

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**

**Vliv signalizace extracelulárního adenosinu na model Huntingtonovy  
choroby v *Drosophila melanogaster***

Diplomová práce

**Bc. Tomáš Filip**

Školitel: prof. RNDr. Michal Žurovec CSc

České Budějovice 2017

Filip, T., 2017: Vliv signalizace extracelulárního adenosinu na model Huntingtonovy choroby v *Drosophila melanogaster*. [The effect of extracellular adenosine signaling on Huntington's disease model in *Drosophila melanogaster*. Mgr. Thesis, in Czech.] – 44 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Anotace:**

Adenosine is a ubiquitous metabolite with multiple physiological functions in organisms. In this thesis, I studied the effect of extracellular adenosine on Huntington's disease (HD) model *Drosophila melanogaster*. I show that extracellular Adenosine signaling mitigates HD pathology by observing three main types of symptoms of the disease in *Drosophila*. The results suggest that the mechanism involves *Drosophila melanogaster* adenosine receptor signaling.

Tato práce vznikla za podpory Grantové agentury ČR, číslo grantu P305/14-27816S.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 19. 4. 2017

.....

Tomáš Filip

## **Poděkování**

Na tomto místě bych chtěl poděkovat zejména svému školiteli, prof. Michalu Žurovcovi, za vedení práce, odborné rady, trpělivost a věnovaný čas při konzultacích. Dále bych chtěl poděkovat všem členům laboratoře, především Yu-Shien Linovi, který mi svými radami pomáhal během mé práce. V neposlední řadě bych rád poděkoval hlavně celé své rodině za podporu při mém studiu, bez které bych nemohl tuto práci uskutečnit.

V Českých Budějovicích dne 19. 4. 2017

.....

Tomáš Filip

## Obsah

1	Literární přehled.....	- 1 -
1.1	Adenosin.....	- 1 -
1.1.1	Signalizace, metabolismus a transport adenosinu .....	- 1 -
1.1.2	Mozek a adenosin.....	- 3 -
1.2	Huntingtonova choroba .....	- 5 -
1.3	Modelové organismy a HD.....	- 7 -
2	Cíle práce.....	- 10 -
3	Materiál a metody.....	- 11 -
3.1	Použité linie <i>Drosophila melanogaster</i> .....	- 11 -
3.2	Schéma a podmínky křížení .....	- 12 -
3.3	RNA extrakce a reverzní transkripce.....	- 14 -
3.4	qRT PCR a měření genové exprese .....	- 15 -
3.5	Analýza přežívání potomstva do dospělců .....	- 16 -
3.6	Analýza neurodegenerace.....	- 16 -
3.7	Test motorických funkcí.....	- 17 -
3.8	Chovné médium.....	- 18 -
4	Seznam literatury.....	- 19 -

Následující pasáže o rozsahu stran 19-33 a 40 obsahují utajované skutečnosti a jsou obsaženy pouze v archivovaném originále bakalářské práce uloženém na Přírodovědecké fakultě JU.

# 1 Literární přehled

## 1.1 Adenosin

### 1.1.1 Signalizace, metabolismus a transport adenosinu

Signální dráha metabolitu adenosinu (Ado) se řadí k evolučně konzervovaným procesům napříč živočišnou říší, podobně jako vrozené imunitní reakce, kontrola buněčného dělení nebo živočišný metabolismus.

Adenosin je všudypřítomný nukleosid sestávající se z adeninu navázaného k sacharidu ribofuranosu, tyto komponenty jsou spojeny  $\beta$ -N<sub>6</sub>-glykosidickou vazbou. Fyziologická koncentrace extracelulárního Ado v živočišných tkáních je relativně nízká. U *Drosophila* se uvádí, že průměrná hladina Ado se pohybuje od 60 do 300 nM (Doleželová et al., 2007), stejně tak i u člověka, kde se hodnoty pohybují okolo 50 až 400 nM. Avšak v případech stresových podmínek se může hladina Ado zvýšit až na mikromolární hladinu (Fredholm, 2010).

Ado může v organismu vznikat mnoha nezávislými cestami jako například: při apoptóze buněk, uvolněním ATP/ADP z buněk a jejich následnou defosforylací, rozkladem cAMP nebo hydrolýzou adenosylhomocysteinu (Hershfield et al., 1985). Ačkoliv tyto procesy mohou být za určitých podmínek důležitým zdrojem Ado, hlavní fyziologický zdroj představuje defosforylace AMP pomocí 5'-nukleosidázy. Ať už Ado vznikne jakoukoli cestou, jeho poločas rozpadu je relativně krátký, a to od 1 do 10 sekund (Jacobson a Gao, 2006). Fyziologická extracelulární koncentrace Ado se udržuje balancováním mezi jeho uvolňováním buňkami a recyklací pro syntézu ATP. Tato recyklace probíhá buď refosforylací Ado, nebo se na ní podílejí proteiny s adenosin deaminázovou enzymatickou funkcí, které zprostředkovávají katabolickou reakci, vedoucí k rozložení Ado na inosin a hypoxanthin.

Proteiny s adenosin deaminázovou aktivitou (ADA aktivitou) se dělí do dvou skupin. První skupinu tvoří „bona fide adenosin deaminázy“ (pravé ADA). Tyto metabolické enzymy byly zastoupeny u všech zkoumaných organismů, nacházejí se převážně v cytoplazmě buněk a plní svůj jediný a hlavní cíl, což je deaminace Ado a deoxyadenosinu na inosin a deoxyinosin

(Doleželová et al., 2005). Deoxyadenosin je cytotoxický metabolit vypouštěný buňkami během apoptózy a jako takový může zabíjet ostatní buňky narušením jejich deoxynukleotidového metabolismu (Žuberová, 2011). Ačkoliv u člověka plní „pravá“ ADA hlavní roli coby adenosin deamináza, *Drosophila* má pouze jeden gen podobný této, jehož míra exprese je však spíše nízká a nemění se během celého vývoje (Žurovec et al., 2002).

Druhou skupinou proteinů s adenosin deaminázovou aktivitou tvoří proteinová rodina ADGF (Adenosine deaminase growth factors). Od „pravých“ ADA se funkčně neliší, katalyzují deaminaci Ado a deoxyAdo na inosin a deoxyinosin, změna je pouze ve struktuře C a N-konce, který zpravidla obsahuje signální peptid pro specifické umístění v buňce nebo sekreci (Doleželová et al., 2005). U člověka byl identifikován pouze jeden gen, *CECRI* (Cat Eye Critical Region 1), jehož produkt spadá do ADGF rodiny a mutace v tomto genu má za následek onemocnění „cat eye syndrome“ (Riazzi et al., 2000). U *Drosophila* tato rodina čítá dosud 6 členů (ADGF-A, -A2, -B, -C, -D, -E), kde především Adgf-A a Adgf-D převzaly hlavní roli, coby adenosin deaminázy. Jednotliví členové se od sebe liší především v místě exprese jejich genů a také v místě působení proteinů jako takových. Zatímco *ADGF-A* je exprimován především v lymfatických žlázách a ve střevě, *ADGF-D* je nejsilněji exprimován v mozku a tukovém tělese podobně jako *ADGF-C*. Navíc proteiny ADGF-A, -C, -D mají signální peptid, nasvědčující tomu, že jejich funkce je v extracelulárním prostoru (Matsushita et al. 2000; Žurovec et al., 2002, Doležal et al., 2003). Výše zmíněné proteiny s adenosin deaminázovou aktivitou se zvyšováním nebo snižováním hladiny Ado v extra/intracelulárním prostoru podílejí na důležité součásti adenosinové dráhy, což je transport hydrofilní molekuly Ado přes cytoplazmatickou membránu buňky. Zvyšování hladiny Ado těmito enzymatickými proteiny vede k započetí signalizace skrze specializované proteiny typu transportérů.

Celý transportní systém se skládá ze dvou typů transportních proteinů: (1) Ekvilibrativní nukleosidové transportéry (ENT), (2) koncentrativní nukleosidové transportéry (CNT). Zatímco ENT jsou  $\text{Na}^+$  nezávislé, pasivní transportéry, CNT využívají aktivní kotransport  $\text{Na}^+$ /Adenosin, řízený transmembránovým  $\text{Na}^+$  gradientem (Griffiths et al., 1997; King et al., 2006). Počty genů pro jednotlivé transportní proteiny se liší podle živočišného druhu. Zatímco u savců (včetně člověka) jsou čtyři ekvilibrativní (ENT 1-4) a tři koncentrativní (CNT 1-3) nukleosidové transportéry (Sankar et al., 2002), u *Drosophila* jsou tři ekvilibrativní (ENT 1-3) a dva koncentrativní (CNT 1,2) transportéry (Machado et al., 2007). Ačkoliv jsou mezi savci a bezobratlými odlišnosti v aminokyselinové sekvenci daných nukleosidových transportérů, tak

strukturální motivy těchto genů si jsou značně podobné a výsledné proteiny plní totožné role v organismu (Sankar et al., 2002).

Třetí skupina specializovaných proteinů, které se však nepodílejí na transportu Ado do buňky, ale využívají ho pro uskutečnění své signalizace dovnitř buňky, jsou adenosinové receptory (AdoR). Adenosinové receptory (AdoR) představují skupinu receptorů spřažených s G-proteiny, které jsou exprimovány v různých tkáních. AdoR se u člověka rozdělují do čtyř skupin (A1, A2A, A2B, A3) podle sensitivity k různým agonistům a antagonistům a také podle rozdílnosti v signalizaci pomocí druhých posílů (Fredholm et al., 2001). U *Drosophila* je pouze jeden gen pro adenosinový receptor (DmAdoR). Jeho nejbližší homolog z lidských AdoR je gen kódující receptor A2A, který vykazuje shodu v 38,3 % v 350 bázovém N konci genu (Doleželová et al., 2004). Signalizace AdoR hraje důležitou roli během stresových podmínek, jako je hypoxie nebo zánět, také má vliv na buněčný cyklus a apoptózu (Newby, 1984; Cronstein, 1994; Abbracchio et al., 1995; Apasov et al., 1997).

Orgán s obzvláště bohatým rozložením všech subtypů AdoR je obratlovčí mozek. Adenosinová signalizace přes AdoR je již po mnoho let intenzivně studována na savcích, v naší laboratoři i bezobratlých modelových organismech a farmakologické intervence AdoR se těší velkému očekávání ohledně účinku na neurologické choroby.

### 1.1.2 Mozek a adenosin

Extracelulární adenosin hraje v savčím mozku velmi významnou roli jako neuromodulátor a také regulátor funkce neuronů i gliových buněk. Ado kontroluje dráždivost neuronů a také vypouštění různých neurotransmiterů, včetně acetylcholinu, dopaminu, glutamátu či kyseliny gama-aminomáselné (Sebastiao & Ribeiro, 1996). Jako takový Ado moduluje synaptickou plasticitu a funkci synapsí, navíc brání toxickému působení nahromaděného glutamátu, který například vzniká při Huntingtonově chorobě (HD-Huntington's disease), dále také působí proti apoptóze indukované cytokiny (Jacobson, 2009). Extracelulární Ado v mozku vzniká obdobnými cestami jako v ostatních tkáních (viz kapitola 1.1.1), zdrojem mohou být jak neurony, tak i podpůrné gliové buňky (Halassa et al., 2009). Většina projevů (fyziologických i patologických) extracelulárního Ado se děje díky vazbě na některý ze čtyř subtypů AdoR jmenovaných v předchozí kapitole.

Všechny čtyři podtypy AdoR mají v mozku jedinečné rozmístění v jeho různých částech, různé farmakologické vlastnosti i různé dráhy pro svou signalizaci, jakožto receptory spřažené s G-proteiny (Fredholm et al., 2001). Receptor A1 je nejvíce zastoupen v hipokampu,

thalamických jádrech nebo mozkové kůře, tedy v úsecích zodpovědných za složité kognitivní procesy (Fastbom et al., 1987). A1 receptor má silné neuromodulační účinky a může iniciovat záchranné procesy v neuronech při ischemických nebo hypoxických podmínkách, ať už při mozkové či srdeční ischemii. Aktivace A1 receptoru působí protektivně vůči zánětům v nervové tkáni a také vůči dopaminem způsobené neurodegeneraci u myšího modelu Parkinsonovy nemoci (Liu et al., 2006). Dále také jeho aktivace snižuje nespavost, tlumí záchvatovité stavy a snižuje pocit úzkosti. Na druhou stranu jeho blokace pomáhá zmírňovat symptomy u mentálních onemocnění, jako jsou různé druhy demence, ale také pozitivně působí na srdeční arytmie, astma a další respirační onemocnění (Elsinga et al., 2011).

Druhý podtyp AdoR, A2A (nejvíce podobný AdoR u *Drosophila*) je zdaleka nejvíce zastoupen ve striatu, což je u primátů, včetně člověka, úsek bazálních ganglií uvnitř hemisfér koncového mozku. Striatum je z 95 % složeno z tzv. mediálních spinálních neuronů, které představují hlavní dráhu pro ovládání pohybu (Schiffmann et al. 2007). A2A receptory se v samotném striatu objevují v oddělených subpopulacích, kdy je většina A2A receptorů exprimována na postsynaptických neuronech, ale určitá subpopulace A2A receptorů je exprimována také v neuronech presynaptických (Rebola et al., 2005). Toto umístění až překvapivě výrazně určuje jejich projevy a interakce s různými neurotransmitery a dalšími receptory. Kupříkladu postsynaptické umístění receptorů umožňuje tvorbu heteromerů s ostatními G-spráženými receptory, jako je dopaminový, kanabinoidový nebo glutamátový receptor. Na druhou stranu tvoří presynapticky umístěné A2A receptory heteromery s A1 receptory, což umožňuje uvolňování neurotransmiterů, jako je glutamát (Ferré et al., 2013). Jelikož největší exprese A2A receptorů je v části mozku, která je zodpovědná za ovládání pohybu, není překvapením, že se tento receptor stal předmětem velkého zájmu v rámci výzkumu neurodegenerativních nemocí, jako je Parkinsonova nebo Huntingtonova choroba. Zatímco u první jmenované se zdá, že aktivace A2A receptoru vede ke zhoršení motorických funkcí, u Huntingtonovy choroby to je zcela naopak, kdy se ukázalo, že jak u lidských pacientů, tak u modelových organismů je exprese A2A během progresivní fáze nemoci potlačena, což vede k méně ovladatelné motorice (Ferré et al., 2013). Dále je zajímavě, že A2A receptor je, na rozdíl od A1 receptoru, velmi senzitivní na hypoxii i jiná poškození CNS, jako je poranění míchy, chronický stres nebo i přirozené stárnutí. V takových případech dochází ke zvýšení exprese receptoru A2A (Cassada et al., 2002).

Zbývající dva receptorové podtypy, A2B a A3, jsou rozprostřené po různých částech mozku, avšak jejich exprese se nezdá být vysoká (Fredholm et al., 2000). Navíc afinita receptoru A2B pro Ado je vůbec nejnižší, protože pro signalizaci vyžaduje více než 1 $\mu$ M Ado



(Jacobson et al., 1995). Jelikož je jejich funkce většinou spjata s ostatními AdoR, připisuje se jim pozitivní účinek na astma, ischemické choroby srdce a mozku, ale také na autoimunitní nemoci typu revmatoidní artritida, lupenka nebo Crohnova choroba (Kolachala et al., 2008; Madi et al., 2007).

Receptory adenosinové signální dráhy představují slibnou, ale složitou cestu, jak ovlivnit dnes často neléčitelné a nevyléčitelné neurodegenerativní choroby, které v některých případech nejsou pouze doménou stáří, což bohužel demonstruje Huntingtonova choroba, jejíž nástup může přijít v již relativně mladém věku a následky tohoto onemocnění jsou o to drtivější.

## 1.2 Huntingtonova choroba

Huntingtonova choroba (HD – Huntington's disease) je dědičné, neurodegenerativní onemocnění s progresivním rozvojem příznaků. HD se řadí do kategorie nemocí s tzv. pozdním nástupem, kdy nástup nemoci se nejčastěji u člověka projevuje ve středním až pokročilém věku. HD vykazuje autozomálně dominantní dědičnost a je zapříčiněna expanzí trinukleotidů CAG v prvním exonu genu kódujícím protein Huntingtin (Htt), jenž leží na čtvrtém lidském chromosomu. Počet těchto opakování určuje do velké míry, kdy a s jakou intenzitou se projeví první příznaky nemoci. Začlenění těchto expandujících trinukleotidů do genu vede k vytvoření polyglutaminové struktury v translatovaném proteinu, což mění jeho vlastnosti natolik, že se tvoří intra nebo extracelulární agregáty tohoto proteinu, jež jsou hlavním zdrojem počátku neurodegenerace u HD pacientů. V běžné populaci se počet CAG expandovaných trinukleotidů pohybuje do množství 35. Při počtu repetit nad 40 způsobuje téměř stoprocentní penetranci nemoci do 60 let věku pacienta. Zpravidla, čím delší je polyglutaminový řetězec na proteinu, tím dříve nastává výskyt HD (Warby et al., 2011).

Agregace mutantního Huntingtinu (mHtt) je považována za hlavní příčinu neurodegenerace a z toho vyplývajících neurologických příznaků. Tento děj probíhá u HD pacientů nepřerušeně mnoho let, kdy postupně dochází k atrofii a odumírání, především motorických neuronů ve striatu mozku. První příznaky jsou diagnostikovatelné až po určitém stupni atrofie mozkové tkáně (Ross a Tabrizi, 2011). Samotná agregace mHtt představuje několikastupňový proces probíhající v cytoplazmě buněk, jež však vede i ke vzniku inkluzních tělísek v jádře buňky, přičemž je narušeno mnoho fyziologických procesů v rámci zdravého fungování buňky. Prvotní změnou je vznik těžko rozpustných struktur uvnitř proteinu, jako jsou

amyloidová vlákna obsahující struktury  $\beta$ -skládaných listů. Kromě toho je mHtt schopen k sobě kovalentně navázat i další proteiny či faktory, například důležité pro transkripci nebo kontrolu kvality proteinů, což naznačuje mechanismus, kterým se docílí celkového vyřazení dané buňky z provozu (Soto, 2003).

Jak již bylo zmíněno výše, tento proces vede k degeneraci neuronů v části mozku důležitých pro ovládání pohybu a ačkoliv tato neurodegenerace pokračuje i do dalších mozkových center, prvním charakteristickým klinickým příznakem je postupná ztráta ovládání motorických pohybů.

Nekontrolovaný pohyb končetin, ale i dalších částí těla se často označuje jako „chorea“, což je též termín, který se hojně používá pro alternativní název HD. Chorea označuje spontánní, náhlé pohyby končetin, ale také obličejových svalů, jež přicházejí nepravidelně a mají různou intenzitu. U HD pacientů se objevuje lehký třes končetin, který přechází v náhlá a energická gesta či grimasy, načež nastane nekontrolovaný pohyb rukou/nohou, který může přejít až v pohyby agresivního rázu (Barbeau et al. 1981). Chorea se objevuje v 90 % případů HD, ale na rozdíl od ostatních příznaků se chorea nevyvíjí lineárně, nýbrž většinou dosahuje maximální intenzity po pár letech od svého začátku, a poté má ustupující tendenci (Young et al. 1986).

Dalším hlavním příznakem HD je postupné zhoršení kognitivních funkcí. Proběhlé výzkumy ukázaly, že zhruba u 40 % pacientů se začíná objevovat ještě před vypuknutím samotné choroby tzv. mírný pokles kognitivních funkcí, což je přechodný stav mezi normálním stavem a demencí (Duff et al., 2010). Zhoršující se trend lze nejčastěji pozorovat na zpomalení procesu zpracovávání a vyhodnocování informací a také na vyjadřovací schopnosti (Ho et al., 2003). Na rozdíl od výše zmíněných kognitivních procesů se paměť začíná u HD pacientů zhoršovat až v plném proudu nemoci. Ačkoliv se často uvádí, že terminální fáze onemocnění přechází až v demenci, tak soubor psychiatrických symptomů u HD pacientů nesplňuje kritéria pro demenci, která se používají např. u Alzheimerovy choroby. Důvodem zřejmě je, že HD napadá především sub-kortikální oblasti mozku (alespoň v jejích prvních fázích), zatímco Alzheimerova choroba způsobuje silnou neurodegeneraci v mozkové kůře (Ho et al., 2003).

Třetím hlavním souborem symptomů HD je výskyt duševních poruch vedoucích ke změně osobnosti, depresí, úzkostí či sebevražedných tendencí. Odborníci se nyní shodují na tom, že výskyt depresí u HD pacientů má základy v probíhající neurodegeneraci (Mindham et al. 1985). Výskyt patologických depresí u HD pacientů je okolo 50 % (u běžné populace to jsou 4%), přičemž výskyt těchto depresí předchází manifestaci choroby o několik let (Pflanz et al., 1991). S chronickými depresemi úzce souvisí výskyt sebevražedných tendencí a sebepoškozování u HD pacientů. Jedna ze studií ukázala, že sebevražda u takových pacientů je

čtyřikrát častější, ve srovnání s běžnou populací (Farrer 1986; Wetzel et al., 2011). Jedním z prominentních znaků HD je náhlá vznětlivost a agresivita, jež se objevuje u 38-73% pacientů, v závislosti na dané studii (Craufurd, et al., 2001; Kulisevsky, et al., 2001; Murgod, et al., 2001). Tato změna chování je přičítána postupné degradaci v centru zpracování emocí mezi amygdalou orbitofrontálním kortexem (Klöppel et al., 2010). Obdobný prominentní znak vztahující se k tomuto onemocnění je chronický pocit úzkosti, který ve spojení s depresemi často přispívá k sebevražedným incidentům u HD pacientů.

Ačkoliv je HD monogenní onemocnění, její proces patologie, kdy je narušeno obrovské množství buněčných dějů a signálních drah, dělá z této nemoci komplexní a složitý fenomén a při zmírňování následků tohoto onemocnění se může uplatnit řada různých mechanismů. Z tohoto důvodu byly pomocí genového inženýrství vytvořeny modely této nemoci v současnosti v nejvíce používaných modelových organismech, jako je *Drosophila melanogaster*, háďátko nebo různé kmeny myši.

### 1.3 Modelové organismy a HD

Hlavní funkcí modelových organismů je co nejlíže napodobit symptomy nemoci, ale také její molekulární mechanismy a působení, abychom mohli hledat možnosti intervence. Modely HD se dají rozdělit na dvě skupiny, (1) modely využívající toxické látky k vyvolání příznaků a (2) genetické modely.

Ačkoliv je využívání toxických látek pro modelování HD již spíše minulostí, tak před nástupem pokročilých molekulárních metod sloužil tento způsob jako hlavní nástroj pro výzkum tohoto onemocnění. V tomto případě se jako modelový organismus používaly zejména laboratorní myši a krysy. Jako toxická látka se používala zejména kyselina chinolinová a kyselina 3-nitropropionová. Pomocí těchto dvou kyselin se především zkoumaly důsledky narušení funkce mitochondrií a tzv. aktivací indukovaná buněčná smrt, což jsou jedny z hlavních mechanismů neurodegenerace v mozku během HD (Ramaswamy et al., 2007). Obvykle se tyto látky injikovaly do striatu, neboť fungují jako agonisté glutamátových receptorů a selektivně vyvolávají odumírání GABAergních motoneuronů, jež jsou v prvních fázích HD nejvíce postihnuty degenerací (Beal et al., 1991). Přestože tyto postupy přinášely nové výsledky ohledně potencionálních drah a procesů, které by mohly být součástí účinku HD,

postupem času začaly spíše převažovat nevýhody těchto metod. Vyvolávání neurodegenerace touto cestou představovalo akutní působení toxického vlivu, a nikoliv postupné a chronické působení HD, jež probíhá progresivně a po dobu desítek let. Navíc, i když atrofie striatální tkáně patří mezi hlavní neuropatologické charakteristiky HD, tak *mHtt* je během nemoci exprimován napříč CNS, včetně periferních tkání. Projevy HD nevycházejí pouze z atrofie jedné části mozku, nýbrž z postupného působení *mHtt* i v ostatních částech CNS, čehož není možno dosáhnout v modelech využívajících injikování toxinů pouze a přímo do striatu (Pouladi et al., 2013). V současné době se pro modelování HD využívá převážně linií modelových organismů, jež byly pomocí metod genového inženýrství upraveny tak, aby v sobě exprimovaly předem vložený mutovaný lidský gen *Htt*.

Jedním takovým organismem je háďátko *C. elegans*. V tomto případě se většinou využívá lidský exon 1 s libovolnou mutací, tedy délkou CAG řetězce. Ačkoli háďátko neobsahuje ortolog genu *Htt*, transgenní exprese lidského *mHtt* v daných neuronech vyvolává několik fenotypů, jako jsou motorické defekty závislé na věku, celkové nervové dysfunkce a za určitých podmínek i neurodegenerace (Parker et al., 2001).

Dalším hojně využívaným transgenním modelovým organismem jsou hlodavci. Momentálně je jedním z nejpoužívanějších hlodavců pro modelování HD transgenní myš kmen R6/2. Tyto myši obsahují první exon lidského *Htt* spolu se 144 repeticemi CAG, což způsobuje dostatečnou patogenicitu, aby se u těchto myši vyskytovaly charakteristické znaky HD, jako jsou neurodegenerace, poruchy ovládnutí pohybů, zhoršení kognitivní funkce, agresivita nebo předčasná letalita (Ramaswamy et al., 2007). Dalším používaným kmenem myši jsou tzv. YAC myši, u nichž je pomocí expresního systému umělého kvasinkového chromozomu exprimován celý lidský *Htt* gen se 72 nebo 148 CAG repeticemi. Tento kmen taktéž vykazuje všechny důležité znaky HD, čímž se stává slibným modelem pro další výzkum (Hodgson et al., 1999). Kromě výše zmiňovaných myši se od přelomu tisíciletí začaly používat i transgenní krysy, především kmen vytvořený týmem profesora Von Horstena v roce 2003. Tato krysa má dostatečné fenotypické znaky HD, a navíc dosahuje delšího života, což může být výhodné pro testování dlouhodobých terapeutických postupů.

Třetím, a pro tuto práci nejdůležitějším modelovým organismem pro modelování HD, je *Drosophila melanogaster*. Zatímco u savčích modelů se po dlouhou dobu tápalo a hledalo vhodné řešení pro expresi transgenního *Htt*, u *Drosophila* se tento problém elegantně obešel díky objevu a používání genového expresního systému *UAS/Gal4*, jenž byl přejat z kvasinek. Tento systém spočívá v inzerci zvoleného genu (např. *Htt*) za aktivátorovou sekvenci *UAS* do mouchy a následného zkřížení s jedincem nesoucím tzv. *Gal4 driver*, který aktivuje a spustí

expresi genu, který je za *UAS* sekvencí. Gal4 je možno navrhnout pro specifické tkáně, čímž se zajistí, že daný gen bude exprimován pouze v určité tkáni. (Brand a Perrimon, 1993). Díky tomuto v principu jednoduchému systému je možno vytvořit mnoho různých forem HD modelů, jež obsahují jednotlivé fragmenty lidského *Htt* nebo rovnou celý gen. Stejně je to s počtem CAG repetice, kdy se počet pohybuje od 20 do 140 opakování těchto trinukleotidů. Důvěryhodnost tomuto modelu dodávají především fenotypické znaky, které do velké míry věrně kopírují lidský průběh nemoci. Ve všech toxických variantách *Drosophila* vykazuje neuropatologii v souladu s většinou lidských projevů: závažnost dysfunkcí záleží na délce CAG řetězce, neurodegenerace postupuje progresivně, patologie vykazuje pozdní nástup, probíhá tvorba proteinových agregátů, postupná ztráta motorických funkcí a předčasná letalita (Marsh et al., 2009). Nespornou výhodou *Drosophila* je možnost sledovat probíhající neurodegeneraci přímo, díky anatomickému uspořádání oka a speciálnímu zobrazovacímu postupu, který zviditelní foto neurony, jež podléhají při expresi *mHtt* neurodegeneraci. Navíc ve srovnání se savčími modely je možno díky velkému množství potomstva a rychlému životnímu cyklu získat velký soubor dat za krátkou dobu.

Pro výzkum neurodegenerativních nemocí je role modelových organismů esenciální. Díky jejich podobnostem s člověkem a velké hloubce znalostí, které o těchto organismech máme, můžeme relativně přesně napodobit průběhy dosud nevléčitelných chorob, což vede k poznatkům, jež mohou napomoci k odhalení mechanismu působení takových patologií, a přispět tak k potenciální budoucí léčbě.

## 2 Cíle práce

- Vybrat geny, vhodné pro ovlivnění extracelulárního Ado v mozku *Drosophila melanogaster*.
- Založit pomocí genetického křížení nové, stabilní linie *Drosophila* a použít je pro další analýzy.
- Otestovat vliv geneticky zvýšené hladiny extracelulárního Ado v nervové soustavě *Drosophila* na úmrtnost jedinců s overexpresí *mHtt*.
- Otestovat vliv Ado na průběh neurodegenerace v nervové soustavě u HD modelu *Drosophila*.
- Analýza účinku zvýšené hladiny Ado v nervové soustavě na motorické funkce HD modelu *Drosophila*.

### 3 Materiál a metody

#### 3.1 Použité linie *Drosophila melanogaster*

V této práci bylo použito celkem osm linií *Drosophila melanogaster*. Linie s konstruktem pro overexpresi mutantního *Htt* (Q20, Q93) a linie s *elav-Gal4-Gal 4* driverem nám byly darovány profesorem Marshem z University of California, Irvine. Linie Q20 obsahuje lidský exon 1 genu *Htt* s 20 CAG repeticemi, které nezpůsobují žádnou toxicitu a slouží jako kontrola, zatímco linie Q93 obsahující stejný fragment lidského *Htt*, ale s 93 motivy CAG již působí v *Drosophila* toxicky. Driver *elav-Gal4-Gal 4* spouští expresi transgenu pouze v nervové soustavě.

Linie s RNAi konstrukty *Adgf-C*, *Adgf-D* a s overexpresí fluorescenčního proteinu GFP pocházejí z Bloomington Stock Center a *AdoR<sup>RNAi</sup>* pochází z VDRC (Vienna Drosophila Resource Center). Linie obsahující balancerové chromozomy na druhém a třetím chromozomu byla vytvořena v naší laboratoři. V následující tabulce lze vidět souhrn použitých linií.

Tabulka I: Použité linie

Zápis v textu	Genotyp
Q93	<i>w; +; pUAST Q93 Exon1 #4F1</i>
Q20	<i>w; +; pUAST Q20 Exon1 #111F1L</i>
<i>Elav-Gal4</i>	<i>w, elav-Gal4&gt;Gal4; +; +</i>
<i>Adgf-C<sup>RNAi</sup></i>	<i>y[1] sc[*] v[1]; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.HMS02608}attP40/(CyO)</i>
<i>Adgf-D<sup>RNAi</sup></i>	<i>y[1] sc[*] v[1]; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.HMC04420}attP40/(CyO)</i>
<i>AdoR<sup>RNAi</sup></i>	<i>w; P{w[+mC]=UAS-RNAi(AdoR)}</i>
GFP	<i>y w; UAS-GFP</i>
balancer linie	<i>w; If/CyO; MKRS/TM6b</i>
<i>white</i>	<i>w<sup>1118</sup></i>

### 3.2 Schéma a podmínky křížení

Pro uskutečnění experimentů, jež jsou popsány v dalších kapitolách, bylo nejprve nutné pomocí genetického křížení získat jedince s potřebným genotypem. Jak lze vidět ve schématu, linie obsahující konstrukt s *Htt* a linie s RNAi konstrukty se ze začátku připravovaly paralelně, aby se v závěrečném kroku mohly zkřížit, a vzniklo tak potomstvo, které se následně křížilo s linií obsahující Gal4, čímž vzniklo finální potomstvo, jež bylo podrobena samotným pokusům.

Přípravná křížení probíhala ve 28 °C a mouchy byly chovány na běžném kukuřičném médiu. Finální křížení s linií Gal 4 vždy probíhala ve 29 °C za účelem maximálního zvýšení exprese transgenů a dosažení co nejvyšší intenzity neuropatologie u much s *Htt* konstruktem (Song et al., 2013).

V následujícím schématu reprezentuje popisek *UAS-Htt* jak Q93, tak i Q20. Podobně tomu tak je u *UAS-RNAi/GFP*, jež znázorňuje *Adgf-C<sup>RNAi</sup>*, *Adgf-D<sup>RNAi</sup>* a *AdoR<sup>RNAi</sup>*, potažmo overexpresi GFP.

#### Příprava linií s expresí *Htt*:

$$P: \text{♀♀} \frac{w}{w}; \frac{IF}{CyO}; \frac{MKRS}{TM6B} \times \text{♂♂} \frac{w}{Y}; \frac{+}{+}; \frac{UAS-Htt}{UAS-Htt}$$

$$F1: \text{♂♂} \frac{w}{Y}; \frac{+}{CyO}; \frac{UAS-Htt}{TM6B} \times \text{♀♀} \frac{w}{w}; \frac{IF}{CyO}; \frac{MKRS}{TM6B}$$

$$F2: w; \frac{If}{CyO}; \frac{UAS-Htt}{TM6B}$$



**Příprava linií s UAS-RNAi a GFP konstrukty:**

$$P: \text{♂♂ } \frac{y}{Y}; \frac{UAS\ RNAi/GFP}{UAS\ RNAi/GFP}; + \times \text{♀♀ } \frac{w}{w}; \frac{IF}{CyO}; \frac{MKRS}{TM6B}$$

$$F1: \text{♂♂ } \frac{w}{Y}; \frac{UAS\ RNAi/GFP}{CyO}; \frac{+}{TM6B} \times \text{♀♀ } \frac{w}{w}; \frac{IF}{CyO}; \frac{MKRS}{TM6B}$$

$$F2: w; \frac{UAS\ RNAi/GFP}{CyO}; \frac{MKRS}{TM6B}$$

**Příprava linie s dvěma UAS konstrukty:**

$$P: \text{♀♀ } \frac{w}{w}; \frac{If}{CyO}; \frac{UAS-Htt}{TM6B} \times \text{♂♂ } \frac{w}{Y}; \frac{UAS\ RNAi/GFP}{CyO}; \frac{MKRS}{TM6B}$$

$$F1: \text{♂♂ } \frac{w}{Y}; \frac{UAS\ RNAi/GFP}{CyO}; \frac{UAS-Htt}{MKRS}$$

### Finální křížení pro zisk potomstva určeného k analýze:

$$P: \text{♂♂} \frac{w}{Y}; \frac{UAS\ RNAi/GFP}{CyO}; \frac{UAS-Htt}{MKRS} \times \text{♀♀} \frac{elav-Gal\ 4}{elav-Gal\ 4'}; \frac{+}{+}; \frac{+}{+}$$

$$F1: \frac{elav-Gal\ 4}{Y/w}; \frac{UAS\ RNAi/GFP}{+}; \frac{UAS-Htt}{+}$$

$$\frac{elav-Gal\ 4}{Y/w}; \frac{UAS\ RNAi/GFP}{+}; \frac{+}{MKRS}$$

$$\frac{elav-Gal\ 4}{Y/w}; \frac{+}{CyO}; \frac{UAS-Htt}{+}$$

$$\frac{elav-Gal\ 4}{Y/w}; \frac{+}{CyO}; \frac{+}{MKRS}$$

### 3.3 RNA extrakce a reverzní transkripce

Izolace RNA probíhala na dvou různých skupinách vzorků. Vzorek v první skupině se skládal z 10 hlav dospělých jedinců linie *white*. Vzorek v druhé skupině obsahoval deset bezhlavých těl, která zbyla po oddělení hlavy pro první skupinu vzorků. Každý vzorek byl sesbírán ve čtyřech opakováních a použity byly pouze samice do třetího dne stáří. Po shromáždění dostatečného počtu jedinců, byly jejich oddělené části těl zmrazeny ponořením do tekutého dusíku a následně byla provedena extrakce RNA podle protokolu „RiboZol RNA Extraction Reagent“ (Amresco). Po izolaci byla RNA přečištěna dle protokolu „Nucleospin RNA II kit“ (Macherey – Nagel) a v posledním kroku přečišťování jsem RNA rozpustil v 80 µl DEPC vody. Po přečištění jsem změřil spektrofotometricky kvalitu a koncentraci RNA pomocí „NanoDrop 2000 spectrophotometer“ (Thermo Scientific). Pro reverzní transkripci jsem použil 500 ng RNA každého vzorku a postupoval podle protokolu „PrimeScript 1st strand cDNA synthesis kit“ (TaKaRa). Výsledná cDNA byla použita jako templát v Real Time PCR reakci.

### 3.4 qRT PCR a měření genové exprese

Metoda qRT PCR byla vybrána jako rychlý a spolehlivý způsob pro měření genové exprese. Vzorky cDNA, které byly získány výše popsáním postupem, byly 20× naředěny a použity jako templát pro qRT PCR. Toto ředění bylo vybráno na základě předchozího měření účinnosti použitých primerů, které bylo provedeno v naší laboratoři. Specifické primery byly navrženy pomocí softwaru PrimerSelect (DNASTAR). Jejich sekvence lze vidět v podkapitole Příloze I. Ve všech reakcích byla použita směs pro qRT PCR „5× HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus“ (Solis BioDyne). Jedna reakce qRT PCR obsahovala 5 µl ředěné cDNA, 0,5 µl každého z páru primerů, které byly naředěny jako 100 nM roztoky, 4 µl „qPCR mix“ a 10 µl DEPC vody, aby byl výsledný objem 20 µl. Každá reakce byla provedena ve třech opakováních. Amplifikace probíhala v přístroji „Illumina Eco Real-Time PCR System“ a výsledky byly vyhodnocovány v softwaru „Illumina EcoStudy“.

Program samotných reakcí se vždy skládal z počáteční aktivace enzymu při 95 °C po 15 minut, jelikož polymeráza ve výše zmíněném mixu vyžaduje „hot start“. Poté následovalo 40 cyklů, kdy se jednotlivý cyklus skládal ze střídání teplot 95 °C působící 15 sekund, 63 °C pro nasedání primerů, která působila po 20 sekund, a 72 °C po 30 sekund za účelem elongace syntetizovaného vlákna. Referenčním genem byl vybrán *RP 49*, jehož hladina transkripce sloužila jako standard k ostatním zkoumaným genům. Díky tomu, že se eficeince specifických primerů nelišila od účinnosti primerů referenčního genu o více než 5 % a také, že všechny hodnoty byly blízko 100 %, byla zvolena metoda srovnávání  $C_T$  hodnot, někdy také označovaná jako  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ . Tato metoda umožnila rychlé a efektivní stanovení relativní genové exprese zkoumaných genů.

### 3.5 Analýza přežívání potomstva do dospělců

Jedním z hlavních fenotypových znaků u linie Q93 je letalita během embryonálního a larválního stádia. Pro zaznamenání letality byla použita v principu stejná metoda, kterou např. použil profesor Marsh a jeho tým (UCI, USA) v publikaci z roku 2015.

Jak lze vidět v části předchozí kapitoly nazvané „Finální křížení“, výsledné potomstvo se skládalo ze čtyř různých genotypů. Jsou zde dva genotypy obsahující *Htt* transgen a dva, jež tento konstrukt neobsahují. Jelikož u genotypů exprimujících *Htt* Q93 se předpokládá zvýšená letalita, tak zbývající dva genotypy sloužily jako normálně segregující a neuropatologickou letalitou nezátížené kontroly. V praxi to znamená, že počet potomstva nesoucího na druhém chromozomu *CyO* a na třetím *Htt-Q93* bylo srovnáváno s počtem jedinců nesoucích *CyO* a *MKRS*. Počet jedinců se dvěma balancery představuje hodnotu 100 %, z této hodnoty se poté počítá procentní úmrtnost či přežívání jedinců s genotypem *CyO;k; Htt-Q93* vykazují. Například, pokud se vylíhne 20 *CyO; MKRS* jedinců a pouze 2 *CyO; Htt-Q93* jedinci, jejich přežívání se rovná 10 %. Stejný postup platí i u zbývajících dvou genotypů, jež nesou na druhém chromozomu *UAS* konstrukt a na třetím *Htt-Q93*, respektive *MKRS*.

Touto metodou se počítá přežívání také u kontrol *Htt-Q20*, které nezpůsobují žádnou letalitu nebo neuropatologii. Z toho důvodu mohou někdy vypočítané hodnoty přesahovat i 100 %, protože počet jedinců s *Htt-Q20* v daném křížení může být vyšší než počet jedinců v genotypové skupině, která představuje 100 % přeživších jedinců.

Každé křížení bylo provedeno v deseti opakováních a sestávalo z 2–3 samců a z 8–10 samic. Mouchy se nechaly křížit 4–5 dní a poté se přehodily na nové médium. Pro testování shody mezi očekávanými a pozorovanými počty jedinců byl použit  $\chi^2$  test o 5 % hladině významnosti. Pro vypočítání statistické signifikance mezi dvěma, nebo více genotypovými skupinami byl použit studentův t-test, respektive Kruskal-Wallisův test.

### 3.6 Analýza neurodegenerace

Obrovskou výhodou *Drosophila* modelu HD je možnost přímo analyzovat průběh neurodegenerace. To je možné díky postupu nazvaném „Pseudopupil assay“. Tato metoda umožňuje charakterizovat stav fotoreceptorových neuronů (FN) pomocí zviditelnění rhabdomer (orgány FN, které shromažďují světlo na krajní části neuronu) v omatidiu ve

složeném oku *Drosophila*. Neurotoxita HD se odvozuje od počtu ztracených neboli zdegenerovaných FN, jelikož zdravé omatidium obsahuje 7 rhabdomer, potažmo FN, jakýkoliv nižší počet svědčí o probíhající neurodegeneraci. Podrobný postup lze najít v protokolu vypracovaném doktorem Songem a jeho spolupracovníky v roce 2013.

Metoda spočívá v několika krocích. Po oddělení hlavy od těla analyzované mouchy je hlava položena na kapku bezbarvého laku na nehty na podložní mikroskopové sklo. Pozice hlavy na podložním skle je pro zviditelnění rhabdomer kritická. Vzhledem k anatomii složeného oka u *Drosophila* hlava musí být v dostatečně nakloněné poloze, aby paprsek světla z mikroskopu procházel přímo skrz FN. S analýzou se musí začít co nejdříve po dekapitaci mouchy, jelikož od cca 10 minut po smrti se začíná projevovat přirozené odumírání foto neuronů. Analýza probíhá pomocí světelného mikroskopu, v případě této práce byl použit Zeiss Axioplan 2 s imerzním objektivem 63x. Za účelem co nejlepšího prosvícení je vhodné se zbavit všech filtrů, jež zeslabují paprsek mikroskopu, a zúžit světelný paprsek tak, aby pronikal pouze okem. Jak již bylo řečeno výše, zdravý počet rhabdomer je 7. V HD jedincích se počet rhabdomer v jednotlivých omatidiích pohybuje od 0 do 7, pro analýzu neurodegenerace se všechny zviditelněné rhabdomery v zorném poli spočítají a tento údaj je použit pro statistické vyhodnocení. Dle publikovaného protokolu zmíněného výše je k důvěryhodnému výsledku nutno zanalyzovat alespoň 5 hlav od každého genotypu a alespoň 30–40 omatidií v každé hlavě. Data ze stejných genotypů se zprůměrují a k porovnání statistické signifikance s druhou skupinou se použije Studentův t-test. V této práci byly pro analýzu použity pouze samice a od každého genotypu bylo analyzováno 7 hlav a od 90–100 omatidií z každé hlavy.

### **3.7 Test motorických funkcí**

Třetí sledovaný fenotyp u použitých linií byla analýza jejich motorických funkcí. Za tímto účelem byl proveden klasický test, tzv. „Negative geotaxis assay“. Tato metoda využívá přirozeného chování *Drosophila*, kdy se při sklepnutí na dno nádoby ihned snaží vylézt do její horní části. V této práci byly použity plastové trubičky o průměru 1,5 cm, které byly zasazeny do pevné úchytné, jež byla vyrobena v naší laboratoři.

Do každé trubičky bylo umístěno 10 zkoumaných jedinců, kteří se před začátkem testu nechali cca 8 minut přivyknout na nové prostředí. Po aklimatizaci se bouchnutím o pevnou podložku všichni jedinci sklepli na dno trubiček a pomocí digitálního fotoaparátu (Olympus Camedia c-3030 Zoom) byla zaznamenávána jejich snaha vylézt do horní části trubičky. Během

tohoto lezení bylo sledováno, kolik jedinců po 10 sekundách od sklepnutí překoná první vyznačenou linii ve výšce 2 cm a po dalších 10 sekundách linii ve výšce 7 cm, což představovalo polovinu délky plastové trubičky. Počet jedinců, kteří dané linie překonali, je uváděn v procentech. Všichni jedinci byli 5 dní staré samice a byly drženy ve 29 °C, každá genotypová skupina byla podrobena celkem 20 opakováním tohoto testu. Jedno opakování se skládalo ze tří sklepnutí, které se posléze zprůměrovaly. Mezi každým sklepnutím byla 10 minutová pauza, aby zkoumaní jedinci měli prostor na regeneraci z předchozího otřesu. Pro každé nové opakování byli použiti noví jedinci, čili celkový počet zkoumaných much od jedné skupiny byl 200. Po dosažení dostatečného počtu opakování byly všechny hodnoty znovu zprůměrovány a jejich statistická signifikance byla určena pomocí metody ANOVA.

### 3.8 Chovné médium

Všechny použité mouchy byly chovány na standardním krmném médiu, které je používané v naší laboratoři. Následující tabulka ukazuje složení krmného média.

Tabulka II: Krmné médium

Ingredience	množství
Voda	100 ml
Kukuřičná mouka	8 g
Cukr krystal	5 g
Instantní Kvasnice	4 g
Agaróza	1,2 g
methylparaben 10%	2 ml

Následující pasáže o rozsahu stran 19-33 a 40 obsahují utajované skutečnosti a jsou obsaženy pouze v archivovaném originále bakalářské práce uloženém na Přírodovědecké fakultě JU.

## 4 Seznam literatury

Abbracchio M. P., Ceruti S., Barbieri D., Franceschi C., Malorni W., Biondo L., Burnstock G., Cattabeni F. (1995). A novel action for adenosine: apoptosis of astroglial cells in rat brain primary cultures. *Biochem Biophys Res Comm* 213(3): 908-915.

Apasov S. G., Koshiba M., Chused T. M., Sitkovsky M. V. (1997). Effects of extracellular ATP and adenosine on different thymocyte subsets: Possible role of ATP-gated channels and G-protein coupled purigenic receptor. *J Immunol* 158(11): 5095-5105.

Barbeau A., Duvoisin R.C., Gerstenbrand F., Lakke J.P., Marsden C.D., and Stern G. (1981). Classification of extrapyramidal disorders. Proposal for an international classification and glossary of terms. *Journal of the Neurological Sciences* 51(2): 311-327.

Beal M. F., Ferrante R. J., Swartz K. J., Kowall, N. W. (1991). Chronic quinolinic acid lesions in rats closely resemble Huntington's disease. *J. Neurosci.* 11: 1649–1659.

Brand A.H., Perrimon N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development.* 118: 401–415.

Bshesh K., Zhao B., Spight D., Biaggioni I., Feokistov I., Denenberg A., Wong H.R., Shanley T.P. (2002). The A2A receptor mediates an endogenous regulatory pathway of cytokine expression in THP-1 cells. *J. Leukoc. Biol.* 72:1027–1036.

Cassada, D. C., Tribble, C. G., Long, S. M., Kaza, A. K., Linden, J., Rieger, J. M. (2002). Adenosine A2A agonist reduces paralysis after spinal cord ischemia: Correlation with A2A receptor expression on motor neurons. *The Annals of Thoracic Surgery.* 74: 846–850.

- Craufurd D., Thompson J., & Snowden J. (2001). Behavioral changes in Huntington Disease. *Neuropsychiatry, neuropsychology, and behavioral neurology*. 14(4): 219-226.
- Cronstein B. N. (1994). Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent. *J Appl Physiol* 76(1): 5-13.
- Dolezal T, Dolezelova E, Zurovec M, Bryant P. J. (2005). A role for adenosine deaminase in *Drosophila* larval development. *PLoS Biol* 3(7): e201.
- Dolezal T, Gazi M, Zurovec M, Bryant P. J. (2003) Genetic analysis of the ADGF multigene family by homologous recombination and gene conversion in *Drosophila*. *Genetics* 165(2): 653–666.
- Dolezelova E., Nothacker H.P., Civelli O., Bryant P.J., Zurovec M. (2007). A *Drosophila* adenosine receptor activates cAMP and calcium signaling. *Insect Biochem Mol Biol* 37(4): 318-329.
- Doumanis J., Wada K., Kino Y., Moore A.W., Nukina N. (2009). RNAi Screening in *Drosophila* Cells Identifies New Modifiers of Mutant Huntingtin Aggregation. *PLoS ONE* 4(9): e7275.
- Duff K., Paulsen J., Mills J., Beglinger L., Moser D., Smith M. (2010). Mild cognitive impairment in prediagnosed Huntington disease. *Neurology*. 75(6): 500-507.
- Elsinga P.S., Ishiwata P. H., Dierckx K., van Waarde R. A. (2011) Adenosine A(1) receptors in the central nervous system: Their functions in health and disease, and possible elucidation by PET imaging. *Curr. Med.Chem.* 18:4820–4835.
- Farrer L.A. (1986). Suicide and attempted suicide in Huntington disease: implications for preclinical testing of persons at risk. *American Journal of Medical Genetics*. 24(2): 305-311.
- Fastbom, J.; Pazos, A.; Palacios, J. M. The distribution of adenosine A1 receptors and 5'-nucleotidase in the brain of some commonly used experimental animals. *Neuroscience* 1987, 22, 813–826.
- Ferrante A., Martire A., Armida M., Chiodi V., Pezzola A., Potenza R.L., Domenici M.R., Popoli, P. (2010). Influence of CGS 21680, a selective adenosine A(2A) receptor agonist, on NMDA receptor function and expression in the brain of Huntington's disease mice. *Brain Res*. 1323:184–191.



Ferré S., Quiroz C., Orru M., Guitart X., Gulyani S., Allen R. (2013). Role of Striatal A2A Receptor Subpopulations in Neurological Disorders. In: Masino S, Boison D, editors. Adenosine. A Key Link between Metabolism and Brain Activity. Springer; New York. pp. 179–97.

Fredholm B. B., Ijzerman A. P., Jacobson K. A., Klotz K. N., Linden J. (2001). International Union of Pharmacology XXV. Nomenclature and Classification of Adenosine receptors. *Pharmacol Rev* 53(4): 527-552.

Fredholm B.B. (2010). Adenosine receptors as drug targets. *Exp Cell Res* 316(8): 1284-1288.

Griffiths M., Beaumont N., Yao S. Y., Sundaram M., Boumah C. E., Davies A., Kwong F. Y., Coe I., Cass C. E., Young J. D., Baldwin S. A. (1997). Cloning of a human nucleoside transporter implicated in the cellular uptake of adenosine and chemotherapeutic drugs. *Nat Med* 3(1): 89-93.

Halassa, M. M., Florian, C., Fellin, T., Munoz, J. R., Lee, S. Y., Abel, T., et al. (2009). Astrocytic modulation of sleep homeostasis and cognitive consequences of sleep loss. *Neuron* 61: 213–219.

Hershfield M. S., Kurtzberg J., Aiyar V. N., Suh E. J., Schiff R. (1985). Abnormalities in S-adenosylhomocysteine hydrolysis, ATP catabolism and lymphoid differentiation in adenosin deaminase deficiency. *Ann N Y Acad Sci* 451: 78-86.

Ho A., Sahakian B., Brown R., Barker R., Hodges J., Ané M. N., et al. (2003). Profile of cognitive progression in early Huntington's disease. *Neurology*, 61(12): 1702-1706.

Hodgson J.G, Agopyan N., Gutekunst C.A., Leavitt B.R., LePiane F., Singaraja R., Smith D.J., Bissada N., McCutcheon K., Nasir J., Jamot L., Li X.J., Stevens M.E., Rosemond E., Roder J.C., Phillips A.G, Rubin E.M, Hersch S.M, Hayden M.R. (1999). A YAC mouse model for Huntington's disease with full-length mutant huntingtin, cytoplasmic toxicity, and selective striatal neurodegeneration. *Neuron* 23:181-192.

Huang N.K., Lin Y.W., Huang C.L., Messing R.O., Chern, Y. (2001). Activation of protein kinase A and atypical protein kinase C by A(2A) adenosine receptors antagonizes apoptosis due to serum deprivation in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 276:m13838–13846.

Chen, C.M. (2011). Mitochondrial dysfunction, metabolic deficits, and increased oxidative stress in Huntington's disease. *Chang Gung Med. J.* 34:135–152.

- Chiang M.C., Lee Y.C., Huang C.L., Chern Y. (2005). cAMP response element-binding protein contributes to suppression of the A2A adenosine receptor promoter by mutant Huntingtin with expanded polyglutamine residues. *J. Biol. Chem.*, 280:14331–14340.
- Chou S.Y., Lee Y.C., Chen H.M., Chiang M.C., Lai H.L., Chang H.H., Wu Y.C., Sun C.N., Chien C.L., Lin Y.S. (2005). CGS21680 attenuates symptoms of Huntington's disease in a transgenic mouse model. *J. Neurochem.* 93:310–320.
- Jacobson K. A. and Gao Z. G. (2009) Adenosine, in *Intercellular communication in the nervous system* (Malenka R. C., ed.), pp. 627–638. Elsevier, Boston, MA.
- Jacobson K.A., Kim H.O., Siddiqi S.M., Olah M.E., Stiles G.L., von Lubitz D.K.J.E. (1995). A3 adenosine receptors: design of selective ligands and therapeutic prospects. *Drugs Future.* 20: 689–699.
- King A. E., Ackley M. A., Cass C.E., Young J. D., Baldwin S. A. (2006). Nucleoside transporters: from scavengers to novel therapeutic targets. *Trends Pharmacol Sci* 27(8): 416-421.
- Klöppel S., Stonnington C., Petrovic P., Mobbs D., Tüscher O., Craufurd D. (2010). Irritability in pre-clinical Huntington's disease. *Neuropsychologia*, 48(2): 549-557.
- Kolachala V.L., Bajaj R., Chalasani M., Sitaraman S.V. (2008). Purinergic receptors in gastrointestinal inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 294: G401–G410.
- Kulisevsky J., Litvan I., Berthier M., Pascual-Sedano B., Paulsen J., Cummings J. (2001). Neuropsychiatric assessment of Gilles de la Tourette patients: comparative study with other hyperkinetic and hypokinetic movement disorders. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Societ.*, 16(6): 1098-1104.
- Liu H., Zhang W., Luo X., Ye Y., Zhu X. (2006). Paeoniflorin attenuates neuroinflammation and dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease by activation of adenosine A1 receptor. *Br. J. Pharmacol.* 148:314-325.
- Lin J.T., Chang W.C., Chen H.M., Lai H.L., Chen C.Y., Tao M.H., Chern Y. (2013). Regulation of feedback between protein kinase A and the proteasome system worsens Huntington's disease. *Mol. Cell Biol.* 33:1073–1084.
- Madi L., Cohen S., Ochayin A., Bar-Yehuda S., Barer F., and Fishman P. (2007). Overexpression of A3 adenosine receptor in peripheral blood mononuclear cells in rheumatoid arthritis: involvement of nuclear factor-kappa B in mediating receptor level. *J Rheumatol.* 34: 20–26.

- Machado J., Abdulla P., Hanna W.J., Hilliker A.J., Coe I.R. (2007). Genomic analysis of nucleoside transporters in Diptera and functional characterization of DmENT2, a *Drosophila* equilibrative nucleoside transporter. *Physiol Genomics* 28(3): 337-347.
- Marsh J.L., Lukacsovich T., Thompson L.M. (2009). Animal models of polyglutamine diseases and therapeutic approaches. *J Biol Chem.* 284:7431–7435.
- Matsushita T., Fujii-Taira I., Tanaka Y., Homma K.J., Natori S. (2000). Male-specific IDGF, a novel gene encoding a membranebound extracellular signaling molecule expressed exclusively in testis of *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem* 275(47): 36934–36941.
- Mindham R.H., Steele C., Folstein M.F. and Lucas J. (1985). A comparison of the frequency of major affective disorder in Huntington's disease and Alzheimer's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry.* 48(11): 1172-1174.
- Murgod U., Saleem Q., Anand A., Brahmachari S., Jain S., Muthane U. (2001). A clinical study of patients with genetically confirmed Huntington's disease from India. *Journal of the Neurological Sciences,* 190(1-2): 73-78.
- Newby A.C., Worku Y., Holmquist C. A. (1985). Adenosine formation. Evidence for a direct biochemical link with energy metabolism. *Adv Myocardiol* 6: 273-284.
- Parker J.A., Connolly J.B., Wellington C., Hayden M., Dausset J., Neri C. (2001). Expanded polyglutamines in *Caenorhabditis elegans* cause axonal abnormalities and severe dysfunction of PLM mechanosensory neurons without cell death. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 98:13318–13323.
- Pflanz S., Besson J.A., Ebmeier K.P., Simpson S. (1991). The clinical manifestation of mental disorder in Huntington's disease: a retrospective case record study of disease progression. *Acta Psychiatrica Scandinavica* 83(1): 53-60.
- Pouladi M.A., Morton A.J., Hayden M.R. (2013). Choosing an animal model for the study of Huntington's disease. *Nat Rev Neurosci.* 14(10):708-21.
- Ramaswamy S., McBride J.L., Kordower J.H. (2007). Animal Models of Huntington's Disease. *ILAR J.* 48(4): 356-373.
- Rebola, N., Simoes, A. P., Canas, P. M., Tome, A. R., Andrade, G. M., Barry, C. E., Agostinho, P. M., Lynch, M. A., Cunha, R. A. (2011). Adenosine A2A receptors control neuroinflammation and consequent hippocampal neuronal dysfunction. *J. Neurochem* 117: 100–111.

Riazi M. A., Brinkman-Mills P., Nguyen T., Pan H., Phan S., Ying F., Roe B. A., Tochigi J., Shimizu Y., Minoshima S., Shimizu N., Buchwald M., McDermid H. E. (2000). The human homolog of insect-derived growth factor, CECR1, is a candidate gene for features of cat eye syndrome. *Genomics* 64(3): 277–285.

Sankar N., Machado J., Abdulla P., Hilliker A. J., Coe I. R. (2002). Comparative genomic analysis of equilibrative nucleoside transporters suggests conserved protein structure despite limited sequence identity. *Nucleic Acids Res* 30(20): 4339-4350.

Sebastiao, A. M., Ribeiro, J. A. (1996). Adenosine A2 receptor-mediated excitatory actions on the nervous system. *Progress in Neurobiology* 48: 167–189.

Schiffmann, S. N., Fisone, G., Moresco, R., Cunha, R. A., Ferre, S. (2007). Adenosine A2A receptors and basal ganglia physiology. *Prog. Neurobiol.* 83: 277–292.

Sidorov R., Kucerova L., Kiss I., Zurovec M. (2015). Mutation in the *Drosophila melanogaster* adenosine receptor gene selectively decreases the mosaic hyperplastic epithelial outgrowth rates in wts or dco heterozygous flies. *Purinergic Signaling* 11(1):95-105.

Song W., Smith M.R., Syed A., Lukacsovich T., Barbaro B.A., Purcell J., Bornemann D.J., Burke J., Marsh J.L. (2013). Morphometric analysis of Huntington's disease neurodegeneration in *Drosophila*. *Methods Mol. Biol.* 1017:41-57.

von Horsten S., Schmitt I., Nguyen H.P., Holzmann C., Schmidt T., Walther T., Bader M., Pabst R., Kobbe P., Krotova J., Stiller D., Kask A., Vaarmann A., Rathke-Hartlieb S., Schulz J.B., Grasshoff U., Bauer I., Vieira-Saecker A.M., Paul M., Jones L., Lindenberg K.S., Landwehrmeyer B., Bauer A., Li X.J., Riess O. (2003). Transgenic rat model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 12:617-624.

Warby S. C., Visscher H., Collins J. A. (2011). HTT haplotypes contribute to differences in Huntington disease prevalence between Europe and East Asia. *Eur. J. Hum. Genet.* 19: 561-566.

Wetzel H., Gehl C., Dellefave-Castillo L., Schiffman J., Shannon K., Paulsen J. (2011). Suicidal ideation in Huntington disease: the role of comorbidity. *Psychiatry research.* 188(3): 372-376.

Young A.B., Shoulson I., Penney J.B., Starosta-Rubinstein S., Gomez F., Travers H., Ramos-Arroyo M.A., Snodgrass S.R., Bonilla E., Moreno H. (1986). Huntington's disease in Venezuela: neurologic features and functional decline. *Neurology* 36(2): 244-249.

Zuberova M., Fenckova M., Simek P., Janeckova L., Dolezal T. (2010). Increased extracellular adenosine in adenosine deaminase deficient flies activates a release of energy stores leading to wasting and death. *Dis Model Mech* 3(11-12): 773-84.

Zurovec M., Dolezal T., Gazi M., Pavlova E., Bryant P. J. (2002). Adenosine deaminase-related growth factors stimulate proliferation in *Drosophila* by depleting extracellular adenosine. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(7): 4403-4408.