klinikinius požymius ir kaip ji perduodama iš kartos į kartą. Tačiau tik 1993 metais buvo atrastas *huntingtino* genas, kuriame įvyksta mutacija. Šis genas aptinkamas 4 chromosomos trumpajame petyje (4p63) ir koduoja huntingtino baltymą (htt). Mutacijos rezultatas yra glutamino liekanų pagausėjimas huntingtino baltymo N gale.

Mutavęs huntingtino baltymas (toliau – mHtt) yra ekspresuojamas visą gyvenimą. Tačiau dažniausiai pirmieji simptomai pasireiškia sulaukus 35 – 50 metų. Ši liga nuolat progresuoja ir yra mirtina praėjus 15 – 20 metų nuo pirmųjų simptomų (1



pav.). HD dar vadinama **1 pav.** Huntingtono liga sergančių pacientų išgyvenamumo kreivė Huntingtono chorėja (*gr.* chorea – pasireiškus primiesiems simptomams (Ross *et. al.* 1997)

šokti) dėl šios ligos sukeltų nevalingų judesių, kurie primena šokį. Pirmieji ligos simptomai yra nerangumas, pasireiškiantys nekontroliuojami ir keisti judesiai ir suprastėjęs orientavimasis aplinkoje. Ligai progresuojant motoriniai sutrikimai vis stiprėja, kol galiausiai ligonis praranda gebėjimą judėti, bendrauti ir visiškai nesiorientuoja erdvėje (Brandt *et. al.* 1984; Penney *et. al.* 1990). Taip pat keičiasi HD sergančių žmonių psichinė būklė – jie tampa dirglūs, apatiški (Jensen *et. al.* 1993). Ligoniai

dažniausiai miršta dėl širdies nepakankamumo arba aspiracinės pneumonijos (Chiu *et. al.* 1982). Nepilnamečiams pasireiškia visiškai kitokie simptomai: judesių sulėtėjimas, drebulys, rigidiškumas, distonija ir kartais pasireiškia epilepsijos priepuolių, o chorėjos gali visiškai nebūti (van Dijk *et. al.* 1986).

Huntingtono liga labiausiai pažeidžia uodeguotąjį branduolį (*lot. nucleus caudatus*) ir kiautą (*lot. putamen*), kurie sudaro dryžuotąjį kūną (*lot. corpus striatum*), kur palaipsniui žūva neuronai. Dažniausiai naudojama vertinimo skalė nustatyti ligos sunkumą buvo sukurta Vonsattel *et. al.* (Vonsattel *et. al.* 1985). Remiantis dryžuotojo kūno degeneracija, HD suskirstyta į 5 stadijas (0 – 4). 0–nė stadija, kai HD sergančio žmogaus smegenys atrodo taip pat kaip ir sveiko žmogaus. 1–osios stadijos metu matoma nedidelė atrofija uodeguotojo branduolio uodegoje ir kartais kūne, prarandama apie 50 % neuronų. Taip pat matoma astroglizė. 2 – 3 stadijos, kai prarandama daugiau neuronų ir dryžuotasis kūnas dar labiau sumažėja. 4 stadija, kai matoma didelio laipsnio atrofija ir žūva net 95 % neuronų (Vonsattel *et. al.* 1985). Esant 3 – 4 ligos stadijai, pažeidžiami ne tik dryžuotojo kūno neuronai, bet ir galvos smegenų žievės (*lot. cerebral cortex*), branduolėlio (*lot. cerebellum*), talamo (*lot. thalamus*) (Vonsattel *et. al.* 1998) ir hipotalamo (*lot. hypothalamus*) neuronai (Kassubek *et. al.* 2004). Dėl didelio laipsnio smegenų atrofijos esant paskutinėms HD stadijoms, smegenų svoris gali sumažėti net iki 40 % (Gil *et. al.* 2008). Huntingtono ligos metu dryžuotame kūne daugiausia žūva vidutiniai dygliuotieji neuronai (*angl. medium spiny neurons*). Šie neuronai yra atsakingi už judėjimo funkciją ir sudaro 95 % visų dryžuotame kūne esančių ląstelių (Albin *et. al.* 1989). Kodėl būtent ši neuronų populiacija yra jautri huntingtino geno mutacijoms, iki šiol nėra aišku.

1.1.1. *Huntingtino* genas

Huntingtino geno, *htt* arba *HD* geno sritis apima 180 kbp ilgio rajoną ir yra sudarytas iš 67 egzonų. Šis genas koduoja 347 kDa dydžio huntingtino baltymą, sudarytą iš ~3142 aminorūgščių (priklausomai nuo glutamino liekanų skaičiaus). Dėl mutacijos *htt* geno 1 egzone ima gamintis klaidinga *htt* baltymo forma. Šiame egzone yra regionas, sudarytas iš daug CAG tripletų pasikartojimų (Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993). Mutavęs alelis yra nestabilus ir mejozės metu gali pailgėti 1 – 4 arba sutrumpėti 1 – 2 tripletais. Paprastai žmonės turi iki 36 pasikartojimų, tačiau, viršijus šią ribą, ima gamintis mutavęs huntingtino baltymas. Jei žmogus turi 36 – 40 pasikartojimų yra tikimybė, kad jam HD simptomų visiškai nepasireikš arba pasireikš labai vėlai (Chong *et. al.* 1997). Kai CAG pasikartojimų skaičius viršija 60, tada šios ligos simptomus pacientai gali pajusti jau vaikystėje, tačiau taip pasitaiko gana retai (~6 % visų sergančių HD). Dėl didelio CAG tripletų skaičiaus, *htt* baltymo N gale atsiranda ilga, lipni poliglutamino (toliau – polyQ) uodega ir

agreguojasi su kitais baltymais. Iki šiol nėra žinomas joks baltymas, kurio struktūra būtų panaši į huntingtino baltymą.

1.1.2. Huntingtino baltymas

Laukinio tipo (*angl.* wild type, WT) huntingtino baltymas yra būtinas embriono vystymuisi ir bet kokie pakeitimai, kurie visiškai užblokuoja *htt* geną, yra letalūs (Duyao *et. al.*, 1995). Tačiau tolimesniais tyrimais nustatyta, kad mutavęs huntingtinas gali kompensuoti laukinio tipo baltymą ir išgelbėti embrioną nuo žūties (Leavitt *et. al.*, 2001). Taigi, huntingtino baltymo funkcija embriono vystymosi metu nepriklauso nuo poliglutamino uodegos ilgio. Taip pat *htt* geno mutacija nepanaikina baltymo funkcijos, nes HD sergantys pacientai vystosi normaliai, o pirmieji simptomai pasireiškia praėjus tik keleriems metams nuo gimimo. Be to, yra įrodymų, kad *htt* baltymas yra būtinas ne tik embriogenezės metu, bet ir organizmo brendimo metu. Suaugusiai pelei nutildžius *htt* geną, sutrumpėja jų gyvenimo trukmė, atsiranda motorinių funkcijų sutrikimų ir taip pat jos yra sterilios (Dragatsis *et. al.* 2000).

Ląstelėje WT baltymas dažniausiai aptinkamas mitochondrijose, Goldžio aparate, endoplazminiame tinkle ir kai kuriuose citoskeleto komponentuose (Young *et. al.* 2003). Taip pat nedideliais kiekiais jo yra ir branduolyje (Kegel *et. al.* 2002). Nustatyta net 234 su *htt* susijusių baltymų (Kaltenbach *et. al.* 2007). Svarbiausi iš jų yra su huntingtinu asocijuotas baltymas 1 (*angl.* huntingtin associated protein 1, toliau – HAP1), kuris turi dvi izoformas (HAP1-A ir HAP1-B). HAP1 ekspresuojamas smegenų ląstelėse, sąveikauja su p150 dinaktino subvienetu ir taip dalyvauja viduląsteliniame transporte. Kitas yra su huntingtinu sąveikaujantis baltymas 1 (*angl.* huntingtin-interacting protein 1, toliau – HIP1). Jis jungiasi su α -adaptinu ir klaritinu ir yra susijęs su citoskeleto susirinkimu ir endocitoze. Taip pat huntingtinas, sąveikaudamas su HIP1 baltymu, neleidžia susidaryti HIP1–HIP1 kompleksui, kuris aktyvuoja kaspazę 8 (Gervais *et. al.* 2002). Htt jungiasi su fermentu HIP2, kuris katalizuoja ubikvitino prisijungimą prie viduląstelių baltymų ir taip pažymi juos tolimesnei proteosominei degradacijai. WT huntingtino baltymas padidina iš smegenų kilusio neurotrofinio faktoriaus (*angl.* brain-derived neurotrophic factor, toliau – BDNF) raišką, sąveikaudamas su represoriaus kompleksu REST–NRSF citoplazmoje ir taip neleidžiamas jam patekti į branduolį ir prisijungti prie *bdnf* geno operatoriaus (Zuccato *et. al.* 2003). Manoma, kad huntingtino baltymas turi didelės įtakos ląstelės išgyvenimui. WT *htt* smarkiai sumažina mitochondrinio citochromo c ekspresiją ir taip neleidžia susidaryti apoptosominiam kompleksui ir aktyvuoti kaspazę 9 ir kaspazę 3. Be to, buvo parodyta, kad *htt* tiesiogiai kontaktuoja su kaspaze 3 ir inhibuoja jos proteolitinį aktyvumą (Zhang *et. al.* 2006).

Iki šiol yra labai daug neišaiškintų dalykų, susijusių su huntingtino baltymu, tačiau žinant baltymus, su kuriais jis sąveikauja, galima spręsti apie htt svarbą ir funkciją ląstelėje: baltymų pernaša, organelių transportas ir prijungimas prie citoskeleto, klaritino medijuojamos endocitozės valdymas, transkripcijos reguliacija ir antiapoptotinė funkcija.

1.1.3. Mutavęs huntingtino baltymas

Ilgėjanti polyQ seka huntingtinui suteikia visiškai naują funkciją – jis tampa toksiškas ląstelei. Tiek tirpi, tiek agreguota mHtt forma suardo viduląstelinius kelius, nenormaliai sąveikaudama arba surišdama pagrindinius šių kelių komponentus į agregatus. Laukinio tipo baltymo funkcijos praradimas taip pat prisideda prie viduląstelinės homeostazės sutrikdymo, vedančios prie neuronų disfunkcijos ir mirties.

Agregacijos mechanizmai

Yra pasiūlyti du mHtt agregacijos mechanizmai. Vienas iš jų yra polinio užtrauktuko modelis (*angl.* polar zipper model). Šia teorija teigiama, kad normali ketvirtinė htt struktūra yra destabilizuota dėl išsiplėtusios polyQ sekos, todėl mHtt baltymas ima nenormaliai sąveikauti su kitais polyQ galą turinčiais baltymais. Dėl hidrofobinių sąveikų tarp baltymų polyQ uodegų, ima formotis netirpios β -klostės (Stott *et. al.* 1995).

Kitas modelis, paaiškinantis mHtt agregaciją, yra transglutaminazės modelis (*angl.* the transglutaminase model). Transglutaminazė yra fermentas, katalizuojantis polimerizaciją tarp baltymų, turinčių ilgą glutamino liekanų seką. *In vitro* tyrimai parodė, kad mutavusi huntingtino forma, kuri turi ilgą glutamino liekanų seką, yra transglutaminazės taikinyje, kuri polimerizuoja ne tik mHtt su kita mHtt molekule, bet taip pat ir su kitais baltymais, kurie turi polyQ seką. Taip pat yra duomenų, kad transglutaminazės aktyvumas yra žymiai padidėjęs HD smegenyse (Karpui *et. al.* 1999).

Kadangi mHtt agregatų susidarymas visada aptinkamas sergant Huntingtono liga, todėl dauguma mokslininkų mano, kad šie agregatai yra pagrindinė priežastis, dėl kurios miršta neuronai. Taip pat mHtt baltymas agreguojasi ne tik pats su savimi, bet ir su kitais normaliai funkcionuojančiais baltymais, taip sutrikdydamas viduląstelinius procesus. Vis dėlto mutavusio huntingtino agregatai gali būti tik šalutinis efektas dėl vykstančios ląstelių disfunkcijos, arba gali netgi atlikti apsauginę funkciją ankstyvose ligos stadijose (Kuemmerle *et. al.* 1999). Yra iškelta hipotezė, kad ląstelė į agregatus suriša tirpią mHtt formą, kuri galėtų padaryti daug didesnę žalą, ir taip nukenksmina toksišką baltymą (Gunawardena *et. al.* 2005). *In vitro* tyrimai parodė, kad dryžuotojo kūno neuronai, transfekuoti mHtt, neleidžiant jam agreguotis, neišgyvendavo. Tuo tarpu tirpios formos koncentracijos sumažėjimas

padidino neuronų išlikimą (Arrasate *et. al.* 2004). Iki šiol dar nėra vieningos nuomonės, kuri baltymo forma yra mažiau kenksminga ląstelei.

Potransliacinės modifikacijos

Laukinio tipo ir mutavusio huntingtino agregaciją gali reguliuoti kelios potransliacinės modifikacijos. Serino liekanų fosforilinimas apsaugo baltymą nuo proteazių poveikio ir tolimesnės agregacijos. Mutavusio baltymo 421 serino fosforilinimas kinaze B sumažina baltymo kenksmingumą *in vitro* (Rangone *et. al.* 2004). Be to, mHtt 421 serino fosforilinimas yra žymiai sumažėjęs dryžuotame kūne YAC transgeninėse pelėse (šios pelės ekspresuoja *htt* su ~128 CAG pasikartojimais) (Warby *et. al.* 2005). Dėl serino fosforilinimo 434 padėtyje, kaspazės negali kirpti mHtt 513 padėtyje ir taip stabdomas agregatų formavimasis ir susilpninamas baltymo toksiškumas *in vitro* (Luo *et. al.* 2005). Kita huntingtino potransliacinė modifikacija yra sumoilinimas. Jos metu maža, su ubikvitinu susijusi molekulė (*angl.* small ubiquitin- related protein modifier, SUMO) prisijungia prie lizino liekanų. SUMO prisijungimas prie lizino skatina neuronų degradaciją, o mutacijos šiuose lizinuose slopina sumoilinimą ir mažina HD patologiją *Drosophila* modelyje (Steffan *et. al.* 2000). Cisteino esančio 214 padėtyje palmitoilinimas, (palmitino rūgšties prijungimas) su huntingtinu sąveikaujančio baltymu 14 (HIP14), kuris yra palmitoiltransferazė, yra būtinas WT *htt* judėjimui ir funkcijai. Mutacija *htt* baltyme sumažina afiniškumą HIP14 ir tai žymiai sumažina huntingtino palmitoilinimą. *In vitro* tyrimai parodė, kad nepalmitoilintas *htt* baltymas linkęs formuoti agregatus (Yanai *et. al.* 2006).

Mutavęs huntingtinąs pažeidžia daug viduląstelių mechanizmų

Proteazės kaspazė 3 ir kalpains kerpa *htt* baltymą už 550 aminorūgščių liekanų ir kuo ilgesnė polyQ uodega, tuo proteazių efektyvumas didesnis. Manoma, kad proteazių atkirptas N galas yra kenksmingesnis ląstelei nei pilno ilgio mHtt ir yra linkęs agreguotis. Dėl mažo dydžio šis fragmentas pasyvios difuzijos būdu patenka į branduolį (Sun *et. al.* 2002). Šie agregatai aktyvuoja proteazes ir inicijuoja kitų baltymų proteolitinį skaidymą, dėl kurio galiausiai ląstelė žūva. Be to, ilga glutamino grandinė neleidžia *htt* jungtis ir inhibuoti kaspazę 3. Taip pat mutavęs baltymas nesijungia prie HIP1, kuris tampa laisvas ir gali aktyvuoti kaspazę 8. Ši kaspazė 8 yra iniciatorinė – ji aktyvuoja kitas kaspazes, kurios sukelia apoptozę (Gervais *et. al.* 2002).

Karščio šoko baltymai (*angl.* heat – shock proteins, toliau – HSP), HSP40 ir HSP70 yra šaperonai, atsakingi už klaidingai susilanksčiusių baltymų taisyklingos erdvinės struktūros atstatymą. Dėl ilgos polyQ uodegos mHtt netaisyklingai susilanksto ir šie šaperonai bando atstatyti teisingą struktūrą. Tačiau *in vitro* tyrimai parodė, kad šie baltymai agreguojasi kartu su mHtt ir taip, laikui bėgant, prarandama HSP40 ir HSP70 normali funkcija, todėl ima kauptis netaisyklingai susilankstę viduląsteliniai baltymai (Wytenbach *et. al.* 2000).

Taip pat keletas su proteasominiu baltymų degradacijos keliu susijusių komponentų, tokių kaip ubikvitiną konjuguojantys fermentai, reguliaciniai ir katalitiniai subvienetai yra aptinkami agregatuose. Tai reiškia, kad yra sutrikęs ubikvitino – proteosominis baltymų degradacijos mechanizmas. Kadangi ubikvitino liekanos aptinkamos mHtt agregatuose, manoma, kad ląstelė mėgina pažymėti mutavusį baltymą proteosominei degradacijai. Bandymai atlikti naudojant sąlyginį HD pelių modelį, kuriame mHtt ekspresijos nutildymas vedė prie agregatų išnykimo. Tai parodė, kad agregatų formavimasis priklauso nuo mHtt sintezės greičio ir jo degradacijos greičio. Tačiau normalios HD patologijos metu genas nėra nutildomas ir agregatų skaičius didėja progresuojant ligai. Taip yra todėl, kad proteosomos yra perkrautos mutavusiais ir netaisyklingai susiklosčiusiais baltymais ir nespėja atlikti savo funkcijos. Dėl to neuronai gali pritrūkti funkcionalių proteosomų ir ima kauptis agregatai. (Jana *et. al.* 2001).

Yra įrodymų, kad WT htt dalyvauja valdant medžiagų transportą per HAP1 baltymą tiek į aksoną tiek iš jo. Mutavęs baltymas praranda gebėjimą jungtis su HAP1, todėl medžiagos keliauja chaotiškai, netvarkingai. htt/HAP1/p150 kompleksas palaiko ryšį tarp motorinių baltymų ir mikrovamzdelių. Kadangi mHtt nebegali jungtis su HAP1, nesusidaro šis kompleksas ir medžiagų apytaka tarp ląstelės kūno ir aksono yra nekontroliuojama (Gauthier *et. al.* 2004).

1.1.4. R6/2 transgeninės pelės

Norint atlikti išsamius ir patikimus tyrimus su Huntingtono liga, reikia turėti daug pacientų. Tačiau ši liga yra reta ir sukaupti duomenų apie šią ligą gali būti sudėtinga. Todėl 1996 m. Mangiarini *et. al.* sukonstravo R6 linijos transgenines peles, kurios turėjo žmogaus *htt* geno pirmąjį egzoną (~3 % viso geno). Simptomai, pasireiškę šioms pelėms, buvo labai panašūs į HD ligą sergančių pacientų požymius: motorinių ir kognityvinių gebėjimų sutrikimas, svorio praradimas, sumažėjęs smegenų dydis, pakitęs neuromediatorių lygis, branduolyje ir citoplazmoje atsirandantys mHtt agregatai, diabetas ir priešlaikinė mirtis (Gilet *et. al.* 2009). Iš 5 sukurtų linijų populiariausios ir geriausiai ištirtos buvo R6/1 (115 CAG pasikartojimų) ir R6/2 (150 CAG pasikartojimų). Šioms pelėms, ypač R6/2 linijos pelėms HD ligos simptomai pasireiškė anksti ir liga progresuodavo labai greitai. Paprastai pelės išgyvendavo nuo 12 iki 17 savaičių (Mangiarini *et. al.* 1996).

1.2. Baltymų degradavimo mechanizmai

Ląstelės homeostazė yra palaikoma tiksliai reguliuojamo balanso tarp susintetintų ir degraduotų ląstelės komponentų. Nauji baltymai yra sintetinami iš aminorūgščių gautų suskaldžius senus, mutavusius, klaidingai susilanksčiusius ar ląstelei nebereikalingus baltymus. Eukariotinėse ląstelėse yra du svarbūs degradacijos mechanizmai: autofagija ir ubikvitino proteosominis kelias (*angl.*

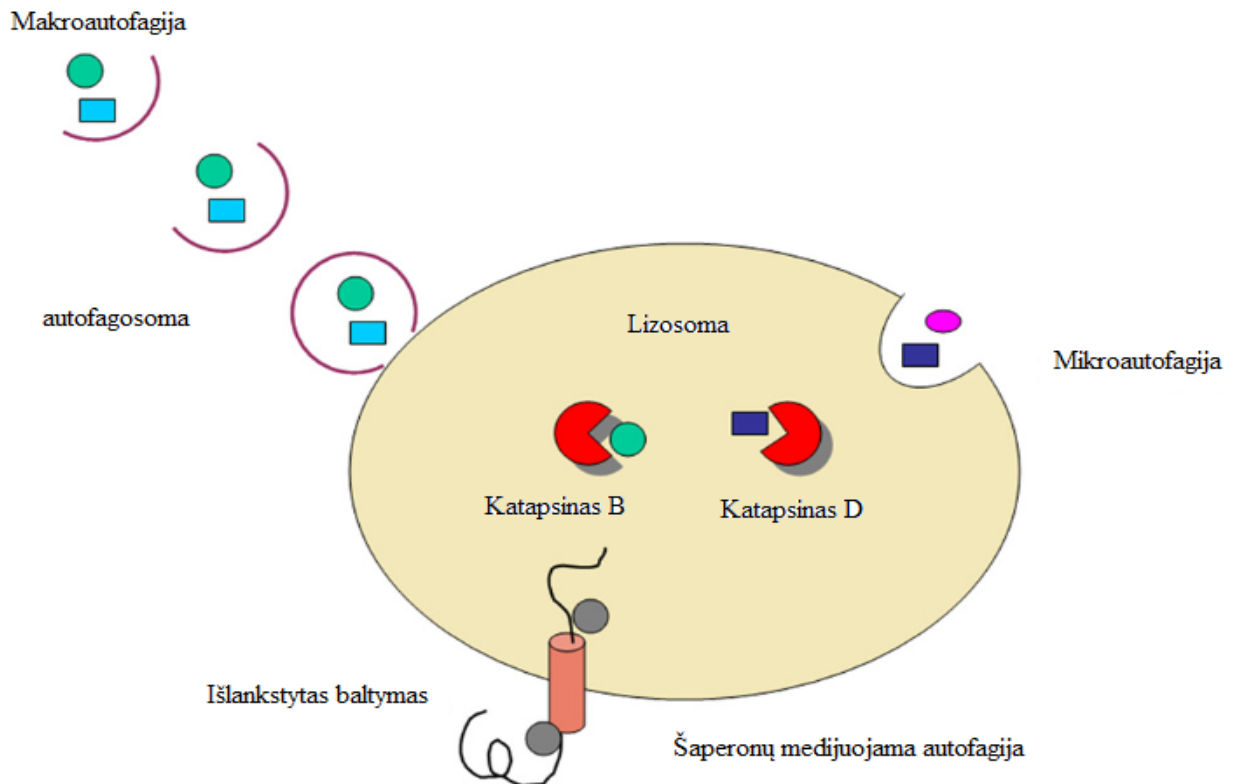
ubiquitin proteasome pathway, toliau – UPP). Buvo manoma, kad šie mechanizmai vienas nuo kito nepriklauso, tačiau atsiranda vis daugiau duomenų, kad egzistuoja ryšys tarp šių degradacijos kelių (Korolacuk *et. al.* 2009).

1.2.1. Autofagija

Autofagija (*gr.* auto – save, phagy – valgyti) yra homeostatinis baltymų ir organelių degradavimo procesas. Yra trys autofagijos rūšys: mikroautofagija, makroautofagija ir šaperonų reguliuojama autofagija (*angl.* chaperone – mediated autophagy, toliau – CMA) (2 pav.). Visos šios autofagijos rūšys skiriasi reguliacijos mechanizmais, aktyvavimu, degraduojamomis medžiagomis, tačiau galutinis skaldymo procesas vyksta lizosomose (Pedersen *et. al.* 2009). Lizosomos (*gr.* lysis – tirpdymas, soma – kūnas) yra ląstelės organelės, apsuptos vienguba membrana. Jose yra fermentų – fosfatazių, karbohidrazių, proteazių ir nukleazių, – kurie ardo į lizosomą patekusius baltymus, polisacharidus, nukleorūgšis. Lizosomos pH yra labai rūgštinis, tai palengvina ir pagreitina fermentų darbą. Taip pat jose yra degraduojamos ir blogai funkcionuojančios ląstelės struktūros. Kai lizosomos sienelė suplyšta, prasideda II tipo užprogramuota ląstelės žūtis.

Makroautofagija – dažniausiai aptinkama autofagijos rūšis. Šiuo būdu ląstelė suskaldo tiek mažus tirpius baltymus, tiek didelius agregatus bei neveiksnius ląstelės dalis. Makroautofagija prasideda, kai C formos dvigubos membranos struktūra atsiranda citoplazmoje. Tuomet abu šios membranos galai ima augti ir galiausiai susijungia suformuodami vakuolę (autofagosomą). Ši vakuolė nugabena viduje esantį „krovinį“ prie lizosomos ir išorinė autofagosomos membrana susilieja su lizosoma, o viduje esantis turinys sulizuojamas.

Kitas viduląstelinių medžiagų degradavimo procesas yra mikroautofagija. Jos metu mažais įlinkimais lizosomos paviršiuje yra praryjamos tik mažos citoplazmos porcijos. Atvirkščiai nei makroautofagija, kur svarbiausia aktyvacija vyksta po trumpalaikio badavimo, mikroautofagija yra atsakinga už pastovią, ilgai gyvuojančių baltymų skaldymą. CMA yra selektyvi autofagijos rūšis. Jos metu molekuliniai šaperonai, Hsp70, Hsp40, Hsp90, atpažįsta Lys-Phe-Pro-Arg-Gln baltymo seką. Tada šaperonai nugabena netinkamai susilanksčiusį baltymą prie 2a tipo lizosomos paviršiuje esančio receptoriaus (*angl.* lysosome – associated membrane protein 2a, toliau – Lamp2a). Per šį receptorių baltymai patenka į lizosomos vidų ir yra perdirbami (Yang *et. al.* 2005).



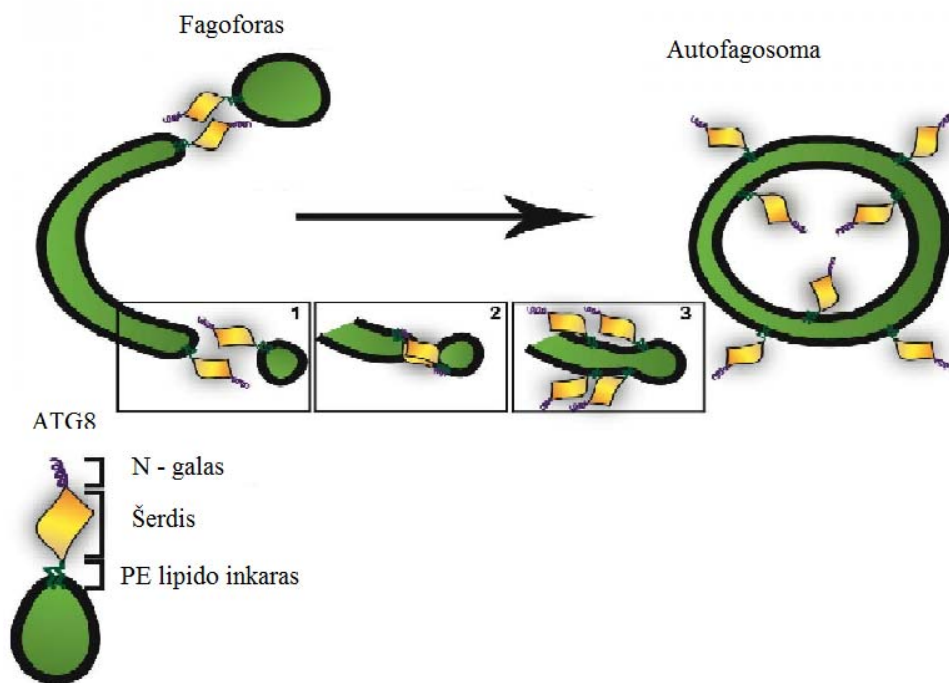
2 pav. Autofagijos rūšys. Mikroautofagija – lizosomos membranos įlinksta į vidų ir apgaubia medžiagas. Makroautofagija – susiformuoja autofagosoma, kuri atgabena krovinį į lizosomą. Šaperonų reguliuojama autofagija – karščio šoko baltymai atpažįsta netaisyklingai susilanksčiusius baltymus ir atgabena juos į lizosomą (Pedersen et. al. 2009)

Makroautofagija

Anksčiau buvo manoma, kad autofagosomos membrana yra kilusi iš ribosomų neturinčio grūdėtojo endoplazminio tinklo ir Goldžio aparato. Tačiau atsiranda vis daugiau duomenų, kad fagoforai yra pagrindinis autofagosomos membranos šaltinis. Ląstelei augant natūraliomis sąlygomis, makroautofagija nevyksta, tačiau visi autofagijos genai (toliau – *Atg*) yra ekspresuojami. Buvo rasti 25 specifiniai genai, dalyvaujantys makroautofagijoje ir 40 papildomų genų, kurie be autofagijos dalyvauja ir kitose sistemose. Buvo pastebėta, kad didelį vaidmenį autofagosomos susidaryme turi Atg12-Atg5 ir Atg8-fosfatidiletanolaminas (*angl.* phosphatidylethanolamine, PE). Abu šie kompleksai dalyvauja membranos elongacijoje ir vakuolės užsidaryme. Atg8 kompleksas taip pat dalyvauja ir atpažįstant ubikvitinu pažymėtus baltymus ir pritvirtinant prie autofagosomos. Atg8 ortologas žinduolinėse ląstelėse yra su mikrovamzdeliais susijusio baltymo 1 lengvoji grandinė 3 (*angl.* microtubule – associated protein 1 light chain 3, toliau – LC3). Egzistuoja dvi LC3 formos: LC3-I (14kDa) ir LC3-II (16kDa). Norint gauti aktyvią citoplazminę LC3-I formą, naujai susintetinto baltymo 22 C galinės aminorūgštys turi būti nukirptos Atg4 proteaze. Tačiau LC3-I negali jungtis prie

membranos, tam ji turi būti modifikuota. Atg7 modifikuoja LC3-I molekulę, prijungdama PE ir paversdama į LC3-II, kuri tvirtai prisijungia prie autofagosomos membranos per fosfolipidą. Tačiau Atg4 proteazė gali nukirpti PE inkarą nuo LC3 ir taip sugrąžinti jį į tirpią būseną. Tokiu būdu palaikydama balansą tarp tirpios ir netirpios LC3 formos (Kabeya *et. al.* 2004). LC3 yra dažnai naudojamas kaip autofagijos žymuo.

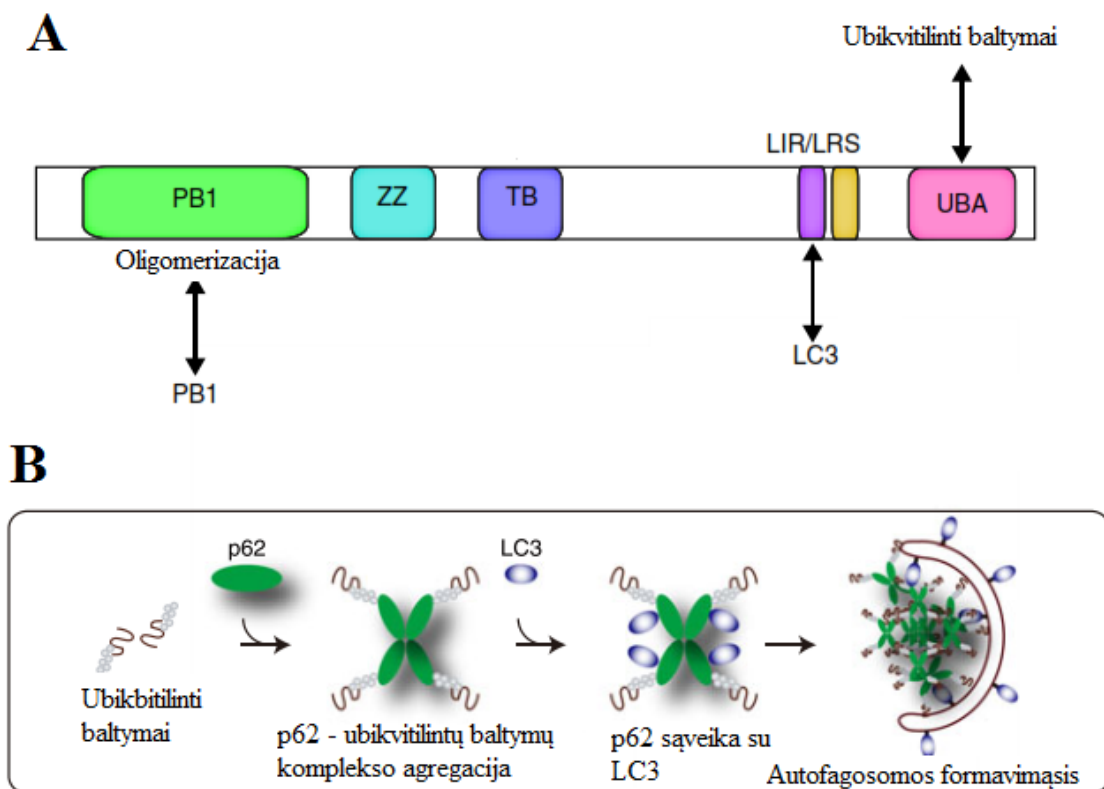
LC3 taip pat buvo rasta ir ant fagoforų. Po to, kai LC3-II prisitvirtina prie fagoforo, aktyvūs šio baltymo centrai suklijuoja vieną fagoforą prie kito. Fagoforų membranos susilieja suformuodamos dvimembranę struktūrą. Vėliau prie šio darinio prisijungia kiti fagoforai ir taip formuojama autofagosoma (3 pav.) (Weidberg *et. al.* 2010). Buvo rasti dar du Atg8 ortologai, su gama aminobutrinės rūgšties A tipo receptoriais susijęs baltymas (*angl.* γ aminobutyric acid type A receptor-associated protein, toliau – GABARAP) ir 16 kDa dydžio su Goldžio aparatu susijęs ATPazės stipriklis (*angl.* Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa, toliau - GATE-16). Šie du baltymai yra taip pat modifikuojami ir turi tirpią (I) ir netirpią (II) formas. Tačiau šių baltymų funkcijos nėra identiškos. Manoma, kad vienas baltymas gali dalyvauti autofagosomos elongacijoje, o kiti – užsidarant autofagosomai, kai ji pasiekia reikiamą dydį (Tanida *et. al.* 2004).



3 pav. Autofagosomos formavimasis

LC3-II molekulė, esanti vidinėje autofagosomos pusėje, yra svarbi ne tik vakuolės formavimosi etape, bet ir per p62 molekulę atpažįstant ubikvitinu pažymėtus baltymus. p62 yra ubikvitilintų baltymų receptorių, kuris selektyviai nugabena juos į autofagosomą, kur susiriša su LC3-II molekule (4B pav.). Ši molekulė yra linkusi oligomerizuotis su kitoms p62 molekulėms per PB1 domeną ir esant

autofagijos sutrikimams citoplazmoje aptinkamos p62 sandaugos (Bjorkoy *et. al.* 2005). Taip pat p62 turi su ubikvitinu susijusį domeną (*angl.* ubiquitin – associated domain, UBA), kuris atpažįsta ubikvitinu pažymėtus baltymus, ir su LC3 sąveikaujantį/LC3 atpažįstantį domeną (*angl.* LC3 – interacting region/LC3 recognition sequence, LIR/LRS), per kurį sąveikauja su LC3-PE kompleksu (4A pav.) (Moscat *et. al.* 2006).



4 pav. A. p62 molekulės struktūra. Per PB1 domeną šis baltymas jungiasi su kito p62 baltymo PB1 seka ir taip sudaro agregatus. LIR/LRS domenas prisijungia prie LC3 molekulės. UBA seka atpažįsta ubikvitinu pažymėtus baltymus. B. Ubikvitinu pažymėtų baltymų atpažinimo ir prijungimo prie autofagosomos mechanizmas (Ichimura *et. al.* 2010).

Autofagosomai susijungiant su lizosoma dalyvauja tie patys baltymai, kaip ir susijungiant kitoms ląstelės vakuolėms. Dauguma jų priklauso prie tirpaus NSF prisitvirtinusių baltymo receptorių (*angl.* soluble NSF attachment protein receptor, SNARE) šeimai. Tačiau iki šiol nėra aišku, kokią funkciją atlieka konkretus baltymas. Autofagosomos ir lizosomos susijungimo metu labai svarbu yra tinkamas laiko momentas. Jeigu susijungimas įvyks per anksti, kai vakuolė nėra užsidariusi, tuomet visas vakuolės turinys liks citoplazmoje. Todėl susijungimo laikas turi būti tiksliai reguliuojamas. Atg8-PE kompleksas, kuris yra aptinkamas išorinėje autofagosomos pusėje, yra perkerpamas Atg4 proteaze, taip gali būti sustabdoma nesusiformavusios vakuolės susijungimas su lizosoma (Kirisako *et. al.* 2000). Atg8-PE esantis vidinėje vakuolės dalyje yra degraduojamas kartu su kitais baltymais lizosomos proteazėmis. Žinduolių ląstelėse autofagosomos ir lizosomos susijungimas yra sudėtingas

procesas, kurio metu autofagosoma turi būti subrandinama. Brandinimo procese yra svarbios GTPazės, žinduolių SNARE ortologai ir NSF baltymai. Taip pat svarbūs yra mikrovamzdeliai, nes jų destabilizavimas citohalasinu D (agentas, kuris suardo aktino gijas) žymiai sulėtina autofagosomos brendimą (Blankson *et. al.* 1995).

1.2.2. Proteasominis baltymų degradavimo kelias

Atsiranda vis daugiau duomenų, kad autofagija ir UPP yra tarpusavyje susiję mechanizmai. Pelių, kurioms buvo sutrikusi autofagija, proteasominis baltymų degradavimo kelias buvo sulėtėjęs. Manoma, kad tai yra dėl p62 baltymo akumuliacijos citoplazmoje, kur jis jungiasi prie ubikvitinu žymėtų baltymų. Šie baltymai yra atpažįstami p62, tačiau nėra degraduojami dėl autofagijos sutrikimų. Ubikvitinu žymimi ne tik baltymai, kurie bus degraduojami lizosomose, bet taip pat ir proteasomose. Taip p62 inhibuoja trumpai gyvenančių baltymų patekimą į proteasomą (Korolchuk *et. al.* 2009). Proteasoma yra daugiakatalitinė, multifunkcinė proteinazė. Tai endopeptidazės, susidedančios iš daugybės subvienetų. Šie fermentai skiriasi nuo kitų žinomų proteinazių ir atstovauja ypatingai proteolitinių fermentų grupei specifiskai degraduojančių ubikvitilintus baltymus. Dažniausiai baltymus degraduoja 26S proteasomos. Ši proteasoma degraduoja baltymus, įtrauktus į daugelį viduląstelių procesų (diferenciacija, proliferacija, atsakas į stresą, metabolizmo reguliavimas) arba defektyvius, mutavusius baltymus. Prieš patenkant į proteasomą baltymai turi būti modifikuoti, kovalentiškai prijungus ubikvitiną. Ubikvitiną turi visos eukariotinės ląstelės. Šis baltymas gali polimerizuotis, tai yra daugybė ubikvitino molekulių gali susijungti į vieną grandinę tol, kol pažymėtas baltymas nenukreipiamas degradacijai į proteasomą. Susidarę junginiai, turintys daugiau nei vieną ubikvitino molekulę, degraduojami proteasomose (Hershko *et. al.* 1998).

1.3. Akies sandara

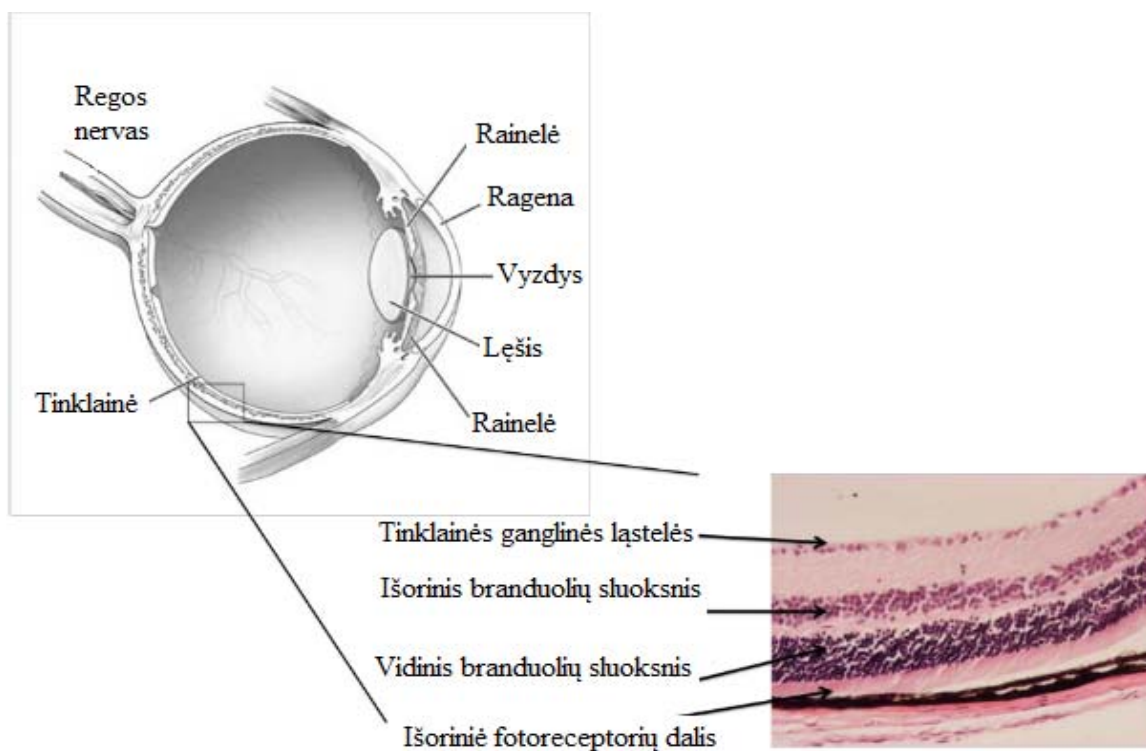
Akies obuolys yra netaisyklingos rutulio formos, 23 – 24 mm skersmens. Jį sudaro kapsulė ir viduje esantis akies turinys. Kapsulė sudaryta iš trijų dangalų: išorinio skaidulinio, vidurinio kraujagyslinio ir vidinio akies obuolio (Baltrušaitis ir kt. 1990).

Išorinį skaidulinį dangalą sudaro skaidri ragena ir likusi neskaidri odena. Ragenos storis centre 0.8 – 0.9 mm, periferijoje 1 – 1.1 mm. Ji yra sudaryta iš 5 sluoksnių ir dalyvauja šviesos spindulių refrakcijoje. Odena užima 5/6 viso akies obuolio skaidulinio dangalo ploto. Iš išorės odeną dengia antodeninė plokštelė, prie kurios tvirtinasi raumenys. Savojo odenos medžiaga sudaryta iš tankaus skaidulinio jungiamojo audinio, išsidėsčiusio lygiagrečiai akies paviršiui, todėl odena yra nepermatoma. Išorinis dangalas ir vidinis akispūdis palaiko akies obuolio formą (Klotz *et. al.* 2000).

Vidurinę kraujagyslinę dangalą sudaro rainelė, ties lęšio pusiauju esantis krumplynas ir gyslainė. Gyslainės storis yra 0.1 – 0.2 mm. Per ją yra maitinama tinklainė (retina). Rainelė ir krumplynas yra gyslainės dariniai. Rainelė reguliuoja šviesos kiekį patenkantį į akį ir skiria priekinę akies kamerą nuo užpakalinės. Ji yra disko formos, 0.4 mm storio. Rainelės centre yra 4 mm skersmens apvali anga – vyzdys. Rainelė susiaurindama ar išplėsdama vyzdį reguliuoja šviesos srautą, patenkantį į akį. Krumplynas yra sustorėjusi gyslainė. Pagrindinę jo dalį sudaro mezenchiminės kilmės lygusis krumplyno raumuo ir krumplyno stroma, sudaryta iš puriojo jungiamojo audinio. Krumplynas yra atsakingas už akomodaciją (5 pav.)(Klotz *et. al.* 2000).

Vidinis akies obuolio dangalas skirstomas į rainelinę dalį, krumplyninę dalį ir reginę dalį. Priekinė rainelinė tinklainės dalis dengia visą užpakalinį rainelės paviršių. Ją sudaro rainelės pigmentinis sluoksnis ir tinklainė, susidedanti iš vieno sluoksnio žemų prizminių ląstelių. Vidurinė krumplyninė tinklainės dalis sudaryta iš krumplyno pigmentinio sluoksnio ir tinklainės, susidedančios iš vieno sluoksnio nepigmentinių ląstelių. Arčiau rainelės šios ląstelės yra žemensnės, kubinės. Rainelinė ir krumplyninė tinklainės dalys priklauso akies akomodaciniam aparatui bet regėjimo procese nedalyvauja.

Reginė tinklainės dalis yra nuo tos vietos, kur išeina optinis nervas iki dantytojo krašto. Ši dalis yra prigludusi prie gyslainės paviršiaus, bet nesusijungusi su ja ir todėl patologiniais atvejais gali lengvai atsokti nuo jos. Reginė retinos dalis susideda iš šviesai jautrios nervinės ir išorinės pigmentinės dalių. Pigmentinę tinklainės dalį sudaro žemos, prizminės šešiakampės ląstelės. Pamatinis ląstelių



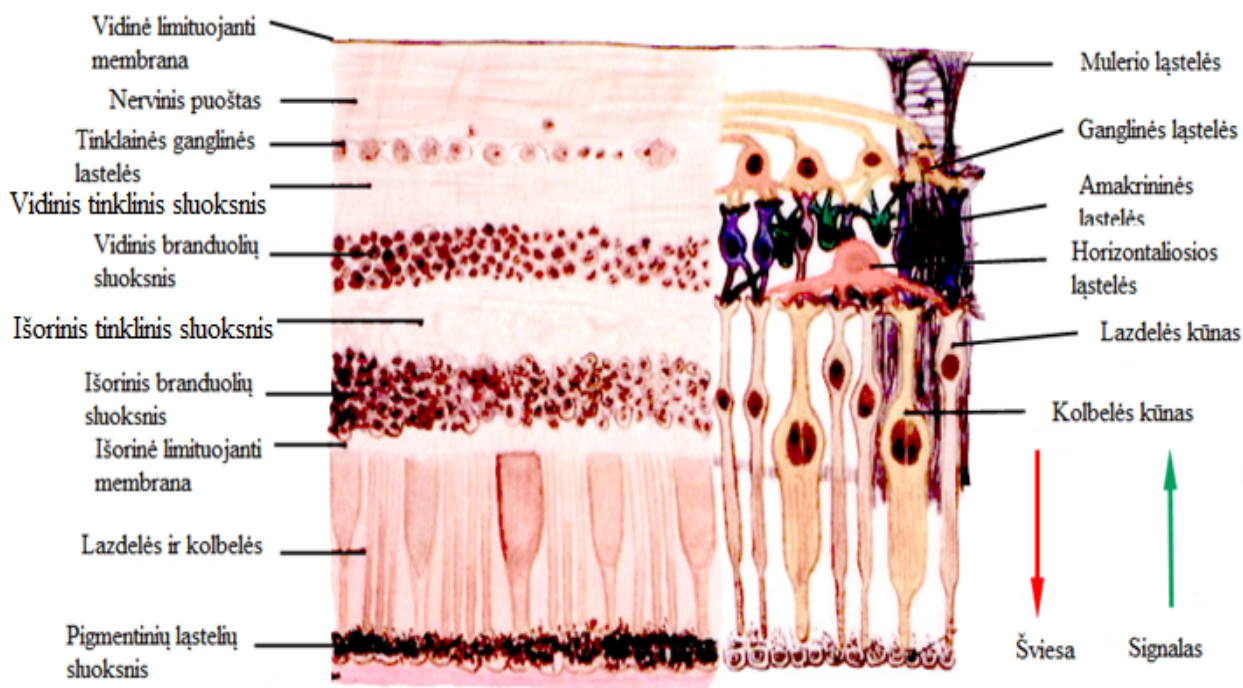
5 pav. Akies sandara

galas guli ant pamatinės membranos, atkreiptos į gyslainę. Vidinis ląstelės paviršius turi 10 – 40 citoplazmos ataugų, kuriuose yra pigmento melanino intarpų. Pigmentinės ataugos skiria jungiamąsias ląsteles viena nuo kitos. Kai akis apšviesta, pigmento grūdėliai nuslenka į ląstelės ataugas tarp juntamųjų ląstelių. Tamsoje pigmentas vėl grįžta iš ataugų į pigmentinės ląstelės citoplazmą.

Tinklainės vidinę dalį sudaro trys neuronų grandinės (6 pav.): išorinė fotoreceptorinė, vidurinė asociacinė ir vidinė ganglinė (Jeon *et. al*, 1998). Fotoreceptorinę dalį sudaro dvejopos regos ląstelės: lazdelinės ir kolbelinės. Jos priima šviesos spindulius, fotonus. Kiekviena ląstelė turi išorinį ir vidinį segmentą. Lazdelių išorinis segmentas yra vienas ant kito gulinčių diskų visuma ir yra įsiterpęs tarp išorinių pigmentinių ląstelių. Disko viduje yra lipidų ir regėjimo pigmento rodopsino. Jis sudarytas iš baltymo opsino ir retineno. Veikiamas šviesos jis išblunka, ir fotoreceptoriaus jautrumas šviesai sumažėja. Tamsoje jis vėl atsinaujina ir jautrumas padidėja. Vidinį segmentą sudaro ląstelės gyvavimui reikalingos organelės. Kolbelių struktūra yra labai panaši tik skiriasi forma ir dydis. Jos taip pat turi išorinį ir vidinį segmentą, tačiau vietoj baltymo rodopsino yra jodopsinas. Regėjimo receptoriai išsidėstę visoje tinklainėje, išskyrus akląją dėmę. Žmogaus regimojoje tinklainės dalyje yra apie 130 milijonų lazdelinių ir apie 6-7 milijonai kolbelinių ląstelių. Centrinėje tinklainės duobelėje yra vien kolbelinės regos ląstelės. Jos reaguoja į spalvinius dirgiklius. Lazdelinės ląstelės į spalvinius dirgiklius nereaguoja ir veikia prieblandoje (Jeon *et. al*, 1998).

Viduriniąją asociacinę grandinę sudaro trijų rūšių nervinės ląstelės: horizontaliosios, bipolinės ir amakrinės. Horizontaliniai neuronai vienu fotoreceptorių priimtus šviesos ar spalvų impulsus gali perduoti kitiems fotoreceptoriams ir taip žiūrimus objektus padaryti kontrastingesnius. Bipoliniai neuronai sujungia fotoreceptorines ląsteles su ganglinėmis ląstelėmis. Amakriniai neuronai neturi aksono, o turi tik dendritus, kurie bipolinių neuronų perduotus signalus gali perduoti net keliems gangliniams neuronams (Fernald 1997).

Ganglinę grandinę sudaro retinos ganglinės ląstelės (*angl.* retinal ganglion cells, toliau – RGC). Tai dideli, apie 30µm skersmens multipoliniai neuronai. Jų dendritai sinapsėmis pasibaigia vidiniame tinkliniame sluoksnyje, o nemielininti aksonai prie tinklainės vidinio paviršiaus sudaro tinklainės nervinių skaidulų sluoksnį ir regos nervą. RGC perduoda signalą į talamą (*lot.* thalamus) esantį lateralinį kelinį branduolį (*lot.* lateral geniculate nucleus, toliau – LGN). Tinklainės ganglines ląstelės iš išorės dengia astrocitų sluoksnis (Fernald 1997).



6 pav. Tinklainės vidinę dalį sudarančios ląstelės

Astroцитai (astroglia) yra žvaigždės pavidalo centrinės nervų sistemos (toliau – CNS) ląstelės, priskiriamos neurogliai. Anksčiau buvo manoma, kad šios ląstelės neatlieka svarbios funkcijos, tačiau atsiranda vis daugiau duomenų, įrodančių jų svarbą CNS (Maragakis *et. al.* 2006). Astroцитai tarp neuronų reguliuoja sinapsę, per glutamato receptorių, kuris perneša glutamatą į greta esantį astroцитą (Danbolt *et. al.* 2001). Astroglijos ląstelės tarpusavyje komunikuoja per ATP, kuri išskiria viena ląstelė ir prisijungia greta esanti, per purino receptorių. Tai suaktyvina fosfolipazę C, kuri aktyvuoja inozitolio trifosfatą, o tai skatina Ca^{2+} jonų mobilizaciją į ląstelę. Taip pat tarp astroцитų yra plyšinės jungtys (*angl.* gap junction), kuriomis astroцитai apsikeičia mažomis molekulėmis (Simard *et. al.* 2004). Astroцитai transportuoja įvairias maisto medžiagas į nervines ląsteles per malato-asparto šaudyklę. Tačiau pati svarbiausia sąsaja tarp neuronų ir astroцитų yra glutamo – glutamino šaudyklė. Astroцитai pasiima iš aplinkos didžiąją dalį glutamato ir paverčia jį į glutaminą. Šis glutaminas yra perduodamas į neuronus ir yra būtinas neurotransmitoriaus glutamato gamybai. Astroцитai taip pat sintetina gliukozę iš galaktozės, kuri vėliau transportuojama į nervines ląsteles ir verčiama į piruvatą. Taip pat jie atlieka svarbią funkciją reguliuojant jonų koncentraciją smegenų ląstelėse ir jų išorėje. Karboanhidrazė, anglies dioksidas, kuris yra produkuojamas nervinių ląstelių, ir vandenį, astroцитai verčia į vandenilio ir bikarbonato jonus. Yra gauta daug duomenų, jog astroцитai yra svarbūs reguliuojant smegenų kraujotaką. Šių glijos ląstelių ataugos jungiasi prie kraujagyslių, kartu apgaubdamos neuronų sinapsių vietas. Kadangi astroцитai kontaktuoja ir su neuronais ir su smegenų

kraujagyslėmis, todėl jie yra centrinis elementas, reguliuojantis neuronų aktyvumą ir kraujo tėkmę. Eksperimentiškai įrodyta, kad sinapsių vietose išsiskyręs glutaminas aktyvuoja metabotropinį glutamino receptorių, esantį astrocitų membranoje. Šis receptorių skatina Ca^{2+} jonų astrocitų atsišakojimuose didėjimą, o tai skatina šalia esančių arteriolių išsiplėtimą (Takano *et. al.* 2006).

Kita glijos ląstelių grupė, esanti tinklainėje, yra Mülerio ląstelės. Šios pagalbinės ląstelės aptinkamos tiksliai žinduolių tinklainėje. Yra duomenų, kad šios ląstelės gali diferencijuotis į multipotentines ląsteles, kurios toliau gali diferencijuotis į įvairias tinklainės ląsteles, kurios buvo pažeistos. Taip pat Mülerio ląstelės nukreipia fotonus į fotoreceptorių. Šios ląstelės eina nuo išorinės limituojančios membranos, kur susijungia su fotoreceptorių kūnu, iki vidinės limituojančios membranos, kur susijungia tarpusavyje. Ilgas Mülerio ląstelių kūnas užpildo tarpus tarp nervinių ląstelių. Mülerio glijos ląstelių kūnas yra vidiniame branduolių sluoksnyje ir turi daug smulkių ir stambių ataugų, išsiskerojusį į visas puses, kurios įsiskverbia tarp neuronų kūnų branduolių sluoksnyje ir apgaubia neuronų ataugas plexiform sluoksnyje. Mülerio ląstelės sudėtinga pastebėti šviesiniu mikroskopu, tačiau esant nervinių ląstelių pažeidimams, jos suaktyvėja ir ima intensyviai ekspresuoti GFAP (*angl.* glial fibrillary acidic protein, toliau – GFAP) baltymą visame ląstelės kūne (Edwards 1994).

2. MEDŽIAGOS, METODAI, ĮRANGA

2.1. Reagentai, įranga, eksperimentiniai gyvūnai

2.1.1. Medžiagos

Acto rūgštis (Merck, JAV), amonionitratas (Sigma, JAV), amoniopersulfatas (Sigma, JAV), bis-akrilamidas (Biorad, JAV), boro rūgštis (Riedel de Haen, Vokietija), Bradfordo reagentas (Sigma, JAV), jaučio serumo albuminas (Sigma, JAV), 3,3'-diaminobenzidino (DAB) substrato rinkinys (Zymed, Vengrija), 4',6-diamidino-2-fenilindolas (DAPI) (Life Technologies, Suomija), depeksas (Life Technologies, Suomija), etilendiamintetraacto rūgštis (EDTA) (Merck, JAV), etanolis (Lappoa, Suomija), formaldehydas (Sigma, JAV), glicerolis (Sigma, JAV), glicinas (MP Biomedicals, Prancūzija), auksochloridas (Merck, JAV), vandenilio peroksidas (J.T. Baker, JAV), Hario hematoksilinas (Merck, JAV), Histostain Plus Bulk rinkinys (Zymed, Vengrija), Imobilon™ Western (Millipore, JAV), merkaptotetanolis (Sigma, JAV), metanolis (Lappoa, Suomija), pieno milteliai (Valio, Suomija), mini PAP pieštukas (Zymed, Vengrija), moviolas (Sigma, JAV), dinatriofosfatas (Merck, JAV), NaCl (Thermo scientific, JAV), natriodihidroksido fosfatas (Merck, JAV), natrio hidroksidas (J.T. Baker, JAV), normalus ožio serumas (NGS) (Life Technologies, Suomija), nuclear fast red (Sigma, JAV), ponceau S (Sigma, JAV), kalio jodidas (Merck, JAV), natrio dodecilsulfatas (SDS) (MP Biomedicals, Prancūzija), sidabro hidratas (Merck, JAV), natrio karbonatas (Sigma, JAV), natriotiosulfatas (Sigma, JAV), temed (Biorad, JAV), T-PER (Thermo scientific, JAV), Tris bazė (MP Biomedicals), Tris HCl (Sigma, JAV), Triton (Riedel de Hean, Germany), tween (Sigma, JAV), ksilenas (Lappoa, Suomija), ApopTag Peroxidase rinkinys S7101 (Chemicon, JAV).

1 lentelė. Eksperimentuose naudoti pirminiai ir antriniai antikūnai

Metodas	Pirminiai antikūnai	Specifiškumas	Antriniai antikūnai
Imunofluorescencinis dažymas	Pelės anti – mHtt (tinklainė:100; regos nervas 1:50) (Millipore, JAV)	Mutavęs huntingtino baltymas	Ožkos antikūnai prieš pelės antigenus su fluoresuojančia žyme Alexa Fluor 568 (Life Technologies, Suomija)
	Triušio anti – GFAP (1:10000) (StressGen, Belgija)	Glijos ląstelių žymuo	Ožkos antikūnai prieš triušio antigenus su fluoresuojančia žyme Alexa Fluor 488 (Life Technologies, Suomija)
	Triušio anti – Iba-1(1:500) (Wako, Vokietija)	Mikroglijos ląstelių žymuo	Ožkos antikūnai prieš triušio antigenus su fluoresuojančia žyme Alexa Fluor 488 (Life Technologies, Suomija)

1 lentelės tęsinys

Imunohistocheminis dažymas	Triušio anti – Lamp2 (1:200) (Millipore, JAV)	CMA žymuo	Histostain Plus Bulk rinkinys
	Triušio anti – p62 (1:100) (Abcam, Anglija)	p62 baltymas	Histostain Plus Bulk rinkinys
	Triušio anti – GFAP (1:10000) (StressGen, Belgija)	Glijos ląstelių žymuo	Histostain Plus Bulk rinkinys
	Triušio anti – ubikvitinas (1:200) (Dako, Danija)	Baltymų perdirbimas	Histostain Plus Bulk rinkinys
Imunoblotingas	Pelės anti – Hsp70 (1:50) (StressGen, Belgija)	70kDa dydžio karščio šoko baltymo indukuota forma	Ožkos antikūnai prieš pelės antigenus kojunguoti krienų peroksidaze (1:10000) (GE healthcare, Anglija)
	Pelės anti – α -tubulinas (1:8000) (Sigma, JAV)	Baltymų užnešimo kontrolė	Ožkos antikūnai prieš pelės antigenus kojunguoti krienų peroksidaze (1:10000) (GE healthcare, Anglija)
	Triušio anti – LC3 (1:250) (Millipore, JAV)	Autofagijos žymuo	Ožkos antikūnai prieš triušio antigenus kojunguoti krienų peroksidaze (1:5000) (GE healthcare, Anglija)

2.1.2. Aparatūra

Laminarinis boksas (Telemerkki, Suomija), centrifuga Centrifuge 5417 (Eppendorf, Vokietija), šaldanti centrifuga Fresco (Biofuge, Anglija), automatinės pipetės: 10, 20, 100, 200, 1000, 5000 μ L (BioHit, Suomija), svarstyklės GF-1200 (A&D, Japonija), purtyklė Rotamax 120 (Heidolph, Vokietija), gyro-rocker (Stuart Scientific, Anglija), KS250 basic (Kika Labortechnick, Kinija), vertikali elektroforezės sistema V15-17 (Life Technologies, Suomija), imunoblotingo sistema (Biorad, JAV), mikrotomas SM2000R (Leica, Vokietija) ir kriotomas CM3050S (Leica, Vokietija).

Mikroskopai:

1. Olympus BX40, Olympus DP50 kamera, Olympus U-RFL-T gyvsidabrio lempa ir Viewfinder lite programinė įranga, Japonija;
2. Nikon E600 mikroskopas, 01-MBF-2000R-F-CLR-12 kamera, Nikon HB-10104AF gyvsidabrio lempa, Stereoinvestigator 10.0 programinė įranga (MicrobrightField Inc., JAV);
3. Zeiss AX10, AxioCam Erc5s ir AxioCam Mrm kameros, Colibri 1.2 LED lempos, ZEN2011 programinė įranga, Vokietija;
4. Zeiss Stemi 2000C, Vokietija;
5. Zeiss Axio Observer 700 invertuotas mikroskopas, Zeiss LSM 700 konfokalinis modulis, ZEN 2009 programinė įranga, Vokietija.

2.1.3. Laboratoriniai gyvūnai

Bandymai su laboratoriniais gyvūnais atlikti jų eigą suderinus su Laboratorinių gyvūnų naudojimo etikos komisija. Eksperimentui buvo naudojamos R6/2 linijos pelės (n=42) ir jų laukinio tipo pirmtakai (n=40). Gyvūnai laikomi specialiuose narvuose pastovioje temperaturoje ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$), šviesą kontroliuojančioje patalpoje (šviesa įjungiama nuo 7h iki 19h). Maitinami įprastu pašaru ir girdomi vandeniu *ad libidum*.

2.2. Metodai

2.2.1. Audinių paruošimas

Dalis 4 – 19 savaičių pelių buvo anestezuojamos į pilvą suleidus ketamino ir perfuzuojamos 3 min. druskos tirpalu ir vėliau 5 min. paraformaldehidu ištirpintu 0.1M fosfatiname buferiniame tirpale (*angl.* phosphate buffer, toliau – PB), pH 7.4. Akys kartu su regos nervu buvo išpreparuotos ir įkeltos į parafiną arba jų tinklainės buvo išimtos iš odenos ir 24h fiksuotos paraformaldehide. Tada tinklainės buvo išplautos 0.1 M PB, pH 7.4 ir paruošiamos imunohistocheminiam dažymui. Kitai pelių grupei buvo atlikta cervikalinė dislokacija prieš tai jas anestezavus ketaminu. Tinklainės buvo išimtos iš odenos ir užšaldytos iki jų tolimesnio panaudojimo.

2.2.2. Visos tinklainės imunofluorescencinis dažymas

Tinklainės, išimtos iš perfuzuotų akių odenos, 4 x 20 min. išplaunamos 0.1 M PBS, pH 7.4 ir tada 2 x 10 min. 0.05 TBS, pH 7.4. Išplautos tinklainės blokuojamos 30 min. TBS-Triton (0.5 %) tirpale, turinčio 10 % normalaus ožio serumo (*angl.* normal goat serum, toliau – NGS). Po to mėginiai išplaunami TBS-Triton (0.5 %) tirpale, turinčio 1 % NGS ir inkubuojami pelės anti-mHtt pirminiais antikūnais (1:100) 2 paras 4°C . Po inkubacijos ląstelės tris kartus po 15 min. praplaunamos TBS-Triton (0.5 %) tirpale, turinčio 1 % NGS ir laikomos 3h kambario temperatūroje (*angl.* room temperature, toliau – RT) su ožio anti – pelės konjuguotais fluorescencine žyme Alexa Fluor (toliau – AF) 568 antikūnais. Tris kartus praplovus tinklaines 1 % NGS-TBS-Triton (0.5 %) tirpalu, tinklainės inkubuojamos per naktį 4°C temperatūroje antrinais anti – GFAP antikūnais ir tada žymimos ožio anti – triušio AF488 antikūnais prieš tai jas praplovus 1 % NGS-TBS-Triton (0.5 %) tirpalu. Nudažytos tinklainės užnešamos ant stikliuko Zeiss Stemi 2000C mikroskopo pagalba ir stebimos stereologiniu fluorescenciniu mikroskopu Nikon Y-FL bei fotografuojamos Olympus BX40 mikroskopu.

2.2.3. Parafinizuotų tinklainių imunohistocheminis dažymas

Perfuzuotų pelių akys įkeliamos į parafiną, mikrotomu supjaustomos 5 µm storio pjūviais ir užnešamos ant stikliuko. Tada mėginiai deparafinizuojami ksilene, rehidratuojami pamažu mažinant etanolio koncentraciją ir praplaunami distiliuotu vandeniu. Endogeninės peroksidazės blokuojamos laikant mėginius 10 min. 3 % vandenilio peroksido tirpale. Nespecifinio prisijungimo vietos blokuojamos 30 min. inkubuojant mėginius Invitrogen Histostain Plus rinkinio blokavimo reagentu. Tada mėginiai inkubuojami drėgnoje kameroje per naktį 4°C temperatūroje su pirminiais antikūnais (antikūnų tipas ir skiedimas pateikti 1 lentelėje). Kitą dieną mėginiai praplaunami 2 x 5 min. TBS ir 30 min. inkubuojami su biotinilintais antriniais antikūnais. Tada mėginiai vėl praplaunami ir 30min. inkubuojami krienų peroksidaze konjunguotu streptavidinu. DAB buvo naudojamas kaip substratas krienų peroksidazei. Mėginiai nudažomi Hario hematoksilinu, dehidratuojami didinant etanolio koncentraciją ir perkeliama į ksileną. Galiausiai mėginiai yra padengiami depeksu ir uždengiami stikleliu. Nudažyti pjūviai fotografuojami Olympus BX40 mikroskopu ir nusidažiusios RGC skaičiuojamos stereologine programine įranga, prijungta prie Nikon E600 mikroskopo.

2.2.4. Apoptotinių ląstelių nustatymas TUNEL metodu

Apoptotinių ląstelių nustatymui naudotas TUNEL (*angl.* terminal deoxynucleotidyl transferase (toliau – TdT) – mediated dUTP nick end-labeling) metodas pagal gamintojo rekomendacijas (ApopTag Peroxidase Kit S7101, Chemicon). Parafinizuotos retinos pjūviai veikiami ksileno ir etanolio deparafinizuojami ir rehidratuojami. Tada mėginiai nuplaunami Tris-HCl buferiniu tirpalu su 3 % jaučio serumo albuminu (toliau – JSA) ir du kartus praplaunami PBS. Mėginiai dedami į TUNEL reakcijos mišinį (TdT ir žymėti nukleotidai) 60 min. 37°C ir nuplaunami PBS. Tada inkubuojama su antikūnais, konjunguotais peroksidaze. DAB buvo naudojamas kaip substratas peroksidazei. Galiausiai pjūviai nudažomi Herio hematoksilinu dehidratuojami, padengiami depeksu ir uždengiami stikleliu. Nudažyti pjūviai fotografuojami Olympus BX40 mikroskopu.

2.2.5. Gallyas sidabrinis dažymas

Optinis nervas įkeliamas į OCT (*angl.* optimal cutting temperature) ir kriotomu supjaustomas į 5 µm storio pjūvius, kurie vėliau deparafinizuojami ir rehidratuojami. Mėginiai nuplaunami distiliuotu vandeniu ir įmerkiami 5 min. į 5 % perjodatinę rūgštį. Prieš pamerkiant mėginį į sidabro jodido tirpalą, plokštelė nuplaunama distiliuotu vandeniu. Po 1 min. plokštelė įmerkama į 0.5 % acto rūgšties tirpalą ir ten laikoma 2 x 5 min. Tada nuplaunama distiliuotu vandeniu ir panardinama į išryškinimo tirpalą ir

laikoma, kol mėginys įgaus šviesiai pilką/rudą spalvą. Išryškinus 5 min. laikoma 0.5 % acto rūgštyje ir praplaunama distiliuotu vandeniu. Mėginiai pamerkami 5min. į 0.1 % aukso chlorido tirpalą ir vėl praskalaujami vandeniu. Praplovus pjūviai laikomi 5 min. 1 % natriotiosulfato tirpale ir praskalaujami vandeniu. Tada 2 min. dažomi regos nerve esančių ląstelių branduoliai su nuclear fast red ir praplaunami vandeniu. Galiausiai mėginiai dehidratuojami, padengiami depeksu ir uždengiami stikleliu. Degeneruoti aksonai kaupia sidabro jonus, kurie detektuojami ir fotografuojami Olympus BX40 mikroskopu. Gautos nuotraukos analizuojamos Adobe Photoshop CS4 programa.

2.2.6. Ląstelių skaičiavimas stereologiniu mikroskopu

Skaičiavimams naudojamas Nikon E600 stereologinis mikroskopas ir stereoinvestigator 10.0 programinė įranga. Astrocitų ir mHtt turinčių ląstelių skaičiui nustatyti taikomas optical fractionator metodas, kur rėmelio poslinkio žingsnis buvo 1000 x 1000 μm , o rėmelio dydis 100 x 100 μm (astrocitams) ir 50 x 50 μm (mHtt lątelėms). Parafinizuotų akių pjūvių imunoreaktyvių RGC skaičiui nusakyti buvo naudojama ta pati programinė įranga.

2.2.7. Regos nervo imunofluorescencinis dažymas

Užšaldyti regos nervai panardinami į 0.05 M TBS, pH 7.4 tris kartus po 5 min. Tada 30 min. blokuojamos nespecifinės antikūnų prisijungimo vietos 10 % NGS-TBS-triton (0.5 %). Audiniai praplaunami 1 % NGS-TBS buferiniu tirpalu ir inkubuojami per naktį 4 °C temperatūroje su pelės anti-mHtt pirminiais antikūnais. Kitą dieną neprisitvirtinę antikūnai nuplaunami 3 x 5 min. 1 % NGS-TBS buferiniu tirpalu ir 3 h RT inkubuojami ožkos anti-pelės antikūnais, kojunguotais fluorescencinise žyme (AF 568). Mėginiai vėl 3 x 5 praplaunami 1 % NGS-TBS tirpalu ir inkubuojami pirminiais antikūnais (su triušio anti-GFAP arba triušio anti-Iba-1) per naktį 4 °C temperatūroje. Regos nervai išplaunami 3 x 5 min. 1 % NGS-TBS ir inkubuojami 3 h RT su ožkos anti-triušio antrinais antikūnais kojunguotais fluorescencinise žyme (AF 488). Audiniai dar karta išplaunami 1 % NGS-TBS tirpalu ir regos nervo branduoliai 30 min. RT dažomi 4',6-diamidino-2-fenilindolu (toliau – DAPI). Galiausiai mėginiai 2 x 5 min. praplaunami TBS buferiniu tirpalu, padengiami mowiol – glue klizais ir uždengiami stikleliu. Nudažyti regos nervai fotografuojami Olympus BX40 fluorescenciniu mikroskopu.

2.2.8. Imunoblotingas

Imunoblotingo analizei tinklainės ląstelės baltymai izoliuojami panaudojus T-PER baltymų išskyrimo iš audinių reagentus pagal gamintojo instrukciją. Įpilama T-PER reagento tinklainėms – 100 µL, dryžuotojo kūno baltymų išskyrimui – 200 µL ir homogenizuojama. Ląstelių nuolaužos nucentrifuguojamos 10 000 x g 5 min. prie 4 °C ir surenkamas supernatantas. Bradfordo metodu apskaičiuojama baltymų koncentracija. Paruošiami baltymų tirpalai, kiekviename mėginyje yra po 25 µg baltymo, 15 µL dažo ir vanduo. Mėginiai praleidžiami pro 15 % SDS PAAG elektroforezę 2 h, naudojant 200 V įtampą ir per naktį pernešami ant nitroceliuliozinės membranos naudojant 17 V įtampą. Kitą dieną membrana nudažoma Ponceau S dažais ir nuskanuojama. Tada praplaunama distiliuotu vandeniu ir 30 min. blokuojama 5 % neriebiais nugriebto pieno milteliais ištirpintais TBS-Tween (0.1 %). Tada per naktį 4 °C temperatūroje inkubuojama su pelės anti – Hsp70 antikūnais. Po to nuplaunama su TBS - 0.3 % Tween 20 ir 1 val. inkubuojama su antikūniais prieš pelės antigenus, konjuguotais su krienų peroksidaze (Yang *et. al.* 2008). Membrana išryškinama Imobilon™ Western rinkiniu ir analizuojama Scion Image įranga.

Membrana išplaunama 0.3 % PBS-Tween tirpalu ir inkubuojama 1h RT su triušio anti – LC3 antikūnais. Tada membrana nuplaunama 0.3 % PBS-Tween tirpalu ir žymima su antriniais antikūnais prieš triušio antigenus, konjuguotais su krienų peroksidaze. Membrana išryškinama Imobilon™ Western rinkiniu ir analizuojama Scion Image įranga. Baltymų įnešimo kontrolei buvo naudojamas pelės anti- α -tubulinas.

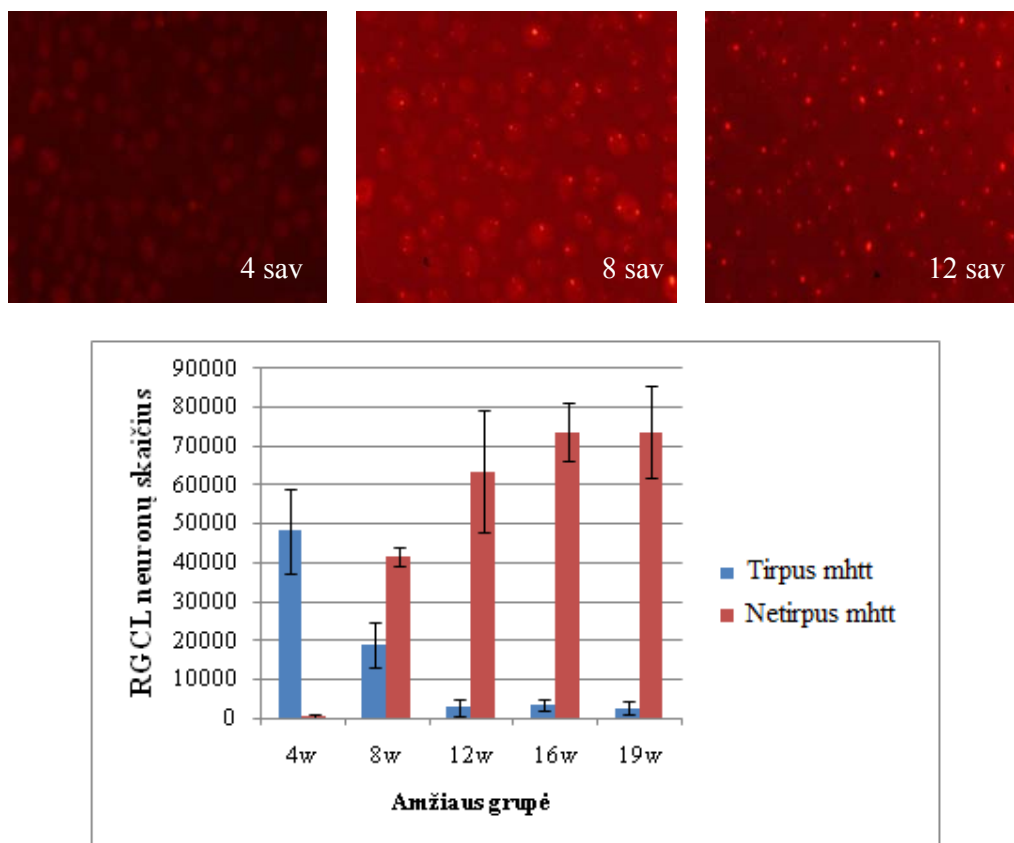
2.2.9. Statistinė rezultatų analizė

Eksperimentų rezultatų analizė buvo atlikta SPSS (v. 19.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) programine įranga. Buvo skaičiuoti duomenų aritmetiniai vidurkiai, koreliacijos koeficientai, vidutiniai kvadratiniai nuokrypiai bei skirtumų patikimumai.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

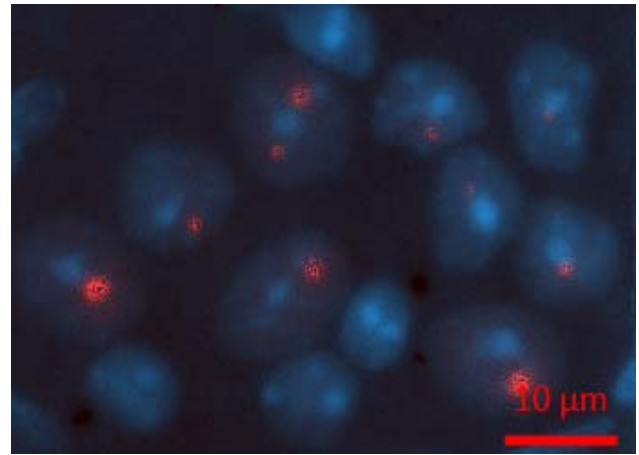
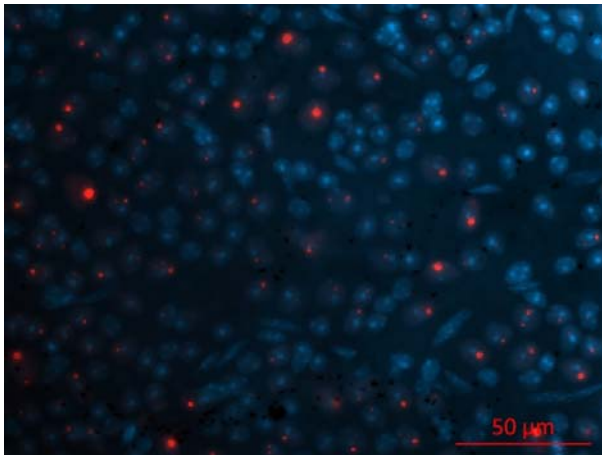
3.1. Mutavusio huntingtino baltymo depozitai tinklainės ganglinėse ląstelėse

Jaunose 4 sav. amžiaus R6/2 transgeninėse pelėse dominuoja tirpi mHtt forma, tačiau ligai progresuojant, tirpus baltymas kaupiasi ir sudaro agregatus ir vyresnio amžiaus pelėse dominuoja netirpi forma (Mann-Whitney U testas, $P > 0.05$, 7 pav.). Laukinio tipo pelėse mHtt depozitų nebuvo pastebėta.



7 pav. RGCL neuronų skaičius turintis tirpią ir netirpią mutavusio huntingtino baltymo formą

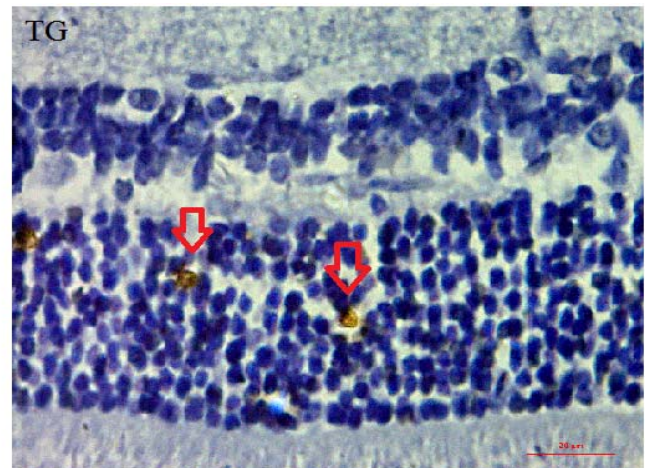
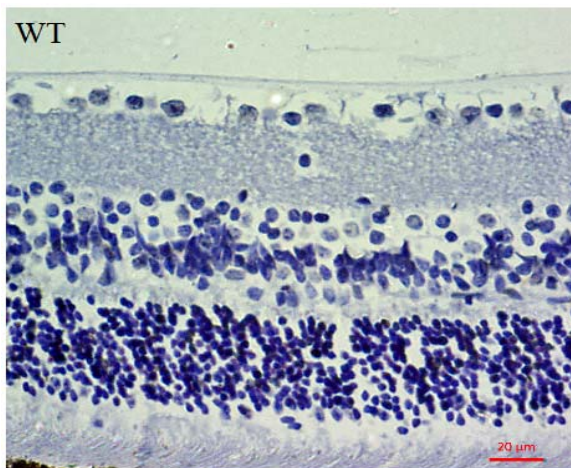
Literatūroje yra daug duomenų apie mHtt akumuliaciją dryžuotojo kūno neuronų branduoliuose, tačiau iki šiol nėra atlikta eksperimentų apie mHtt pasiskirstymą tinklainės ganglinėse ląstelėse. Nudažius ląstelių branduolius DAPI ir sujungus gautas nuotraukas, paaiškėjo, kad Huntingtono liga sergančių pelių RGC tiek tirpi, tiek agreguota baltymo formos kaupiasi branduolyje (8 pav.).



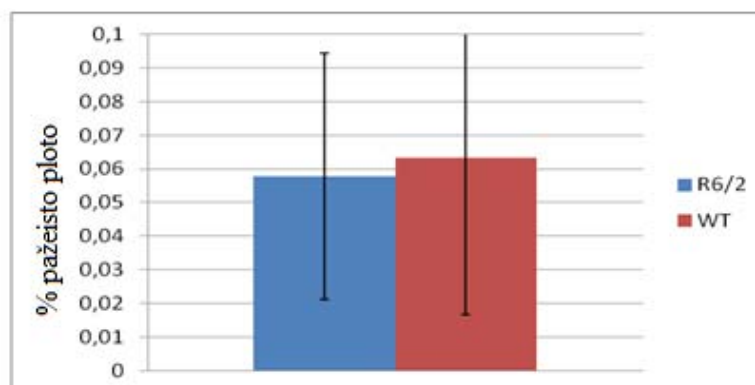
8 pav. Ląstelės branduolių (mėlyna, ryškesne mėlyna spalva yra nusidažęs branduolėlis) ir mutavusio huntingtino (raudona) kolokalizacija

3.2. Apoptotinių ląstelių detekcija tinklainėje ir pažeistų aksonų aptikimas regos nerve

mHtt baltymo depozitai buvo aptikti RGC, tačiau apoptotinių, TUNEL – teigiamų, ląstelių skaičius R6/2 pelių tinklainės ganglinių ląstelių sluoksnyje nesiskyrė nuo WT pelių. Tačiau buvo pastebėtas apoptotinių ląstelių skaičiaus padidėjimas fotoreceptorių sluoksnyje (9 pav.). Panašūs duomenys buvo gauti ir iš Gallyas sidabrinio dažymo, kurio metu juoda spalva nusidažo pažeisti RGC aksonai. Apskaičiavus pažeistą optinio nervo plotą ir palyginus gautus duomenis, R6/2 pelės nesiskyrė nuo WT pelių (10 pav.).



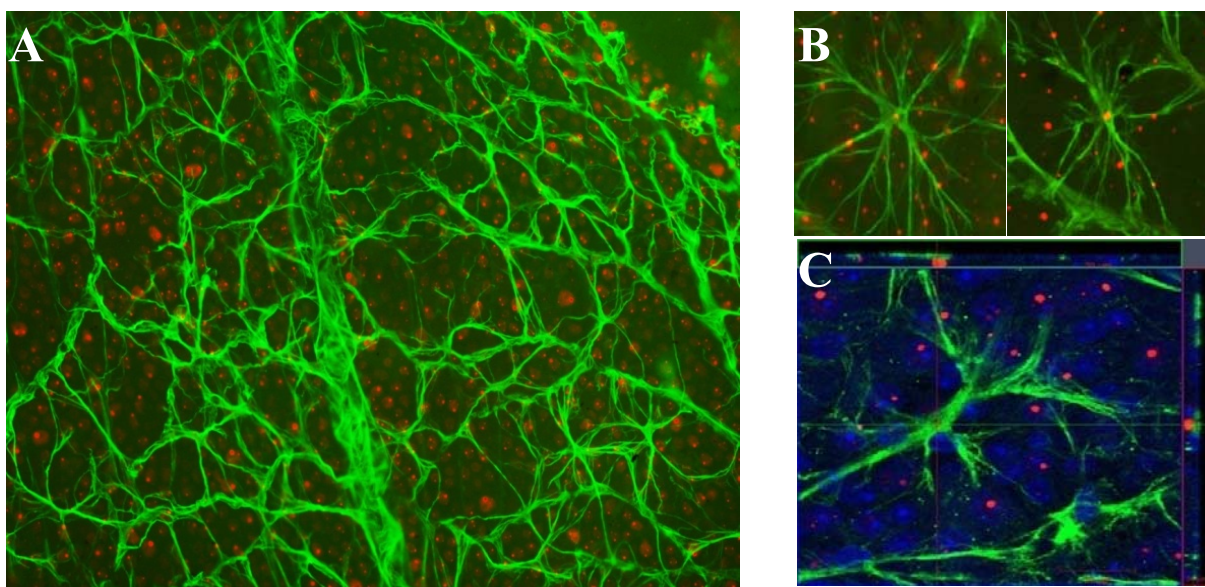
9 pav. TUNEL metodu nudažytos 18 sav. tinklainės. Raudonom rodyklėm pažymėtos apoptotinės ląstelės. Tinklainės ganglinių ląstelių sluoksnyje nebuvo aptiktos TUNEL-teigiamos ląstelės, tačiau fotoreceptorių sluoksnyje buvo pastebėtas apoptotinių ląstelių skaičiaus padidėjimas palyginti su laukinio tipo pelėmis.



10 pav. Aksonų degeneracija regos nerve

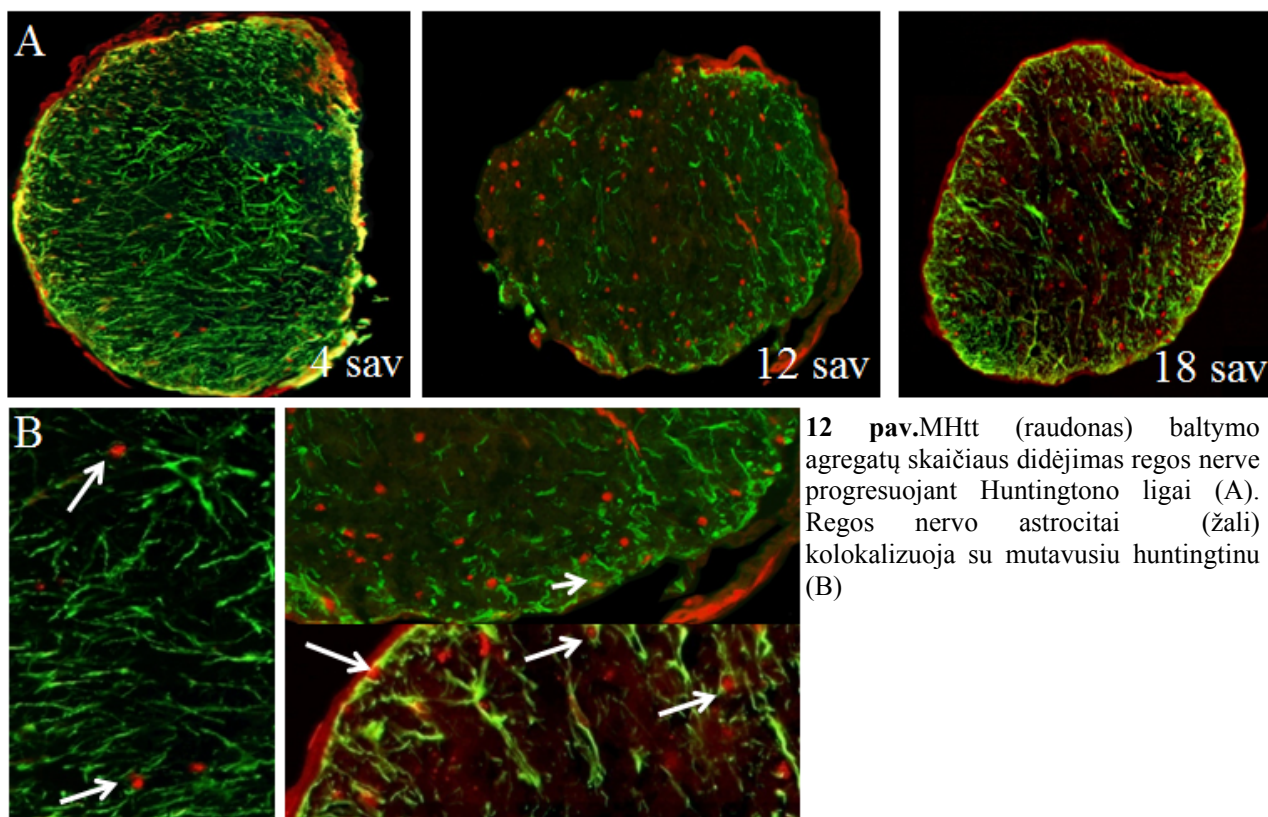
3.3. Mutavusio huntingtino baltymo akumuliacija tinklainės ir regos nervo astrocituose

Nudažius tinklainės astroцитus (žaliai) ir mHtt baltymą (raudonai) (11A pav.) pastebėta, kad keli astroцитai galimai kolokalizuoja su mHtt (11B pav.). Tačiau išnagrinėjus tinklainę trimatėje erdvėje konfokalinio mikroskopo, buvo aiškiai matoma, kad po astrocitu yra kita ląstelė, turinti mHtt, tačiau pats astroцитas mutavusio baltymo neturi (11C pav.).



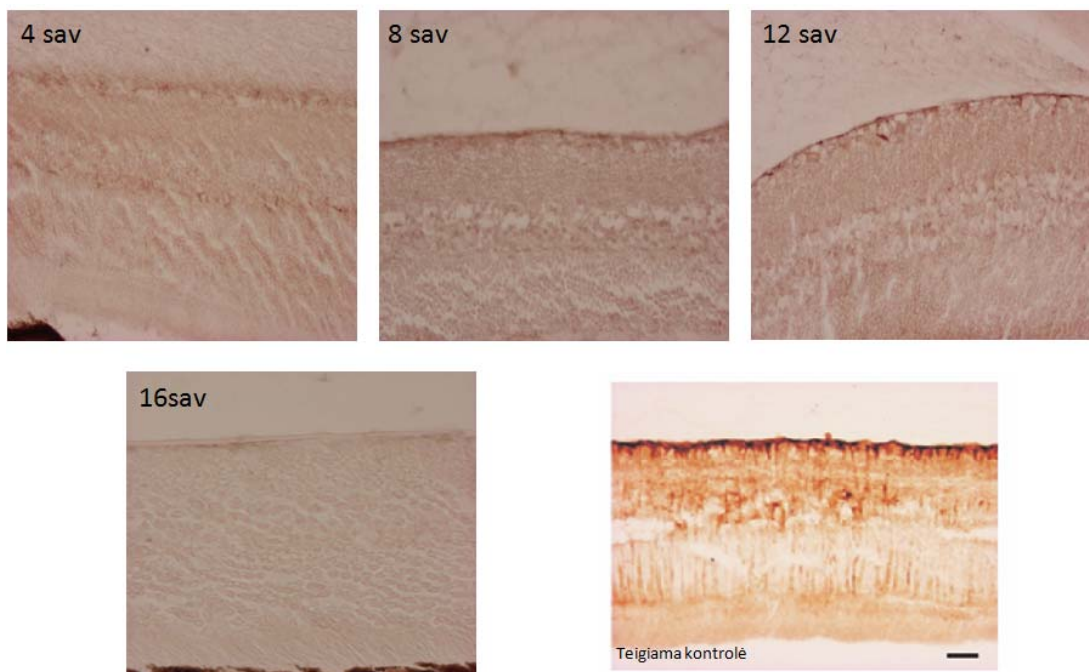
11 pav. Astroцитų ir mutavusio huntingtino baltymo imunofluorescentinis dažymas (A). Rastos kelios vietos, kur astroцитai kolokalizuoja su mHtt (B), tačiau konfokalinio mikroskopo darytoje nuotraukoje matoma, kad po astrocitu yra kita ląstelė turinti mHtt, tačiau pats astroцитas baltymo neturėjo (C). Mėlyna spalva nudažyti branduoliai

Taip pat kaip ir tinklainėje, regos nerve mutavęs huntingtino baltymas kaupiasi ligai progresuojant. Jaunose 4 sav. amžiaus pelėse mHtt aptinkami nedideli kiekiai, tačiau vyresnėse pelėse mHtt skaičius išauga (12A pav.). Optiniame nerve pagrindinės glijos ląstelės, supančios RGC aksonus, yra astrocitai. Mūlerio ląstelės čia neaptinkamos, todėl padidėja astroцитams tenkantis krūvis. Manoma, kad regos nervo astrocitai savo funkcija skiriasi nuo tinklainės astroцитų. Atlikta analize parodė, kad optinio nervo astroцитai, skirtingai nei tinklainės astroцитai, savo kūne kaupia mutavusį huntingtino baltymą (12B pav.).

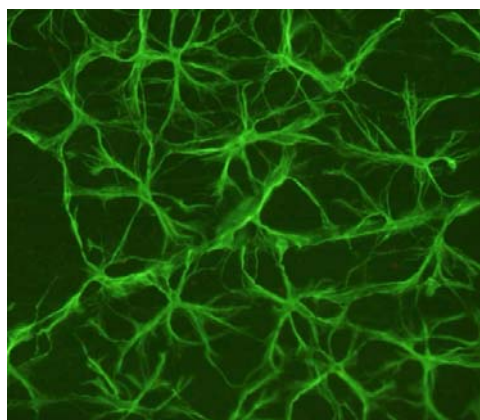
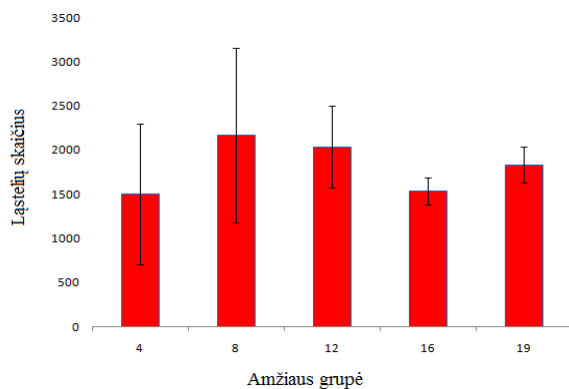


3.4. Glijos ląstelių pokyčių nustatymas

Pažymėjus parafinizuotas akies pjūvius anti-GFAP antikūnais, buvo mėginama aptikti Mūlerio ląstelių suaktyvėjimą, tačiau šiose ląstelėse nebuvo pastebėta pakitimų (13A pav.). Taip pat suskaičiavus tinklainėje esančius astroцитus ir juos palyginus tarp skirtingo amžiaus R6/2 pelių ir tarp WT ir transgeninių pelių, nebuvo pastebėta žymių pokyčių. Ligai progresuojant astroцитų struktūra išliko nepakitusi (14pav.). Taigi, glijozė, kuri yra būdinga esant nervinių ląstelių pažeidimams, nebuvo pastebėta.



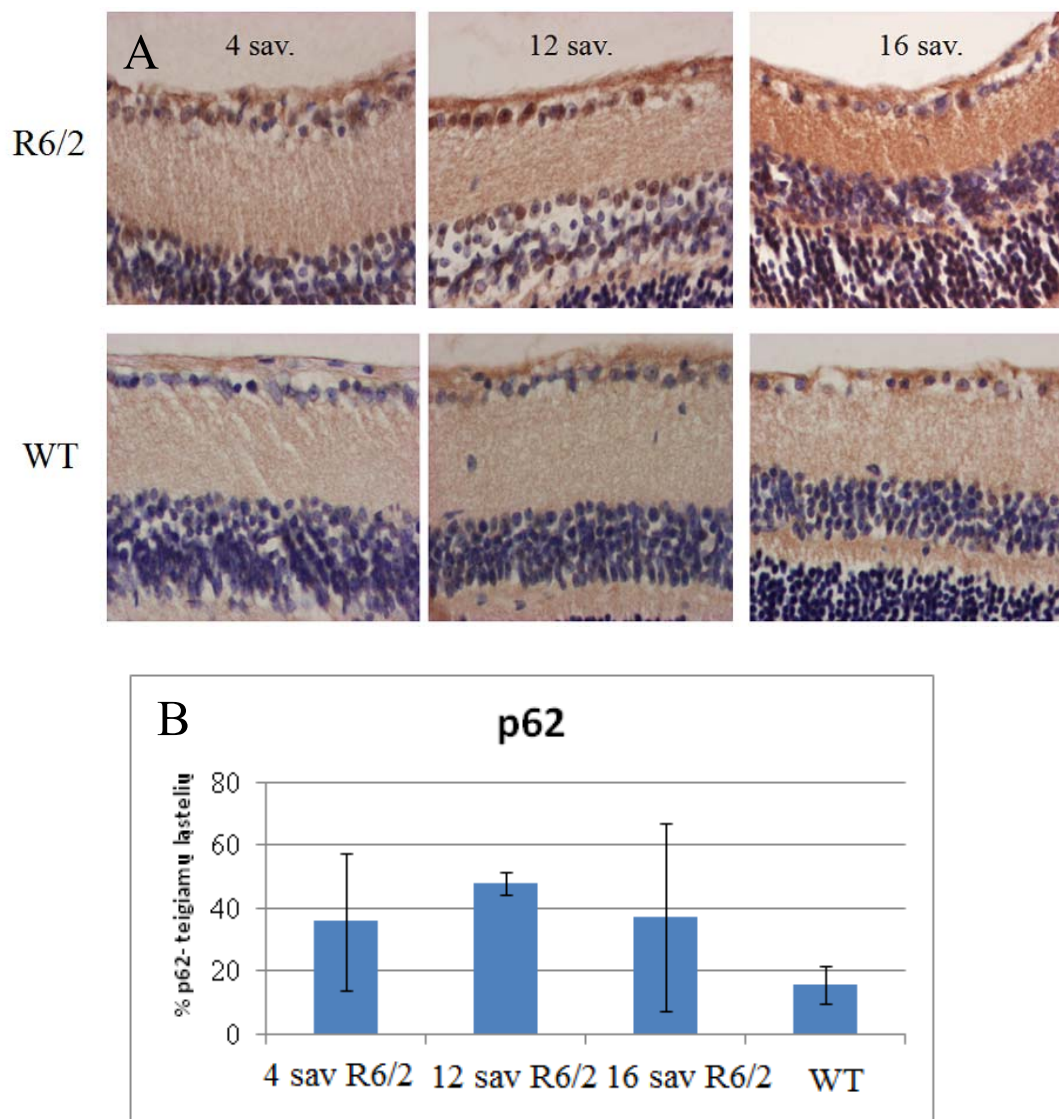
13 pav. Parafinizuotos tinklainės imunohistocheminis dažymas anti-GFAP antikūnais. Mūlerio ląstelių aktyvumas išliko nepakitęs ir nebuvo pastebėta glijozė, lyginant su teigiama kontrole (Cerebrinė išemija (Kalesnykas *et. al.* 2008)).



14 pav. Imunofluorescencinis visos tinklainės dažymas anti-GFAP antikūnais. Astrocitų struktūra ir skaičius išliko nepakitę palyginus tiek su laukinio tipo pelėmis, tiek skirtingo amžiaus R6/2 peles tarpusavyje.

3.5. Lamp2, ubikvitino ir p62 raiškos pokyčių nustatymas

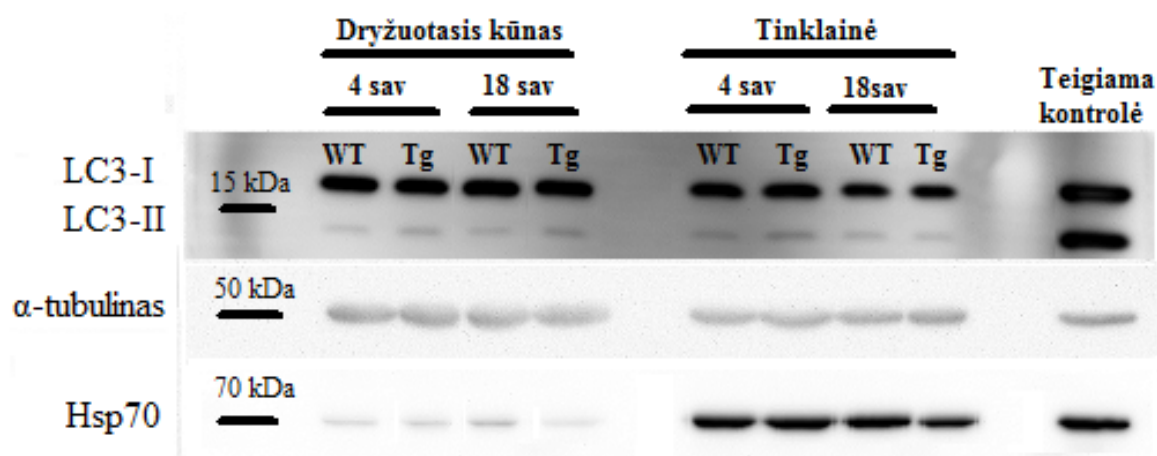
Lamp2 ir ubikvitino raiškos lygis tinklainės ganglinėse ląstelėse išliko nepakitęs. Buvo matoma variacija tarp skirtingo amžiaus pelių (senstant ubikvitino ir Lamp 2 raiškos lygis didėjo), tačiau lygiai tokia pati tendencija buvo matoma ir laukinio tipo pelėse. Tačiau p62 baltymo raiškos lygis buvo žymiai didesnis R6/2 pelėse negu WT (15 pav.). Tai rodo, kad ląstelėje esantis mutavęs huntingtino baltymas inicijuoja makroautofagijos procesą.



15 pav. A. Tinklainės imunohistocheminis dažymas anti-p62 antikūnais R6/2 ir WT pelėse. B. Transgeninėse pelėse p62 ekspresijos lygis ganglinėse ląstelėse yra žymiai aukštesnis negu WT pelėse.

3.6. Autofagijos markerių LC3 ir Hsp70 raiškos lygio nustatymas

Imunoblotingu buvo nustatomas LC3 ir Hsp70 raiškos lygis ląstelėje (16 pav.). Ląstelėje tirpi LC3 – I baltymo forma ekspresuojama konstitutyviai, o LC3 – II yra ekspresuojama tik baziniame lygyje, tačiau suaktyvinus autofagiją prie LC3 – I iš karto prisijungia PE ligandas ir per jį ši molekulė prisitvirtina prie autofagosomos. Taigi, normaliomis sąlygomis, kuomet ląstelė nebadauja ir jai netrūksta amino rūgščių baltymų sintezei, yra ekspresuojama tik tirpi LC3-I forma. Tačiau esant pažeidimams, badavimui ar susikaupus daug klaidingų baltymų, kurių kiti mechanizmai negali likviduoti, suaktyvėja autofagijos mechanizmas ir imama ekspresuoti LC3-II forma. LC3 ir Hsp70



16 pav. Dryžuotojo kūno ir tinklainės imunoblotingas nustatant LC3 ir Hsp70. α-tubulinas buvo naudojamas kaip baltymų įnešimo kontrolė. Teigiama kontrolė buvo ARPE-19 ląstelės paveiktos bofilomusinu

imunoblotingai buvo pakartotinai atlikti 3 kartus su skirtingų pelių tinklainėmis. Duomenys buvo statistiškai apdoroti SPSS programa (v. 19.0, SPSS Inc., JAV). Tiek dryžuotame kūne tiek tinklainėje LC3-I, LC3-II ir Hsp70 pokyčiai nebuvo reikšmingi lyginant skirtumus tarp atskirų amžiaus grupių ir tarp laukinio tipo ir transgeninių pelių (Mann-Whitney U testas, visu $P > 0.05$). Kadangi LC3-II molekulės raiškos lygis ląstelėje buvo nepakitęs, o p62 baltymo raiška buvo suintensyvėjusi, galima manyti, kad ląstelėje autofagijos mechanizmas tik inicijuojamas, bet tolesnė jo eiga yra sutrikusi.

IŠVADOS

1. Jaunų pelių (4sav.) nervinėms ląstelėms būdingas tirpaus mHtt baltymo kaupimasis, o senose dominuoja baltymo agregatai
2. Tinklainės ganglinės ląstelės išgyvena, nors mHtt ir ekspresuojamas branduolyje
3. Huntingtono ligai progresuojant nebuvo pastebėta jokių glijos ląstelių pokyčių
4. Tinklainės astrocitai savo kūne neturi mHtt baltymo, o regos nervo astrocitai kaupia baltymą somoje
5. Huntingtono liga nesuaktyvina šaperonų reguliuojamos autofagijos
6. Transgeninėse pelėse p62 baltymo koncentracija yra žymiai didesnė negu laukinio tipo pelėse
7. Tuo tarpu LC3-II molekulės raiškos lygis transgeninių pelių tinklainėse tik nežymiai skiriasi nuo laukinio tipo pelių

PASTABA. Dalis tyrimų medžiagos pristatyta trečiojoje mokslinėje Lietuvos Neuromokslų asociacijos konferencijoje (1 priedas) ir „The Association for Research in Vision and Ophtalmology“ kasmetinėje konferencijoje, Fort Lauderdale, Majamyje, JAV (2 priedas).

Symantas Ragauskas

LITERATŪROS SĄRAŠAS

- Albin, R.L.; Young, A.B.; Penney J.B. (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends in Neuroscience*, 12:366–375.
- Andrew, S.E.; Goldberg, Y.P.; Kremer, B.; Teleniu, H.; Theilmann, J.; Adam, S.; Starr, E.; Squitieri, F.; Lin, B.; Kalchman, A.; Graham, R. K.; Hayden, M. (1993). The relationship between trinucleotide (CAG) repeat length and clinical features of Huntington's disease. *Nature Genetics*, 4:398-403.
- Arrasate, M.; Mitra, S.; Schweitzer, E.S.; Segal, M.R.; Finkbeiner, S. (2004). Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature*, 431:805–810.
- Baltrušaitis, L.; Lubyte, J.; Slavėnienė, L. I.; Vitkus, A.; Vitkus, A. (1990) Histologija. Mokslas. Vilnius.
- Bjorkoy, G.; Lamark, T.; Brech, A. (2005). p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *Journal of Cell Biology*, 171:603–614.
- Blankson, H.; Holen, I.; Seglen P. O. (1995). Disruption of the cytokeatin cytoskeleton and inhibition of hepatocytic autophagy by okadaic acid. *Experimental Cell Research*, 218:522–30.
- Brandt, J.; Strauss, M. E.; Larus, J.; Jensen, B.; Folstein, S.E.; Folstein, M.F. (1984). Clinical correlates of dementia and disability in Huntington's disease. *Journal of Clinical Neuropsychology*, 6:401–412.
- Chiu, E.; Alexander L. (1982). Causes of death in Huntington's disease. *Medical Journal of Australia*, 1:153.
- Chong, S.S.; Almqvist, E.; Telenius, H.; LaTray, L.; Nichol, K.; Bourdelat-Parks, B.; Goldberg, Y.P.; Haddad, B.R.; Richards, F.; Sillence, D.; Greenberg, C.R.; Ives, E.; Van den Engh, G.; Hughes, M. R.; Hayde, M. R. (1997). Contribution of DNA sequence and CAG size to mutation frequencies of intermediate alleles for Huntington disease: evidence from single sperm analyses. *Human Molecular Genetics*, 6(2):301-309.
- Danbolt, N. C. (2001). Glutamate uptake. *Progress in neurobiology*, 65(1):1-105.
- Dragatsis, I.; Levine, M. S.; Zeitlin, S. (2000). Inactivation of Hdh in the brain and testis results in progressive neurodegeneration and sterility in mice. *Nature Genetics*, 26:300–306.

- Duyao, M. P.; Auerbach, A. B.; Ryan, A.; Persichetti, F.; Barnes, G. T.; McNeil, S. M.; Ge, P.; Vonsattel, J. P.; Gusella, J. F.; Joyner, A. L.; MacDonald, M.E. (1995). Inactivation of the mouse Huntington's disease gene homolog Hdh. *Science*, 269:407–410.
- Edwards, R.B. (1994). Biosynthesis of retinoic acid by Müller cells: a model for the central nervous system? *Progress in Retinal and Eye Research*, 13:231-242
- Fernald, R. D. (1997). The Evolution of Eyes. *Brain, Behaviour and Evolution*, 50(4): 253–259.
- Gauthier, L. R.; Charrin, B.C.; Borrell-Pages, M.; Dompierre, J.P.; Rangone, H.; Cordelieres, F.P.; De Mey, J.; MacDonald, M.E.; Lessmann, V.; Humbert, S.; Saudou, F. (2004). Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell*, 118:127–138.
- Gervais, F. G.; Singaraja, R.; Xanthoudakis, S.; Gutekunst, C.A.; Leavitt, B.R.; Metzler, M.; Hackam, A. S.; Tam, J.; Vaillancourt, J. P.; Houtzager, V.; Rasper, D. M.; Roy, S.; Hayden M.R., Nicholson D.W. (2002). Recruitment and activation of caspase-8 by the Huntingtin-interacting protein Hip-1 and a novel partner Hippi. *Nature Cell Biology*, 4:95–105.
- Gervais, F. G.; Singaraja, R.; Xanthoudakis, S.; Gutekunst, C.A.; Leavitt, B. R.; Metzler, M.; Hackam, A. S.; Tam J.; Vaillancourt, J. P.; Houtzager, V.; Rasper, D. M.; Roy, S.; Hayden, M. R.; Nicholson, D.W. (2002). Recruitment and activation of caspase-8 by the Huntingtin-interacting protein Hip-1 and a novel partner Hippi. *Nature Cell Biology*, 4:95–105.
- Gil, J. M.; Rego, A. C. (2008). Mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease. *European Journal of Neuroscience*, 27:2803-2820.
- Gil, J. M.; Rego, A. C. (2009). The R6 lines of transgenic mice: A model for screening new therapies for Huntington's disease. *Brain Research Reviews*, 59:410– 431.
- Gunawardena, S.; Goldstein, L.S. (2005). Polyglutamine diseases and transport problems: deadly traffic jams on neuronal highways. *Archives of Neurology*, 62:46–51.
- Hershko, A.; Ciechanover, A. (1998). Ubiquitin system. *Annual Review of Biochemistry*, 67:425-479.
- Ho, L.W.; Carmichael, J.; Swart, J.; Wyttenbach, A.; Rankin, J.; Rubinsztein, D.C. (2001). The molecular biology of Huntington's disease. *Psychological Medicine*, 31:3–14.
- Huntington's Disease Collaborative Research Group (1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell*, 72(6):971-983.
- Ichimura, Y; Komatsu, M. (2010). Selective degradation of p62 by autophagy. *Seminars in Immunopathology*, 32:431–436.
- Yanai, A.; Huang, K.; Kang, R.; Singaraja, R. R.; Arstikaitis, P.; Gan, L.; Orban, P.C.; Mullard, A.; Cowan, C.M.; Raymond, L. A.; Drisdel, R. C.; Green, W. N.; Ravikumar, B.; Rubinsztein, D. C.; El-Husseini, A.; Hayden, M.R. (2006). Palmitoylation of huntingtin by HIP14 is essential for its trafficking and function. *Nature Neuroscience*, 9:824–831.

- Yang, Y.; Iang, Z.; Gu, Z.; Qin, Z. (2005). Molecular mechanism and regulation of autophagy. *Acta Pharmacologica Sinica*, 26(12):1421–1434.
- Young, A. B. (2003). Huntingtin in health and disease. *Journal of Clinical Investigation*, 111: 299–302.
- Jana, N.R.; Zemskov, E. A.; Wang, G. H.; Nukina, N. (2001). Altered proteasomal function due to the expression of polyglutamine-expanded truncated N-terminal huntingtin induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release. *Human Molecular Genetics*, 10:1049–1059.
- Jensen, P.; Sorensen, S.A.; Fenger, K.; Bolwig, T.G; (1993). A study of psychiatric morbidity in patients with Huntington's disease, their relatives, and controls. Admissions to psychiatric hospitals in Denmark from 1969 to 1991. *British Journal of Psychiatry*, 163:790–797.
- Jeon, C.; Strettoi, E.; Masland, R. H. (1998). The major cell populations of the mouse retina. *The Journal of Neuroscience*, 18(21):8936–8946.
- Kabeya, Y.; Mizushima, N.; Yamamoto, A.; Ohsumi, Y.; Yoshimori, T. (2004). LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *Journal of Cell Science*, 117:2805–12.
- Kalesnykas, G.; Tuulos, T.; Ussitalo, H.; Jolkkonen, J; (2008). Neurodegeneration and cellular stress in the retina and optic nerve in rat cerebral ischemia and hypoperfusion model. *Neuroscience*, 155(3):937-947.
- Kaltenbach, L.S.; Romero, E.; Becklin, R.R.; Chettier, R.; Bell, R.; Phansalkar, A.; Strand, A.; Torcassi, C.; Savage, J.; Hurlburt, A.; Cha, G.H.; Ukani, L.; Chepanoske, C.L.; Zhen, Y.; Sahasrabudhe, S.; Olson, J.; Kurschner, C.; Ellerby, L.M.; Peltier, J.M.; Botas, J.; Hughes, R.E. (2007). Huntingtin interacting proteins are genetic modifiers of neurodegeneration. *PLoS Genetics*, 3:e82.
- Karpulj, M.V.; Garren, H.; Slunt, H.; Price, D.L.; Gusella, J.; Becher, M.W., Steinman L. (1999). Transglutaminase aggregates huntingtin into nonamyloidogenic polymers, and its enzymatic activity increases in Huntington's disease brain nuclei. *PNAS*, 96:7388–7393.
- Kassubek, J.; Gaus, W.; Landwehrmeyer, G.B. (2004). Evidence for more widespread cerebral pathology in early HD: an MRI-based morphometric analysis. *Neurology*, 62:523–524.
- Kegel, K. B.; Meloni, A.R.; Yi, Y.; Kim, Y. J.; Doyle, E.; Cuiffo, B. G.; Sapp, E.; Wang, Y.; Qin, Z. H.; Chen, J. D.; Nevins, J. R.; Aronin, N.; DiFiglia, M. (2002). Huntingtin is present in the nucleus, interacts with the transcriptional corepressor C-terminal binding protein, and represses transcription. *Journal of Biological Chemistry*, 277:7466–7476.
- Kirisako, T.; Ichimura, Y.; Okada, H.; Kabeya, Y.; Mizushima, N.; Yoshimori, T. (2000). The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for

- autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *Journal of Cell Biology*, 151:263–76.
- Klotz, S. A.; Penn, C. C.; Negvesky, G. J.; Butrus, S. I. (2000). Fungal and parasitic infections of the eye. *Clinical microbiology reviews*, 13(4): 662–685.
- Korolchuk, V. I.; Menzies, F. M.; Rubinsztein, D. C. (2009). A novel link between autophagy and the ubiquitin – proteasome system. *Autophagy*, 5(6):862-863.
- Kuemmerle, S.; Gutekunst, C. A.; Klein, A. M.; Li, X. J.; Li, S. H.; Beal, M. F.; Hersch, S.M.; Ferrante, R.J. (1999). Huntington aggregates may not predict neuronal death in Huntington's disease. *Annals of Neurology*, 46:842–849.
- Leavitt, B.R.; Guttman, J. A.; Hodgson, J. G.; Kimel, G. H.; Singaraja, R.; Vogl, A.W.; Hayden, M.R. (2001). Wild-type huntingtin reduces the cellular toxicity of mutant huntingtin in vivo. *American Journal of Human Genetics*, 68:313–324.
- Luo, S.; Vacher, C.; Davies, J. E.; Rubinsztein, D.C. (2005). Cdk5 phosphorylation of huntingtin reduces its cleavage by caspases: implications for mutant huntingtin toxicity. *Journal of Cell Biology*, 169:647–656.
- Mangiarini, L.; Sathasivam, K.; Seller, M.; Cozens, B.; Harper, A.; Hetherington, C.; Lawton, M.; Trotter, Y.; Lehrach, H.; Davies, S.W.; Bates, G.P. (1996). Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell*, 87:493–506.
- Maragakis, N. J.; Rothstein, J. D. (2006.) Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Neurology*, 2(12):679-689.
- Moscat, J.; Diaz-Meco, M. T.; Albert, A.; Campuzano, S. (2006). Cell signaling and function organized by PB1 domain interactions. *Molecular Cell*, 23:631–640.
- Pedersen, M.; Larsen, A.; Stoltenberg, M.; Penkowa, M. (2009). Cell death in the injured brain: Roles of metallothioneins. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, 44:1–27.
- Penney, J. B.; Young, A. B.; Shoulson, I.; Starosta-Rubenstein, S.; Snodgrass, S. R.; Sanchez-Ramos, J.; Ramos-Arroyo, M.; Gomez, F.; Penchaszadeh, G.; Alvir, J.; Esteves, J.; DeQuiroz, I.; Marsol, N.; Moreno, H.; Conneally, P.M.; Bonilla, E.; Wexler, N.S. (1990). Huntington's disease in Venezuela: 7 years of follow-up on symptomatic and asymptomatic individuals. *Movement Disorders*, 5:93–99.
- Rangone, H.; Poizat, G.; Troncoso, J.; Ross, C.A.; MacDonald, M.E.; Saudou, F.; Humbert, S. (2004). The serum- and glucocorticoid-induced kinase SGK inhibits mutant huntingtin-induced toxicity by phosphorylating serine 421 of huntingtin. *European Journal of Neuroscience*, 19:273–279.

- Ross, C. A.; Margoli, R. L.; Rosenblatt, A.; Ranen, N. G.; Becher, M. W.; Aylward, E. (1997). Reviews in molecular medicine: Huntington disease and the related disorder, dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA). *Medicine*, 76:305–338.
- Simard, M.; Nedergaard, M. (2004). The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience*, 129(4):877-896.
- Steffan, J. S.; Kazantsev, A.; Spasic-Boskovic, O.; Greenwald, M.; Zhu, Y. Z.; Gohler, H.; Wanker, E. E.; Bates, G. P.; Housman, D. E.; Thompson, L. M.; (2000). The Huntington's disease protein interacts with p53 and CREB binding protein and represses transcription. *PNAS*, 97:6763–6768.
- Stott, K.; Blackburn, J. M.; Butler, P. J.; Perutz, M. (1995). Incorporation of glutamine repeats makes protein oligomerize: implications for neurodegenerative diseases. *PNAS*, 92:6509–6513.
- Sun, B.; Fan, W.; Balciunas, A.; Cooper, J.K.; Bitan, G.; Steavenson, S.; Denis, P. E.; Young, Y.; Adler, B.; Daugherty, L.; Manoukian, R.; Elliott, G.; Shen, W.; Talvenheimo, J.; Teplow, D. B.; Haniu, M.; Haldankar, R.; Wypych, J.; Ross, C. A.; Citron, M.; Richards, W.G. (2002). Polyglutamine repeat length-dependent proteolysis of huntingtin. *Neurobiology of Disease*, 11:111–122.
- Takano, T.; Tian, G.F.; Peng, W.; Lou, N.; Libionka, W.; Han, X.; Nedergaard, M. (2006). Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow. *Nature neuroscience*, 9(2):260-7.
- Tanida, I.; Ueno, T.; Kominami, E. (2004). LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(12):2503-18.
- van Dijk, J. G.; van der Velde, E. A.; Roos, R. A.; Bruyn, G.W. (1986) Juvenile Huntington disease. *Human Genetics*, 73:235–239.
- Vonsattel, J. P.; DiFiglia, M. (1998). Huntington disease. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 57:369–384.
- Vonsattel, J. P.; Myers, R. H.; Stevens, T. J.; Ferrante, R. J.; Bird, E. D.; Richardson, E. P. Jr. (1985). Neuropathological classification of Huntington's disease. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 44:559–577.
- Warby, S. C.; Chan, E. Y.; Metzler, M.; Gan, L.; Singaraja, R. R.; Crocker, S. F.; Robertson, H. A.; Hayden, M.R. (2005). Huntingtin phosphorylation on serine 421 is significantly reduced in the striatum and by polyglutamine expansion in vivo. *Human Molecular Genetics*, 14:1569–1577.
- Weidberg, H.; Shvets, E.; Shpilka, T.; Shimron, F.; Shinder, V.; Elazar, Z. (2010). LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *The EMBO Journal*, 29:1792 – 1802.
- Wytenbach, A.; Carmichael, J.; Swartz, J.; Furlong, R.A.; Narain, Y.; Rankin, J.; Rubinsztein, D.C. (2000). Effects of heat shock, heat shock protein 40 (HDJ-2), and proteasome inhibition on protein aggregation in cellular models of Huntington's disease. *PNAS*, 97:2898–2903.

- Zhang, Y.; Leavitt, B. R.; van Raamsdonk, J. M.; Dragatsis, I.; Goldowitz, D.; MacDonald, M.E.; Hayden, M. R.; Friedlander, R.M. (2006). Huntingtin inhibits caspase-3 activation. *EMBO Journal*, 25:5896–5906.
- Zuccato, C.; Tartari, M.; Crotti, A.; Goffredo, D.; Valenza, M.; Conti, L.; Cataudella, T.; Leavitt, B.R.; Hayden, M.R.; Timmusk, T.; Rigamonti, D.; Cattaneo, E. (2003). Huntingtin interacts with REST / NRSF to modulate the transcription of NRSE-controlled neuronal genes. *Nature Genetics*, 35:76–83.

1 PRIEDAS

Mutavęs Huntingtono baltymas nesukelia tinklainės ganglinių ląstelių ir astrocitų žūties

S. Ragauskas^{1,2}, A-M. Haapaniemi², S. Rönkkö², L. Podracka², J. Puranen², J. Puoliväli³, J.M. Yrjänheikki³, G. Kalesnykas²

¹Vilniaus Gedimino technikos universitetas, Chemijos ir bioinžinerijos katedra

²Rytų Suomijos universitetas, Oftalmologijos katedra

³Cerebricon Ltd/Charles River Labs

Huntingtono chorėjos (HC) metu žūva dryžuotojo kūno corpus striatum neuronai. Darbo tikslas - ištirti ar 1) tinklainės ganglinėse ląstelėse (TGL) ir astrocituose kaupiasi mutavęs Huntingtino (mHtt) baltymas, 2) šios ląstelės žūva progresuojant HC.

Tyrimams panaudotos 4-19 savaičių laukinio tipo (LT) ir R6/2 transgeninės pelės. Tinklainė ir optinis nervas ištirti histologiškai, taip pat imunohistocheminiu, biocheminiu bei imunoblotingo metodais.

Jaunų pelių (4 savaičių grupė) TGL dominuoja tirpi mHtt forma. Ligai progresuojant, matoma baltymo agregacija, tačiau mHtt depozitai nesukelia TGL ir astrocitų žūties. Nikotinamidadeninukleotido kiekis, parodantis ląstelių metabolizmo lygį tinklainėje, optiniame nerve ir keturkalnio viršutiniuose kalneliuose superior colliculi, nesiskiria LT ir R6/2 transgeninėse pelėse. Ligai progresuojant, suaktyvėja proteosominis ląstelės baltymų perdirbimo mechanizmas. Tuo tarpu autofagija išlieka nepakitusi.

mHtt depozitai kaupiasi TGL, optinio nervo astrocituose ir makrofaguose. Didėjant mHtt depozitų sankaupoms, TGL metabolinis aktyvumas išlieka nepakitęs. HC nesukelia TGL žūties.

2 PRIEDAS

Insoluble aggregates of mutant Huntingtin protein do not cause degeneration of retinal ganglion cells in R6/2 mice

S. Ragauskas^{1,2,3}, L. Podracka², S. Rönkkö², J. Puranen², A-M. Haapaniemi², T. Heikkinen⁴, O. Kontkanen⁴, J. Puoliväli⁴, J.M. Yrjänheikki⁴, G. Kalesnykas²

¹Chemistry and bioengineering laboratory, Faculty of Fundamental Sciences, Vilnius Gediminas Technical university, Vilnius, Lithuania; ²Department of Ophthalmology, Institute of Clinical Medicine, University of Eastern Finland, Kuopio, Finland; ; ³State Research institute for Innovative Medicine, Vilnius, Lithuania; ⁴Cerebricon Ltd/Charles River Labs, Kuopio, Finland

Purpose: To study mutant Huntingtin protein (mHtt) accumulation and its clearance in retinal ganglion cells (RGCs) of R6/2 mice during the disease progression.

Methods: Four to 19-week-old R6/2 mice and their wild-type (WT) littermates were used. Retinal wholemounts, paraffin-embedded retinal and frozen optic nerve sections were processed for histology, immunohistochemistry and TUNEL-based staining. The total number of RGC layer (RGCL) cells, glial fibrillary acidic protein (GFAP)-positive retinal astrocytes and RGCL cells containing mHtt were counted using stereology. The protein levels of heat shock protein 70 kDa (HSP70), p62 and LC3 were compared using Western blotting. Metabolic state of retinal cells, optic nerve and superior colliculus were assessed by measuring NAD⁺, NADH and total NAD levels using resazurin-based assay.

Results: At young age (4 weeks) mainly soluble form of mHtt was present in neurons of RGCL, whereas at the age of 8, 12 and 16 weeks the vast majority of neurons had aggregated form of mHtt. R6/2 and WT mice did not differ in TUNEL labeling of RGCL or the total number of RGCL neurons and GFAP-positive astrocytes. Soluble mHtt was found in GFAP-positive astrocytes and Iba-1-positive macrophages of optic nerves, but not in GFAP-positive retinal astrocytes. Western blotting of retinas showed an increased protein level of p62, but decreased HSP70 and a single 16 kDa band of LC3.

Conclusions: Cellular accumulation of the aggregated form of mHtt increases with age, but does not induce autophagy or cause degeneration of retinal astrocytes and RGCL neurons. Metabolic state of retinal cells, optic nerve and cells from superior colliculus is unaltered even at the late stage of the disease.