

Huntingtonova bolest - od genskoga mapiranja do genske terapije

Šimić, Jakob

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:621348>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-15**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Jakob Šimić

**Huntingtonova bolest – od genskoga
mapiranja do genske terapije**

Završni rad

Zagreb, 2023.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Jakob Šimić

**Huntington's disease – from gene mapping to
gene therapy**

Bachelor thesis

Zagreb, 2023

Ovaj završni rad izrađen je u sklopu studijskoga programa Molekularna biologija na Zavodu za molekularnu biologiju Biološkoga odsjeka Prirodoslovno-matematičkoga fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Nenada Malenice.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Završni rad

Huntingtonova bolest – od genskoga mapiranja do genske terapije

Jakob Šimić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Huntingtonova bolest nasljedna je neurodegenerativna bolest. Mutacija gena *HTT* temelji se na povećanom broju sljedova CAG, što dovodi do povećane sklonosti agregiranju proteina huntingtina (HTT) u živčanim stanicama mozga. Bolest se očituje u nekontroliranim pokretima, problemima u osnovnim fizičkim aktivnostima i mentalnoj nazadnosti. U ovome radu prikazan je pregled istraživanja Huntingtonove bolesti. Nakon što je gen *HTT* mapiran na četvrtome kromosomu čovjeka i uspješno kloniran, krenuo je cijeli niz istraživanja o samoj mutaciji i njezinu učinku na fenotip oboljele osobe na molekularnoj razini. U početku se liječenje ove bolesti svodilo samo na ublažavanje simptoma, no pokušani su i razni molekularni pristupi liječenja poput ciljane razgradnje mutiranoga oblika huntingtina ili utišavanja njegove ekspresije djelovanjem RNA i specifičnim protutijelima. U najnovije vrijeme nastoji se razviti genska terapija koja bi konačno mogla spriječiti napredovanje ove bolesti. Iako su terapije molekulama DNA, RNA i protutijelima pokazivale određene pozitivne učinke, potencijalno najboljim lijekom doima se tominersen, *antisense* specifični oligonukleotid (ASO) koji razgrađuje mutirani HTT, a još je u fazi II kliničkoga ispitivanja.

Ključne riječi: huntingtin, HTT, dominantno, trinukleotidi, RFLP
(24 stranice, 6 slika, 0 tablica, 57 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Mentor: izv. prof. dr. sc. Nenad Malenica

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Bachelor thesis

Huntington's disease – from gene mapping to gene therapy

Jakob Šimić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Huntington's disease is a hereditary neurodegenerative disease. The *HTT* gene mutation is based on increased CAG sequences, leading to an increased tendency to aggregate huntingtin protein (HTT) in brain neuron cells. The disease manifests itself in uncontrolled movements, problems in basic physical activities, and mental retardation. This paper presents an overview of Huntington's disease research. After the *HTT* gene was mapped on the fourth chromosome and successfully cloned, a whole series of research began on the mutation itself and its effect on the phenotype of the affected person at the molecular level. In the beginning, the treatment of this disease was limited to alleviating the symptoms, but various molecular treatment approaches were also tried, such as the targeted degradation of the mutated form of huntingtin or the silencing of its expression by the action of RNA or specific antibodies. Recently, efforts are being made to develop a gene therapy that could finally prevent the progression of this disease. Although therapies with DNA and RNA molecules and antibodies have shown some positive effects, the potentially best drug at this moment seems to be tominersen, an antisense specific oligonucleotide (ASO) that degrades mutated *HTT*, which is still in the phase II of clinical trial.

Keywords: huntingtin, *HTT*, dominant, trinucleotides, RFLP
(24 pages, 6 figures, 0 tables, 57 references, original in: Croatian)
The thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Dr. Nenad Malenica, Assoc. Prof.

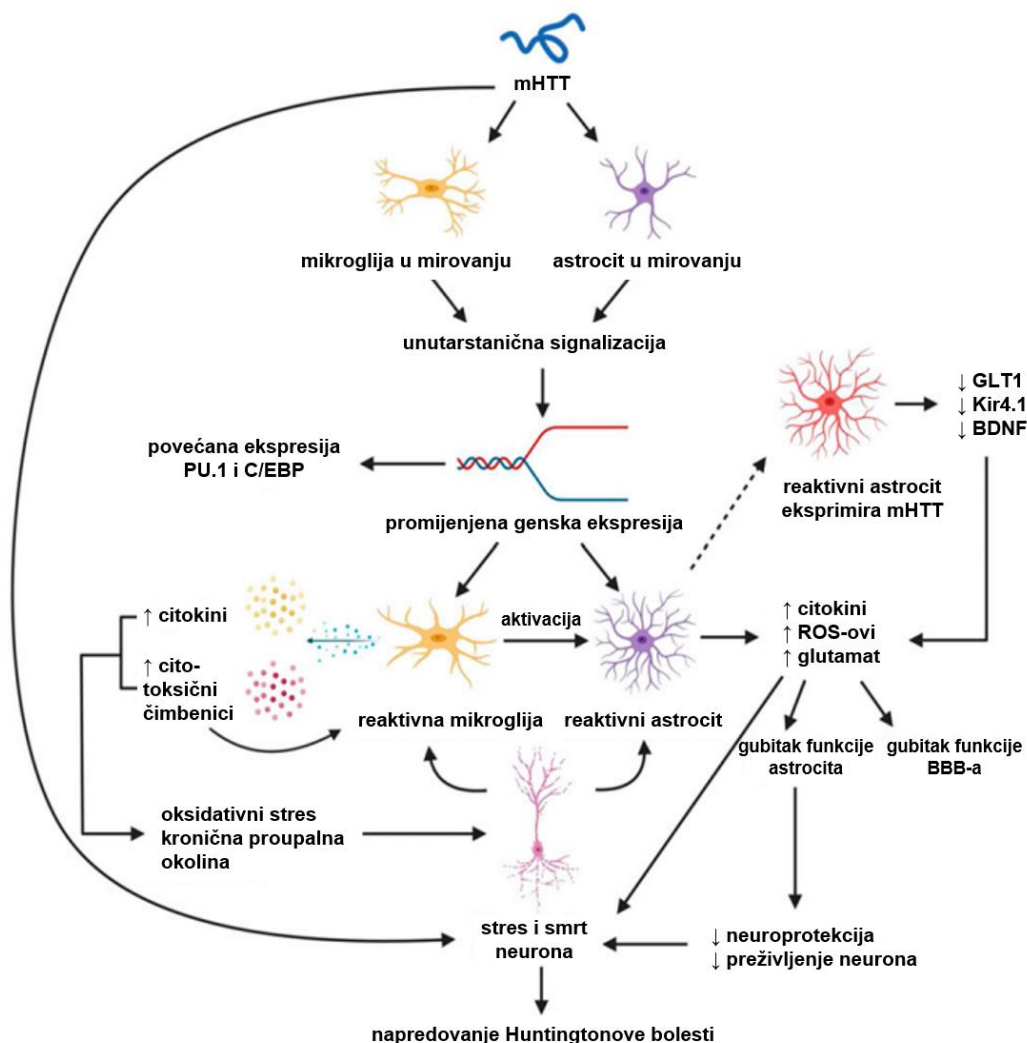
Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Mapiranje gena <i>HTT</i>	3
3. Kloniranje gena <i>HTT</i>	6
4. Genetička pozadina Huntingtonove bolesti	8
5. Terapija za Huntingtonovu bolest.....	10
5.1. Etički problemi u začetima terapije	10
5.2. Genska terapija	11
5.2.1. Povijesni razvoj genske terapije	11
5.2.2. Genska terapija za Huntingtonovu bolest.....	12
5.2.3. ASO lijekovi.....	16
6. Zaključak.....	17
7. Literatura.....	18

1. Uvod

Huntingtonova bolest, nazvana prema američkome liječniku Georgeu Huntingtonu, genetički je uvjetovan progresivni neurodegenerativni poremećaj koji se nasljeđuje dominantno autosomalno na p-kraću četvrtoga kromosoma (Gusella i sur. 1983). Ta je bolest jedna od devet dominantnih bolesti živčanoga sustava nastalih ponavljanjima poliglutamina, što dovodi do toksične hipernefunkcionalne mutacije (engl. *gain of function*) i nastanku proteinskih agregata (Harper i sur. 2005). Očituje se u drhtanju (nekontroliranim pokretima), nespretnosti, problemima u kretanju, gutanju, govorenju i disanju, tikovima, naglim promjenama ponašanja, gubitku tjelesne mase i depresiji (NHS 2021), a sve su te pojave rezultat preuranjenoga propadanja bazalnih ganglija (Gusella i sur. 1983) zbog mutacije u proteinu huntingtinu (Southwell i Patterson 2011). Protein huntingtin veliki je protein (328 kDa) kodiran genom *HTT*, čije se tripletne repeticije CAG transliraju u poliglutaminski lanac (Bates 2005). Funkcionalni protein sudjeluje u brojnim procesima u stanici, poput transkripcijske regulacije, supresije apoptoze, signalizaciji u stresu, homeostaze kalcija i endocitozi (Zuccato i sur. 2010). Mutacijom huntingtina povećava se broj ponavljajućih sljedova CAG, protein se pogrešno smata, te dobiva toksična svojstva i interferira s radom drugih proteina (Eje i sur. 2023), poput transkripcijskih regulatornih proteina. Interakcije mutiranoga huntingtina s kalmodulinom, gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenazom i dvama *huntingtin protein-interacting* proteinima narušavaju normalni stanični metabolizam i dovode do toksičnosti (Sari 2011). Mutirani HTT potiče i agregaciju divljega tipa HTT (Busch i sur. 2003). Agregati mutiranoga huntingtina uzrokuju poremećaj funkcije mitohondrija, neuronski stres, egzocitotoksičnost i neuroinflamaciju (Ferguson i sur. 2022) (Slika 1). Huntingtonova bolest najčešće se manifestira kasnije u životu, tipično između 30. i 45. godine života (Chial 2008), no zabilježeni su i slučajevi pojave simptoma, i to znatno jačih, u ranijoj životnoj dobi (MacDonald i sur. 1993). Smrt najčešće nastupa 10 – 15 godina nakon pojave prvih simptoma (Harper i sur. 2005). U svojem radu Gusella i sur. (1983) navode kako „zasad nema pouzdane metode liječenja ove bolesti, kao ni učinkovite terapije”. Tridesetak godina kasnije Southwell i Patterson u svojem radu (2011) navode da „iako su trenutačno dostupne terapije usredotočene na ublažavanje simptoma, autosomno dominantni uzrok i pojava u odrasloj dobi čini ovu bolest idealnim kandidatom za genetičku intervenciju”. Bez

obzira na to što su istraživanja o ovoj temi brojna, pomaka u liječenju u zadnjih dvadesetak godina gotovo da ni nema (Ferguson i sur. 2022).



Slika 1. Mehanizmi patogeneze Huntingtonove bolesti. Preuzeto od i prilagođeno prema Ferguson i sur. (2022).

Dovezujući se na opaske svojega oca i djeda, mladi liječnik George Huntington (1850. – 1916.) nastavlja proučavati pojavu demencije i koree u rodnome mjestu East Hamptonu (New York). S obzirom na to da su se ovi poremećaji zadržavali u određenim obiteljima, on je zaključio da se radi o nasljednoj bolesti. Kada su mu bile samo 22 godine, prezentira svoja opažanja u radu *On chorea* pred *Meigs and Mason Academy of Medicine at Middleport*. Ondje je napisao: „Kada su jedan roditelj ili oboje pokazali manifestacije bolesti, jedan potomak ili više njih neizbježno je oboljelo... (bolest) nikada ne preskoči generaciju da bi se ponovno pojavila u drugoj...” (Huntington 1872).

Ovime se već naslućuje da se radi o dominantnoj autosomalnoj genetskoj bolesti. Iako George Huntington nije bio prvi koji je opisao ovu bolest, njegova objašnjenja i jasnoća izražavanja jesu ono što je obilježilo njegova istraživanja, a to mu je donijelo i eponim „Huntingtonova bolest” (HD), koja je isprva bila poznata kao „Huntingtonova korea” (Bhattacharyya 2016). Nažalost, njegovu radu nije pripisana velika uloga sve do 1900. godine, kada je znanost spoznala važnost Mendelovih zakona nasljeđivanja, koje se Huntingtonova bolest slijedila (Bates 2005).

Cilj je ovoga rada pobliže opisati fenotip i genetičke aspekte Huntingtonove bolesti te prikazati povijest istraživanja mutacije koja uzrokuje ovu bolest od perioda genskoga mapiranja, preko kloniranja odgovornoga gena i ranih terapijskih metoda do modernih genskih terapija kojima je cilj ne samo ublažiti simptome ove bolesti nego zaustaviti ili barem usporiti njezinu progresiju.

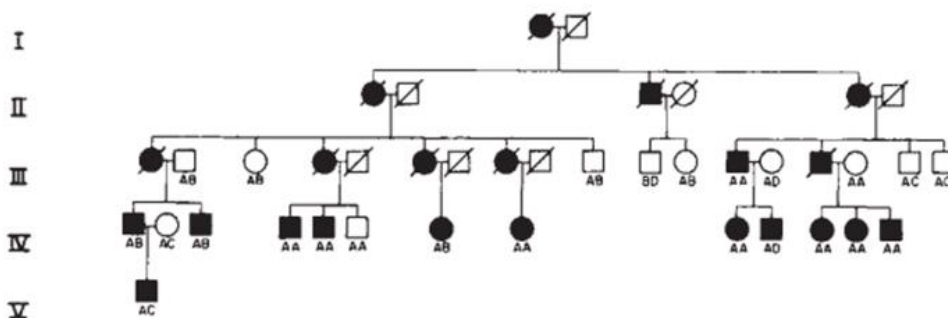
2. Mapiranje gena *HTT*

Gen *HTT* ili *HD*, koji kodira za toksični protein huntingtin (HTT) prvi je gen mapiran molekularnim biljezima (markerima) na ljudskome kromosomu (Chial 2008; Gusella i sur. 1983). Gensko mapiranje proces je određivanja lokacije genskoga lokusa na kromosomu odgovornoga za fenotip (u ovome slučaju bolest), što je temelj za daljnja istraživanja i terapiju. Problemi u mapiranju gena odgovornoga za Huntingtonovu bolest bili su kasna manifestacija bolesti kod oboljelih, nedostatak ljudi za testiranje i nedostatak genetičkih biljega (Gusella i sur. 1983). Razvojem znanosti razvijaju se i nove tehnike istraživanja, pa se tako 1970-ih i 1980-ih godina pojavljuju biljezi RFLP (engl. *restriction fragment length polymorphism*) koji opisuju polimorfizam duljine restrikcijskih fragmenata (Gusella i sur. 1983). RFLP je tehnika usporedbe fragmenata različitih duljina nastalih digestijom specifičnim restrikcijskim endonukleazama kojom se mogu uočiti razlike (polimorfizmi) u homolognim sekvencijama DNA (National Library of Medicine 2017). Ukratko, usporedbom homolognih fragmenata DNA kod zdravih i bolesnih pojedinaca i uočenih razlika među njima, može se pretpostaviti da ta razlika odgovorna za nastanak bolesti (Bates 2005). Kao molekularni biljezi RFLP-ovi su izrazito specifični, a sonde napravljene na temelju njih hibridiziraju s fragmentima digerirane DNA dajući jedinstveni uzorak (obrazac) karakterističan za određeni genotip na određenome lokusu (National Library of Medicine 2017).

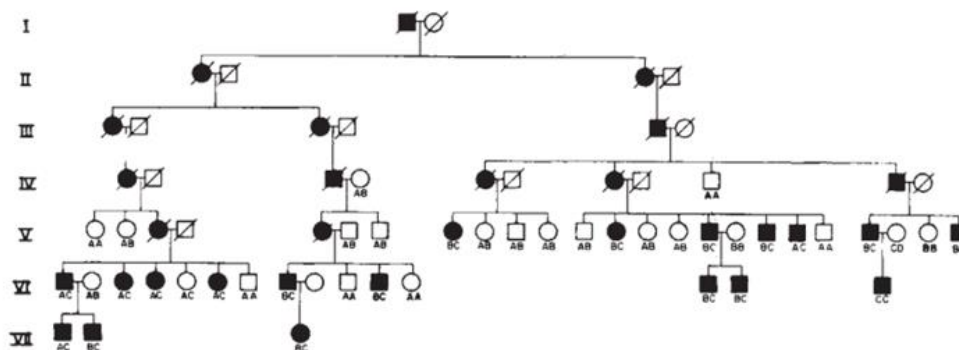
Za mapiranje gena za Huntingtonovu bolest kao subjekti istraživanja uzete su dvije obitelji, koje su zbog zaštite identiteta njihovih članova nazvane američka i venezuelanska. U tim je dvjema

obiteljima ova bolest bila izrazito česta (Slika 2). Godine 2005. venezuelanska obitelj obuhvaćala je 15 409 članova koji su se protezali kroz deset naraštaja. Porodica potekla od samo jednoga oboljelog pretka iz 19. stoljeća dijelila se u 83 uže, neovisne obitelji. U to vrijeme zastupljenost Huntingtonove bolesti u proučavanoj venezuelanskoj obitelji, nastanjenoj oko jezera Maracaibo, bila je rekordna u svijetu. Obje su navedene obitelji ispitane, a istraživanja su se vršila na njihovim eritrocitima i limfocitima. Cilj je bio pronaći DNA sondu koja bi hibridizirala s biljegom RFLP povezanim s Huntingtonovom bolešću u kromosomskoj DNA pocijepanoj restriksijskom endonukleazom *HindIII* (Chial 2008; Gusella i sur. 1983). Neke su sonde bile sljedovi DNA tada već poznatih genskih lokusa, a druge su bile tzv. anonimne sonde, odabrane jer nisu sadržavale ponavljajuće sljedove.

(A) američka obitelj s Huntingtonovom bolešću



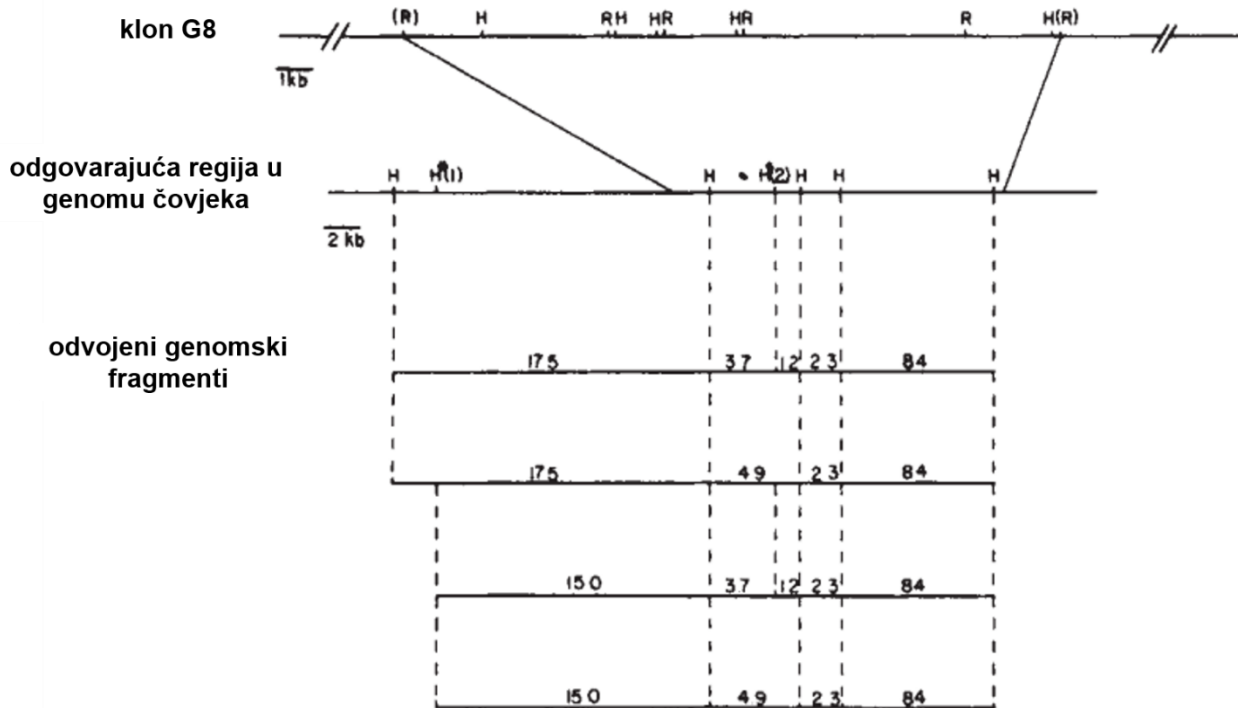
(B) venezuelanska obitelj s Huntingtonovom bolešću



Slika 2. Rodoslovna stabla dviju obitelji s Huntingtonovom bolešću koje su bile ispitivane u pokusu koji je omogućio mapiranje gena za tu bolest. Preuzeto od i prilagođeno prema Gusella i sur. (1983). Legenda: krug označava ženskoga člana, kvadrat – muškarac, crno obojenje – preminuli član obitelji, bijelo obojenje – živi član obitelji.

Od 12 potencijalnih sonda samo je sonda G8 hibridizirala s jedinstvenim RFLP biljgom povezanim s bolešću. Ona je pokazala specifični RFLP uzorak povezan s Huntingtonovom bolešću u dvjema velikim obiteljima s poviješću učestalih oboljenja. Klon G8 dobiven je iz DNA biblioteke bakteriofaga λ . Usporedbom fragmenata DNA nastalih cijepanjem restriksijskim endonukleazama *HindIII* i *EcoRI* i hibridizacijom sonde G8 na te fragmente metodom *Southern blot* otkriveno je da promjene duljina restriksijskih fragmenata u ovisnosti o prisutnosti navedenih endonukleaza ukazuju na nasljeđivanje po Mendelu. Usporedbom dvaju restriksijskih mjesta na kojima cijepa endonukleaza *HindIII*, utvrđena je razlika u duljini fragmenata među različitim haplotipovima (Slika 3). Kako bi se odredilo na kojemu se kromosomu čovjeka nalazi gen za Huntingtonovu bolest, sekvencija G8, koja odgovara polimorfnoj kromosomskoj regiji u blizini huntingtina (Chial 2008; Gusella i sur. 1983), mapirana je na ljudskim kromosomima korištenjem hibridnih stanica ljudi i miševa. U mišje stanice ubacili su određeni broj kromosoma čovjeka (najmanje pet, najviše 21) i promatrali metodom *Southern blot* s kojim će kromosomom hibridizirati sonda G8. Fragmenti detektirani sondom G8 ukazivali su na to da se sekvencija G8, pa tako i sekvencija Huntingtonova gena, nalazi na kromosomu 4 (Gusella i sur. 1983). Nakon što se odredilo na kojemu se kromosomu gen nalazi, trebalo je njegovu lokaciju mapirati preciznije.

Istraživanju o Huntingtonovoj bolesti također je značajno doprinijela Nancy Wexler, psihoanalitičarka s *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke* u Marylandu. Nadahnuta istraživanjima America Negrettea i Ramona Ávila-Giróna, dvojice liječnika koji su proučavali istu venezuelansku obitelj kao i James Gusella, i motivirana time što su joj majka i djed oboljeli od ove bolesti (Bhattacharyya 2016), odlazi 1981. godine u okolicu jezera Maracaibo kako bi otkrila oboljele homozigote za *huntingtin* i prikupila potrebne podatke za mapiranje toga gena (Bates 2005). Budući da tada još nije bilo poznato je li Huntingtonova bolest heterogena, za proučavanje je najbolje bilo uzeti veliku obitelj koja potječe od jednoga utemeljitelja. Prikupljene uzorke krvi poslala je u laboratorij Jamesa Guselle, gdje je gen za Huntingtonovu bolest mapiran, s pomoću RFLP biljega G8, na p-kraku kromosoma 4 (Gusella i sur. 1983).



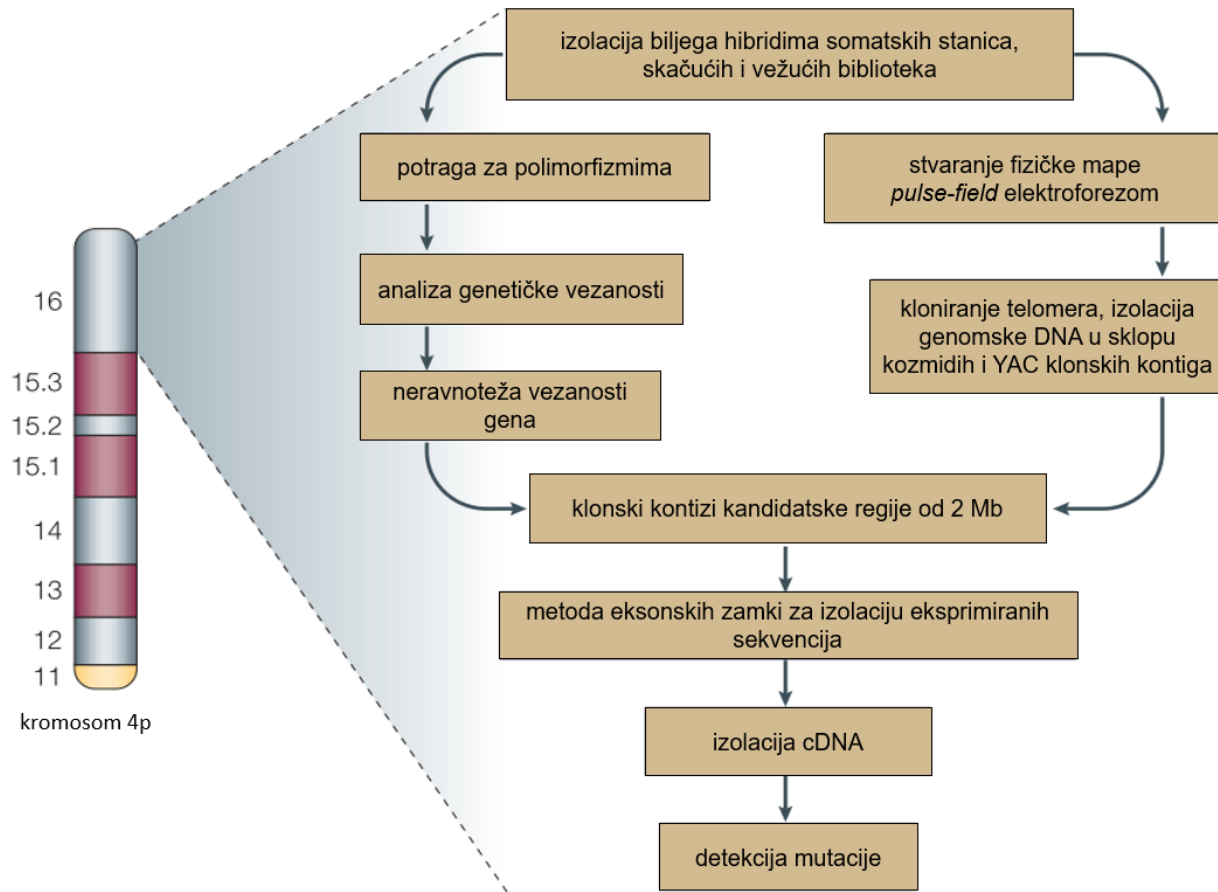
Slika 3. Restriksijska mapa inserta G8 i odgovarajuće regije ljudskoga kromosoma 4. Prikazana su dva restriksijska mjesta cijepanja endonukleazom *Hind*III: H*(1) i H*(2). Preuzeto od i prilagođeno prema Gusella i sur. (1983).

3. Kloniranje gena *HTT*

Mapiranje gena *HTT* utrla je put izolaciji gena, identificiranju mutacije koja uzrokuje Huntingtonovu bolest i otkrivanju molekularne patogeneze bolesti (Bates 2005). Pošto je gen za Huntingtonovu bolest mapiran na kromosomu 4, *The Huntington's Disease Collaborative Research Group* počela je s daljnjim istraživanjima u svrhu identifikacije i opisa toga gena. Pretpostavili su da se mutacija najvjerojatnije nalazi u samome genu, a ne u nekodirajućoj regiji, te su se usredotočili na proučavanje kodirajućih sljedova (Chial 2008; MacDonald i sur. 1993). Kako bi preciznije identificirali gdje se na p-kraku kromosoma 4 nalazi taj gen, znanstvenici su nastojali otkriti koji su polimorfizmi u neravnoteži vezanosti gena (engl. *linkage disequilibrium* – LD) s genom *HTT* (Bates 2005). Tražili su da se vezanost dvaju lokusa pojavljuje u postotku različitome od očekivanoga (Struna 2011). Dakle, htjeli su pronaći polimorfni DNA biljeg koji prati fenotipske razlike u manifestaciji bolesti, odnosno zdrave i oboljele pojedince koji se sustavno razlikuju u polimorfizmima promatranoga DNA biljega. Pronalazak takva biljega značio bi da se

on nalazi u neposrednoj blizini gena *HTT* i da između njih nikada ne dolazi do rekombinacije (Gunjača 2022). Da bi to postigli, analizirali su učestalost kojom su specifični polimorfizmi povezani s Huntingtonovom bolešću naslijeđeni skupa s mutacijom u genu *HTT* (Bates 2005). Analize LD-a, nadovezujući se na prethodna istraživanja koja su pošla od pretpostavke da je telomerna regija manje vjerojatno područje u kojemu bi se *HTT* mogao nalaziti (Bates i sur. 1990), pokazale su da će se *HTT* najvjerojatnije nalaziti u području 2 Mb bliže sekvenciji G8 nego telomernoj regiji (MacDonald i sur. 1991).

Sljedeći korak bio je kloniranje gena *HTT*. Zbog brojnih tehničkih ograničenja 1980-ih, poput maloga broja polimorfnih DNA biljega ograničenih samo na bialelne RFLP-ove, ograničene duljine DNA fragmenata koja je mogla biti sadržana u klonovima DNA biblioteka i ograničenja metode *chromosome walking* na samo 100 – 200 kb, trebale su se razviti nove tehnike i strategije kako bi se definirala i klonirala regija u kojoj se potencijalno nalazi gen *HTT* (Slika 4). Upotrebom nove metode eksonskih zamki (engl. *exon traps*) eksoni su izdvojeni iz biblioteke kozmida koji su sadržavali genomsku DNA iz regije od interesa koja se nalazila 2 Mb prema G8 (Buckler i sur. 1991). „Uhvaćeni” eksoni korišteni su za pretraživanje biblioteka cDNA kako bi se izolirali geni od interesa. Najvažniji gen od interesa bio je *IT15*. Jedan ekson ovoga gena sačinjavali su ponavljajući sljedovi tripleta dušičnih baza CAG. Taj se ekson nalazio upravo u okviru čitanja koji je pokazivao polimorfizam u normalnim kromosomima, a bio je još izraženiji na kromosomima koji su imali mutaciju koja rezultira Huntingtonovom bolešću (MacDonald i sur. 1993).



Slika 4. Paralelni put kloniranja gena *HTT* s pomoću analize neravnoteže vezanosti gena i stvaranja fizičkih mapa u svrhu detekcije kandidatne regije od 2 Mb. Klonski kontig set je preklapajućih klonova koji skupa sadržavaju neprekinutu (engl. *contiguous*) genomsku regiju (Green 2023). Preuzeto od i prilagođena prema Bates (2005).

4. Genetička pozadina Huntingtonove bolesti

Do 1991. godine uopće se nije znalo za mutacije uzrokovane ponavljajućim tripletima. Nakon što su one povezane s nastankom bolesti poput fragilnoga kromosoma X i miotonične distrofije, počelo se istraživati imaju li ljudi s Huntingtonovom bolešću ponavljanja takva tipa (Bates 2005). Godine 1992. Anita Harding s Queen Squarea u Londonu opazila je povezanost broja ponavljanja trinukleotida citozin-adenin-gvanin (CAG) u genu za protein huntingtin i težine Huntingtonove bolesti (Bhattacharyya 2016). Nadalje, daljnjim analizama utvrđeno je da ova bolest pokazuje anticipaciju ili dinamičnu mutaciju (Bates 2005), odnosno pojavu da se simptomi bolesti počinju pojavljivati sve ranije iz jednoga naraštaja u drugi i da postaju jači kako se bolest prenosi s jednoga

naraštaja na drugi (Ingram 2019). Usporedbom bolesnih i zdravih osoba otkrilo se da zdrave osobe imaju 6 – 35 ponavljanja tripleta CAG, dok ih oboljele osobe imaju 40 ili više. Ljudi s alelima koji imaju (CAG)_{36–39} pokazuju veći rizik za razvitak ove bolesti (Rubinsztein i sur. 1996). Također je uočen obrnuto proporcionalan odnos broja ponavljanja tripleta CAG i dobi u kojoj pojedinci obolijevaju, pa tako ponavljanja (CAG)₇₀ izazivaju bolest u jako ranoj dobi (Duyao i sur. 1993; Bates 2005;). Broj ponavljanja sljedova CAG nije jedino što utječe na dob razvoja bolesti. Moguće je da se dob u kojoj bi se bolest trebala pojaviti prema pretpostavci donesenoj na temelju broja ponavljajućih sljedova CAG i dob u kojoj se bolest zapravo pojavila ne poklapaju. Ta varijabilnost može biti čak i do 59 %, a može se pripisati genetičkim čimbenicima koji nisu povezani s genom HTT, ali i okolišnim čimbenicima poput prehrane i životnih uvjeta. (Wexler i sur. 2004). Broj tripleta CAG mijenja se prijenosom s jednoga naraštaja na drugi, a te su promjene izrazito zastupljene u spermijima, tako da se Huntingtonova bolest najčešće prenosi s oca na potomstvo (Duyao i sur. 1993; Ranen i sur. 1995) iako su moguće i mutacije *de novo* (Bates 2005).

Godine 1995. tri neovisne skupine znanstvenika pokazale da je huntingtin važan u embrijskome razvoju jer su *knock-out* miševi za gen *HTT* uginuli tijekom embriogeneze (Duyao i sur. 1995; Nasir i sur. 1995; Zeitlin i sur. 1995). To je pokrenulo brojna istraživanja na proteinu HTT. Otkriveno je da sadrži ponavljajuće sljedove od oko 40 aminokiselina s α -uzvojnica koje se slažu tako da formiraju izduljenu superuzvojnica (Andrade i Bork 1995), a i interakcije između huntingtina i drugih proteina postale su predmetom brojnih istraživanja (Bates 2005). Uočena je zanimljivost da poliglutaminski sljedovi mogu međusobno asociirati stvarajući agregate unakrsnim β -strukturama (Perutz i sur. 1994), što je jedan od poremećaja uočen, također, kod Parkinsonove i Alzheimerove bolesti (Bates 2005).

Prvi model Huntingtonove bolesti napravljen je 1996. godine na mišu. Ekson 1 u genu *HTT*, koji sadrži ponavljanja poliglutamina u onome rasponu koji izaziva bolest, eksprimiran je pod kontrolom ljudskih promotorskih sekvencija *HTT* (Mangiarini i sur. 1996). To je pokrenulo cijeli niz istraživanja ove bolesti na mišjem modelu. Tako su godinu dana kasnije u mozgovima takvih pokusnih miševa pronađeni ubikvitilirani proteinski agregati (Davies i sur. 1997) koji su također detektirani u mozgovima ljudi oboljelih od Huntingtonove bolesti (DiFiglia i sur. 1997). Usto, analiza razine receptora za neurotransmitere u miševa predviđala je da poremećaj regulacije transkripcije može biti jedan od ranih događaja u patogenezi Huntingtonove bolesti (Cha i sur.

1998). Nadalje, u jednome pokusu pokazano je da se gašenjem promotora za umjetni gen *HTT* nakon nastanka proteinskih agregata, oni raspadaju, a da se simptomi bolesti gube (Yamamoto i sur. 2000). Time je pokazano da se tretiranjem bolesti u ranome stadiju mogu izliječiti simptomi. Mapiranje gena *HTT* uvelike je pomoglo u otkrivanju bolesti prije pojave simptoma ili čak i prije rođenja, uz uvjet uzimanje uzoraka DNA od nekoliko članova obitelji.

5. Terapija za Huntingtonovu bolest

5.1. Etički problemi u začetima terapije

Nakon što je gen *HTT* kloniran, za otkrivanje bolesti potreban je uzorak samo pojedinca kojega se testira (Bates 2005). Kao i više-manje svako veće otkriće u znanosti, presimptomatsko testiranje dobilo je pomiješane kritike. I pozitivni i negativni ishodi prediktivnoga testiranja znali su uzdrmati obitelji. Zbog toga su *International Huntington Association* (IHA) i *Working Group on Huntington disease of the World Federation of Neurology* (WFN) izdali smjernice u kojima stoji da se „presimptomatsko testiranje treba ponuditi samo rizičnim osobama koje su imale odgovarajuće savjetovanje, potpuno su informirane i žele nastaviti” (Bates 2005). Ovo testiranje povlači za sobom još nekakve etičke probleme poput toga da se testiranje u djetinjstvu može odraziti više negativno nego pozitivno na dijete (Clarke 1994) ili toga da se ovim testiranjem mogu dobiti informacije o genetičkom statusu roditelja koji to možda ne želi znati (Benjamin i Lashwood 2000). Svi su ovi čimbenici, naravno, potaknuli brojne reakcije javnosti, a samo presimptomatsko testiranje nije odmah zaživjelo. Takvo se testiranje nazivalo i genetičkom diskriminacijom jer su postojali roditelji koji ne bi željeli dijete koje će gotovo sigurno imati kakvu bolest (Bates 2005). Ovo je bio jedan od slučajeva gdje se razmišljalo je li moralno pobaciti dijete za koje se zna da će biti osuđeno na otežani i vrlo vjerojatno kraći život. Treba li se pravo na život odnositi na sve slučajeve, uključujući i bolesti, ili je pak odgovor, kako je Richard Dawkins napisao na svojem profilu na *Twitteru*, „abortirati i pokušati ponovno. Nemoralno je na svijet donijeti (dijete s Downovim sindromom) ako imate izbor”.

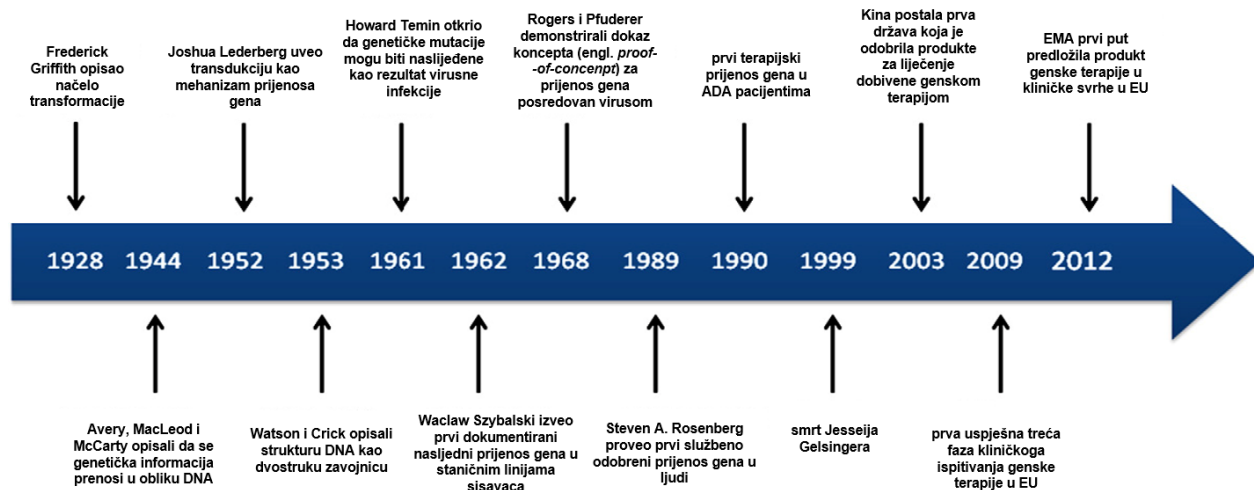
Kako navodi Bates (2005), razumijevanje Huntingtonove bolesti od 1983. godine eksponencijalno se povećalo, ali još uvijek ne postoji definirana terapija bolja od jednostavnoga ublažavanja simptoma. Neki su od takvih pokušaja bile stvari koje povećavaju transkripciju neuroprotektivnih gena poput histonskih deacetilaza, stvari koje sprječavaju apoptozu poput

inhibitora kaspaza i tvari koje inhibiraju nastanak poliglutaminskih agregata poput trehaloze i cistamina (Harper i sur. 2005). Interesantno je to što huntingtin ima mnogo funkcija u stanici, tako da terapija može biti usmjerena na velik broj nizvodnih čimbenika (Southwell i Patterson 2011). Selektivni inhibitori ponovnoga preuzimanja serotonina (SSRI) pomagali su s promjenama raspoloženja, manijama, iritabilnosti i opsesivno-kompulzivnim ponašanjem (Videnovic 2013), tetrabenazin je korišten protiv koree, antidepresivi citalopram, fluoksetin i sertralin protiv depresije te antipsihotici olanzapin i risperidon za stabilizaciju duševnoga stanja (Ferguson i sur. 2022; Southwell i Patterson 2011; Videnovic 2013). Svi ovi lijekovi samo su smanjivali simptome bolesti, ali ništa nije utjecalo na njezin napredak.

5.2. Genska terapija

Povijesni razvoj genske terapije

Otkriće prirodnih mehanizama za prijenos gena poput transdukcije (Slika 5) pobudilo je u brojnih znanstvenika viziju o upotrebi slične metode u terapijske svrhe. Genska terapija zasniva se na unosu strane DNA u tijelo s ciljem regulacije, popravka, zamjene, dodatka ili uklanjanja domaćinske sekvencije DNA (Wirth i sur. 2013). Potencijal za prijenos gena pronađen je u virusima, koji bi se s pomoću određenih genetičkih modifikacija mogli prilagoditi za učinkovitu terapiju (Tatum 1966), no u drugoj polovici 20. stoljeća takve su modifikacije bile još samo konceptne. Nakon Clineova neodobrena i djelomično neuspješna pokušaja genske terapije rekombinantnom DNA na dvama pacijentima s β -talasemijom 1990. godine, prvi medicinski odobren postupak genske terapije dogodio se 1995. godine. Blaese i sur. (1995) liječili su dvoje djece oboljele od deficijencije adenzin-deaminaze (ADA-SCID), ali bez značajnih i definiranih rezultata. Bez obzira na te rezultate genska terapija zaživjela je i počela se sve češće upotrebljavati, ali i razvijati. Huntingtonova bolest postala je cilj prvih kliničkih ispitivanja genske terapije među nasljednim poremećajima (Byun i sur. 2022).



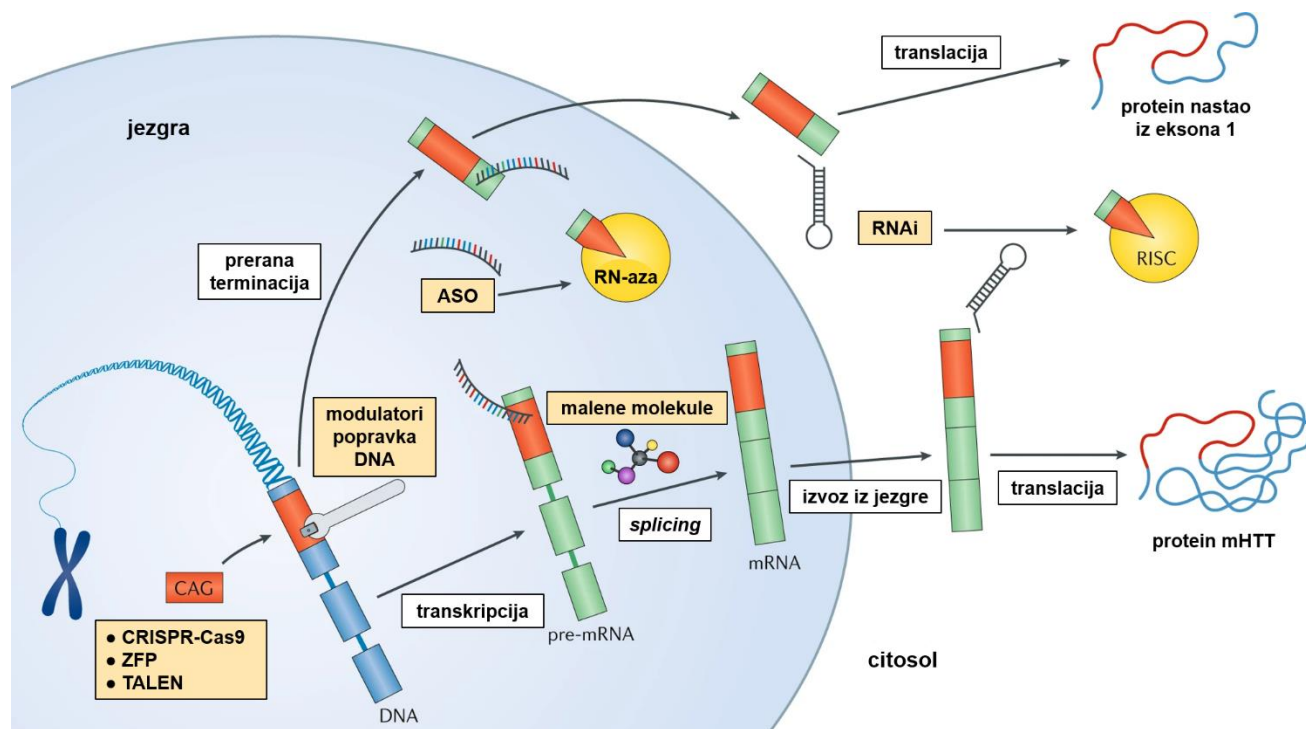
Slika 5. Vremenska crta s naznačenim važnim prekretnicama za gensku terapiju. Preuzeto od Wirth i sur. (2013).

Postoje tri vrste genske terapije: *in vivo*, *ex vivo* i *in situ*. U pristupu *ex vivo* odnosno *in vitro* ljudske stanice izoliraju se iz tijela, genetički modificiraju u laboratoriju i takve, „popravljene” vrate se u tijelo. Ovakav pristup našao je primjenu za bolesti krvnih stanica. U takvim se slučajevima retrovirusnim vektorima novi, zdravi gen u sklopu DNA unosi u izolirane stanice, koje se potom ponovno unose u tijelo pacijenta. Genska terapija *in vivo* koristi se ako su oboljeli organi poput mozga, jetre ili kralježničke moždine. Tada se virusni vektori koji sadrže „popravljeni” gen izravno unose u tijelo pacijenta kroz krv ili spinalnu tekućinu. Tehnika specifičnija od ove jest genska terapija *in situ*, koju karakterizira unos gena izravno u točno određeni organ ili tumor. Unos gena virusnim vektorima temelji se na prirodnoj integraciji virusnoga genoma u genom domaćina (Papanikolaou i Bosio 2021).

Genska terapija za Huntingtonovu bolest

Huntingtonova bolest pokušala se liječiti genskom terapijom na mišjem modelu raznim pristupima, poput poboljšanja nizvodne patologije, zamjene uništenih neurona ili smanjenjem razine ekspresije mutiranoga *HTT* (Southwell i Patterson 2011). Kao što je već navedeno, presimptomatsko liječenje Huntingtonove bolesti moguće je zbog jednostavne genetičke pozadine nasljeđivanja. U novije vrijeme istraživanja su se okrenula ka korijenu bolesti, odnosno sprječavanju njezina napredovanja. Za konkretno liječenje ove bolesti korištene su brojne metode.

One su uključivale terapije ciljnim regulacijskim molekulama *antisense* RNA i interferirajućim RNA, terapije ciljanim molekulama DNA, sustavom CRISPR-Cas, sustavom proteina s cinkovim prstima te terapije protutijelima (Slika 6). Zanimljive su i metode koje su ciljale na periferne ciljeve poput crijevne mikrobiote zbog njezine komunikacije s mozgom (Ferguson i sur. 2022).



Slika 6. Terapijske metode liječenja Huntingtonove bolesti smanjenjem ekspresije mutiranoga huntingtina. Preuzeto od i prilagođeno prema Tabrizi i sur. (2020).

Prva uspješna ciljana razgradnja mRNA mutiranoga huntingtina napravljena je upotrebom oligonukleotidne (~ 30 parova baza) molekule DNA koja ima enzimsku aktivnost cijepanja RNA. Te katalitičke DNA mjesno specifično prepoznaju i cijepaju mRNA, točnije ponavljajuće sljedove CAG. Nažalost, takvi dizajnirani DNA enzimi pokazali su se poprilično neučinkovitim i nespecifičnim jer su cijepali i mutiranu mRNA za huntingtin, ali i divlji tip. Tomu je tako jer ponavljajući sljedovi tvore ukosnicu, a povećanjem njihova broja ponavljanja u mutiranome fenotipu ne mijenja se sekundarna struktura, već samo njezina duljina. DNA enzimi također su cijepali druge mRNA koje su sadržavale ponavljajuće sljedove CAG. Kako i sami Yen i sur. (1999) priznaju, neučinkovitost cijepanja ovoga enzima isključuje njegovu upotrebu. Ipak, bez obzira na navedeno, ovi enzimi još uvijek mogu imati potencijalnu upotrebu uz dodatne modifikacije jer

redukcija huntingtina divljega tipa do 50 % u odraslih može biti fenotipski neutralna (Yen i sur. 1999).

Zanimljiv je bio pokušaj korištenja interferirajućih molekula RNA (RNAi) za smanjenje razine transkripta huntingtina (Harper i sur. 2005). U tome istraživanju pokazano je na modelu mišjega mozga da interferirajuće RNA usmjerene prema mutantnome huntingtinu reduciraju transkripciju gena *HTT* kao i ekspresiju proteina. Referirajući se na pokus Yamamota i sur. (2000), kojim je pokazano da se u miševima utišavanjem gena *HTT* simptomi gase i da se događa reverzija, Harper i sur. (2005) postavili su hipotezu da bi izravna inhibicija ekspresije mutanta *htt* RNA interferencijom molekulama RNA s kratkom ukosnicom (engl. *short hairpin RNAs* – shRNA) mogla usporiti ili potpuno eliminirati simptome Huntingtonove bolesti. Pokazano je da jedna shRNA (shHD2.1) djeluje na okrnjeni fragment patogenoga dijela transgena *htt* u mišu smanjujući transkripciju toga fragmenta za čak 85 % i količinu mutiranoga proteina za 55 %. Zanimljivo je da se isti ovaj rezultat u uvjetima *in vitro* opaža i *in vivo*. Iako konceptno vrlo zanimljiva ova ideja ima dvije glavne manjkavosti. Za početak, u ljudi oboljelih od Huntingtonove bolesti ovom je terapijom očekivana smanjena ekspresija i mutiranoga i normalnoga alela gena *HTT*. Postavlja se pitanje mogu li ljudski neuroni profitirati utišavanjem obaju alela. Nadalje, drugi je problem taj što bi za utišavanje samo mutiranoga alela trebalo identificirati i ispitati sve polimorfizme vezane uz bolest, što je zahtjevno, ali u načelu moguće *in vivo* (Harper i sur. 2005).

Kako bi se bolest uspješno liječila, terapijom se ciljalo na čimbenike rasta, primjerice, na čimbenik rasta živaca (engl. *nerve growth factor* – NGF), koji potiče preživljavanje živčanih stanica, a može i smanjiti ekspresiju proteina HTT. U transgenične miševu u kojima je ekspimiran mutirani huntingtin unesene se mezenhimske stanice s nadeksprimiranim NGF-om, što je umjereno poboljšalo motoriku oboljelih miševa, ali nije povećalo broj neurona (Dey i sur. 2010). Također, pokušalo se u oboljele miševu unijeti stanice koje imaju nadekspresiju moždanoga neurotrofnog čimbenika (engl. *brain-derived neurotrophic factor* – BDNF), koji smanjuje širenje lezija po živčanim stanicama i njihovu smrt. Taj je pokus ponovno rezultirao poboljšanom motorikom miševa, koja je inače narušena mutiranim huntingtinom (Dey i sur. 2010). Slično je bilo i s nizom drugih neurotrofnih čimbenika poput neurotrofnoga čimbenika izvedenoga iz glijalne stanične linije (engl. *glial cell line-derived neurotrophic factor* – GDNF) i neuturina (Ntn) (Southwell i Patterson 2011). Zanimljiv je pristup i normalizacija mitohondrijske funkcije unosom

transkripcijskoga koaktivatora PGC-1 α , koji ima važnu ulogu u regulaciji metabolizma mitohondrija i metabolizma energije. On je također popravio motoriku miševa, ali nije imao utjecaja na broj preživjelih (Cui i sur. 2006).

Sljedeći pristup borbi protiv Huntingtonove bolesti genskom terapijom bilo je smanjenje razine proteina HTT povećanjem razine njegove razgradnje. Takav pristup ima puno manju vjerojatnost za nespecifično djelovanje (tzv. *off-target*) u usporedbi s terapijom koja cilja na nizvodne funkcije HTT-a. Pokušalo se degradirati mutirani HTT specifičnim unutarstaničnim protutijelima (iAb) koja prepoznaju HTT i vežu se na njega (anti-Htt iAb). Takva unutarstanična protutijela EM48 i Happ1 uistinu su povećala razgradnju mutiranoga HTT-a (Wang i sur. 2008), odnosno smanjila pojavu agregata i povećala preživljenje oboljelih miševa za 30 % (Southwell i sur. 2009). Osim degradacije razina mutiranoga HTT-a može se smanjiti i indukcijom autofagije (Southwell i Patterson 2011). Lijekovima potaknuta autofagija nije specifična i može imati brojna nespecifična djelovanja. Međutim, pristup u kojemu se specifično cilja na mutirani oblik huntingtina proteinom koji se veže na poliglutaminsku regiju i označuje mutirani HTT za lizosomsku razgradnju pokazao se izrazito dobrim jer je značajno povećao stopu preživljenja oboljelih miševa (Bauer i sur. 2010).

Najizravniji način upotrebe genske terapije protiv mutiranoga huntingtina svakako je smanjenje njegove ekspresije. Od 2005. godine nekolicina je interferirajućih RNA bila korištena u ovu svrhu. Gotovo sve male interferirajuće RNA imale su pozitivna utjecaja na neki od simptoma bolesti, ali nijedna od njih nije dovela do potpunoga ozdravljenja. Najbolje što se dobilo bila je intraventrikularno unesena siRNA konjugirana s kolesterolom, koja je uspješno utišala mutirani HTT. To je rezultiralo odgođenim gubitkom tjelesne mase, poboljšanom koordinacijom pokreta, smanjenjem atrofije i povećanjem dugovječnosti za 14 % (Wang i sur. 2005). Sve ove pristupe treba uzeti s oprezom jer brojni pokusi napravljeni u miševima ne pokazuju jednake rezultate u čovjeku.

Najnovija metoda u terapiji za Huntingtonovu bolest služi se sustavom CRISPR-Cas9. U stanicama ljudskih fibroblasta mutirani oblik huntingtina vrlo je precizno cijepan parom prenamijenjenih nikaza Cas9. Duljina ponavljajućega slijeda CAG nije utjecala na preciznost cijepanja, a količina mutiranoga huntingtina smanjila se za oko 70 % (Dabrowska i sur. 2018). U tijeku je i razradba terapije koja inducira nastanak delecije u alelu za mHTT, što ga inaktivira, a nema utjecaja na alel divljega tipa (Ferguson i sur. 2022).

ASO lijekovi

Većina terapija usmjerenih na DNA i RNA u 2022. godini zastala je u nekome stadiju kliničkoga ispitivanja. Prvi primjer *antisense* specifičnoga oligonukleotidnog (ASO) lijeka jesu WVE-120101 i WVE-120102 američke tvrtke *Wave Life Sciences* (Ferguson i sur. 2022). To su alelni specifični oligonukleotidi koji ciljaju na dva različita polimorfizma jednoga nukleotida (SNP-ovi) vezana uz mutirani huntingtin. Budući da su alelni specifični, ne djeluju na divlji tip alela *HTT*. Nažalost, s obzirom na to da su SNP-ovi neuniverzalni, ovi lijekovi zasebno djeluju samo na užu populaciju oboljelih. Međutim, u kombinaciji mogu izliječiti gotovo 80 % oboljelih Europljana (Rodrigues i Wild 2018). Iako su preliminarni rezultati ispitivanja, nazvanih PRECISION-HD1 i PRECISION-HD2, puno obećavali za upotrebu ovih dvaju lijekova, naposljetku je utvrđeno da nema značajne razlike u utjecaju na mutirani *HTT* između lijeka i placeba, te su ispitivanja prekinuta (Ferguson i sur. 2022).

Trenutačno je najrazvijeniji ASO lijek protiv Huntingtonove bolesti tominersen. To je lijek švicarske tvrtke *Roche* namijenjen smanjenju svih oblika *HTT*-a, uključujući i njegov mutirani oblik (Ionis Pharmaceuticals 2023). Tominersen je *antisense* specifični oligonukleotid (ASO) koji se veže za *HTT* i šalje ga na degradaciju RN-azom H1. U odnosu na WVE-120101 i WVE-120102 negativnije je to što se tominersen veže alelni nespecifično, dakle veže se i na alel *HTT* divljega tipa. Unosi se injekcijom izravno u moždinu. Istraživanja na lijeku završila su 2019. godine, a u pretkliničkoj fazi istraživanja dao je veliku nadu znanstvenicima jer je revertirao mutirani fenotip, poboljšao preživljenje i smanjio moždanu atrofiju na mišjim modelima (Kordasiewicz i sur. 2012). U trećoj fazi kliničkih istraživanja, nazvanoj GENERATION HD1, 800 pacijenata podvrgnuto je ispitivanju na tominersen. Lijek nikada nije prošao treći stupanj kliničkoga ispitivanja jer se zbog nepoznatih razloga pacijentima koji su primili najveće doze lijeka (120 mg) stanje pogoršalo u odnosu na one koji su primali placebo. Analizom *post hoc* utvrđeno je da tominersen jest pomogao određenoj skupini pacijenata – mladima i onima s manje izraženim simptomima. U tijeku je novo istraživanje, GENERATION HD2. U tome će ispitivanju sudjelovati oko 360 ispitanika između 25 i 50 godina, a davat će im se manje doze lijeka, 60 i 100 mg u usporedbi sa 120 mg u GENERATION HD1. Istraživanje će trajati 16 mjeseci (Harding 2023).

6. Zaključak

Huntingtonova bolest dominantna je autosomalna bolest za koju nema lijeka. Ne postoje nikakve korištene terapije koje bi spriječile začetak te bolesti ili njezinu progresiju. Simptomi se mogu tretirati raznoraznim lijekovima koji umanjuju koreu ili depresiju, ali bolest nastavlja napredovati. Potencijalno najveći problem današnjih mogućih lijekova mogao bi biti taj što neuspješno ciljaju samo mutirani HTT. Često je degradiran i divlji tip alela, drugi aleli slične sekvencije ili su blokirani drugi procesi koji obavlja zdravi huntingtin (Mestre i Sampaio 2017). Trebalo bi, dakle, raditi na povećanju specifičnosti terapeutika. Najspecifičnija metoda koja trenutačno daje najviše nade za pronalazak lijeka zasigurno je terapija *antisense* oligonukleotidnim molekulama RNA poput lijeka tominersena čije se djelovanje trenutačno ispituje. S nedavnim otkrićem novoga lijeka lecanemaba, koji značajno usporava Alzheimerovu bolest (van Dyck i sur. 2023), također jedan neurodegenerativni poremećaj koji je posljedica nastajanja proteinskih agregata u mozgu, otvara se perspektiva slične imunoterapije i za Huntingtonovu bolest.

7. Literatura

- Andrade M.A., Bork P. (1995): HEAT repeats in the Huntington's disease protein. *Nat. Genet.* **11**: 115–116.
- Bates G.P. (2005): The molecular genetics of Huntington disease - A history. *Nat. Rev. Genet.* **6**: 766–773.
- Bates G.P., MacDonald M.E., Baxendale S., Sedlacek Z., Youngman S., Romano D., Whaley W.L., Allitto B.A., Poustka A., Gusella J.F., Lehrach H. (1990): A yeast artificial chromosome telomere clone spanning a possible location of the Huntington disease gene. *Am. J. Hum. Genet.* **46**: 762–775.
- Bauer P.O., Goswami A., Wong H.K., Okuno M., Kurosawa M., Yamada M., Miyazaki H., Matsumoto G., Kino Y., Nagai Y., Nukina N. (2010): Harnessing chaperone-mediated autophagy for the selective degradation of mutant huntingtin protein. *Nat. Biotechnol.* **28**: 256–263.
- Benjamin C.M., Lashwood A. (2000): United Kingdom experience with presymptomatic testing of individuals at 25% risk for Huntington's disease. *Clin. Genet.* **58**: 41–49.
- Bhattacharyya K.B. (2016): The story of George Huntington and his disease. *Ann. Indian Acad. Neurol.* **19**: 25–28.
- Buckler A.J., Chang D.D., Graw S.L., David Brook J., Haber D.A., Sharp P.A., Housman D.E. (1991): Exon amplification: A strategy to isolate mammalian genes based on RNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**: 4005–4009.
- Busch A., Engemann S., Lurz R., Okazawa H., Lehrach H., Wanker E.E. (2003): Mutant huntingtin promotes the fibrillogenesis of wild-type huntingtin: A potential mechanism for loss of huntingtin function in Huntington's disease. *J. Biol. Chem.* **278**: 41452–41461.
- Byun S., Lee M., Kim M. (2022): Gene Therapy for Huntington's Disease: The Final Strategy for a Cure? *J. Mov. Disord.* **15**: 15–20.
- Cha J.H.J., Kosinski C.M., Kerner J.A., Alsdorf S.A., Mangiarini L., Davies S.W., Penney J.B., Bates G.P., Young A.B. (1998): Altered brain neurotransmitter receptors in transgenic mice

- expressing a portion of an abnormal human Huntington disease gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**: 6480–6485.
- Chial H. (2008): Huntington's disease: The discovery of the Huntingtin gene. *Nat. Educ.* **1**: 71.
- Clarke A. (1994): The genetic testing of children. Working Party of the Clinical Genetics Society (UK). *J. Med. Genet.* **31**: 785–797.
- Cui L., Jeong H., Borovecki F., Parkhurst C.N., Tanese N., Krainc D. (2006): Transcriptional Repression of PGC-1 α by Mutant Huntingtin Leads to Mitochondrial Dysfunction and Neurodegeneration. *Cell* **127**: 59–69.
- Dabrowska M., Juzwa W., Krzyzosiak W.J., Olejniczak M. (2018): Precise Excision of the CAG Tract from the Huntingtin Gene by Cas9 Nickases. *Front. Neurosci.* **12**: 75.
- Davies S.W., Turmaine M., Cozens B.A., DiFiglia M., Sharp A.H., Ross C.A., Scherzinger E., Wanker E.E., Mangiarini L., Bates G.P. (1997): Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell* **90**: 537–548.
- Dey N.D., Bombard M.C., Roland B.P., Davidson S., Lu M., Rossignol J., Sandstrom M.I., Skeel L.R., Lescaudron L., Dunbar G.L. (2010): Genetically engineered mesenchymal stem cells reduce behavioral deficits in the YAC 128 mouse model of Huntington's disease. *Behav. Brain Res.* **214**: 193–200.
- DiFiglia M., Sapp E., Chase K.O., Davies S.W., Bates G.P., Vonsattel J.P., Aronin N. (1997): Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science* (80-.). **277**: 1990–1993.
- Duyao M., Ambrose C., Myers R., Novelletto A., Persichetti F., Frontali M., Folstein S., Ross C., Franz M., Abbott M., Gray J., Conneally P., Young A., Penney J., Hollingsworth Z., Shoulson I., Lazzarini A., Falek A., Koroshetz W., Sax D., Bird E., Vonsattel J., Bonilla E., Alvir J., Conde J.B., Cha J.H., Dure L., Gomez F., Ramos M., Sanchez-Ramos J., Snodgrass S., De-Young M., Wexler N., Moscovitz C., Penchaszadeh G., Macfarlane H., Anderson M., Jenkins B., Srinidhi J., Barnes G., Gusella J., Macdonald M. (1993): Trinucleotide repeat length instability and age of onset in Huntington's disease. *Nat. Genet.*

4: 387–392.

- 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* (80-.). **269**: 407–410.
- Dyck C.H. van, Swanson C.J., Aisen P., Bateman R.J., Chen C., Gee M., Kanekiyo M., Li D., Reyderman L., Cohen S., Froelich L., Katayama S., Sabbagh M., Vellas B., Watson D., Dhadda S., Irizarry M., Kramer L.D., Iwatsubo T. (2023): Lecanemab in Early Alzheimer's Disease. *new Engl. J. o f Med.* **388**: 9–21.
- Eje O.E., Ogbonna C.V., Samson C., Nduka F.O. (2023): Review Article : Huntington Disease : Mechanism of Pathogenesis and Recent Developments in Its Therapeutic Strategies- A Short Review. doi:10.22034/JCR.2023.362508.1194.
- Ferguson M.W., Kennedy C.J., Palpagama T.H., Waldvogel H.J., Faull R.L.M., Kwakowsky A. (2022): Current and Possible Future Therapeutic Options for Huntington's Disease. *J. Cent. Nerv. Syst. Dis.* **14**: 117957352210925.
- Gusella J.F., Wexler N.S., Conneally P.M., Naylor S.L., Anderson M.A., Tanzi R.E., Watkins P.C., Ottina K., Wallace M.R., Sakaguchi A.Y., Young A.B., Shoulson I., Bonilla E., Martin J.B. (1983): A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature* **306**: 234–238.
- Harper S.Q., Staber P.D., He X., Eliason S.L., Martins I.H., Mao Q., Yang L., Kotin R.M., Paulson H.L., Davidson B.L. (2005): RNA interference improves motor and neuropathological abnormalities in a Huntington's disease mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**: 5820–5825.
- Huntington G. (1872): On chorea. *Med. Surg. Report. Philadelphia.*
- Ingram K. (2019): What is Genetic Anticipation? *News - Med. Life Sci.* at <<https://www.news-medical.net/life-sciences/What-is-Genetic-Anticipation.aspx>>.
- Kordasiewicz H.B., Stanek L.M., Wancewicz E. V., Mazur C., McAlonis M.M., Pytel K.A., Artates J.W., Weiss A., Cheng S.H., Shihabuddin L.S., Hung G., Bennett C.F., Cleveland D.W. (2012): Sustained Therapeutic Reversal of Huntington's Disease by Transient

- Repression of Huntingtin Synthesis. *Neuron* **74**: 1031–1044.
- MacDonald M.E., Ambrose C.M., Duyao M.P., Myers R.H., Lin C., Srinidhi L., Barnes G., Taylor S.A., ... Harper P.S. (1993): A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* **72**: 971–983.
- MacDonald M.E., Lin C., Srinidhi L., Bates G., Altherr M., Whaley W.L., Lehrach H., Wasmuth J., Gusella J.F. (1991): Complex patterns of linkage disequilibrium in the Huntington disease region. *Am. J. Hum. Genet.* **49**: 723–734.
- 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 I of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell* **87**: 493–506.
- Mestre T.A., Sampaio C. (2017): Huntington Disease: Linking Pathogenesis to the Development of Experimental Therapeutics. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* **17**: 18.
- Nasir J., Floresco S.B., O'Kusky J.R., Diewert V.M., Richman J.M., Zeisler J., Borowski A., Marth J.D., Phillips A.G., Hayden M.R. (1995): Targeted disruption of the Huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes. *Cell* **81**: 811–823.
- Papanikolaou E., Bosio A. (2021): The Promise and the Hope of Gene Therapy. *Front. Genome Ed.* **3**: 1–14.
- Perutz M.F., Johnson T., Suzuki M., Finch J.T. (1994): Glutamine repeats as polar zippers: Their possible role in inherited neurodegenerative diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**: 5355–5358.
- Ranen N.G., Stine O.C., Abbott M.H., Sherr M., Codori A.M., Franz M.L., Chao N.I., Chung A.S., Pleasant N., Callahan C., Kasch L.M., Ghaffari M., Chase G.A., Kazazian H.H., Brandt J., Folstein S.E., Ross C.A. (1995): Anticipation and instability of IT-15 (CAG)(N) repeats in parent-offspring pairs with Huntington disease. *Am. J. Hum. Genet.* **57**: 593–602.
- Rodrigues F.B., Wild E.J. (2018): Huntington's disease clinical trials corner: February 2018. *J. Huntingtons. Dis.* **7**: 88–97.

- Rubinsztein D.C., Leggo J., Coles R., Almqvist E., Biancalana V., Cassiman J.J., Chotai K., Connarty M., Craufurd D., Curtis A., Curtis D., Davidson M.J., Differ A.M., Dode C., Dodge A., Frontali M., Ranen N.G., Stine O.C., Sherr M., Abbott M.H., Franz M.L., Graham C.A., Harper P.S., Hedreen J.C., Jackson A., Kaplan J.C., Losekoot M., MacMillan J.C., Morrison P., Trottier Y., Novelletto A., Simpson S.A., Theilmann J., Whittaker J.L., Folstein S.E., Ross C.A., Hayden M.R. (1996): Phenotypic characterization of individuals with 30-40 CAG repeats in the Huntington disease (HD) gene reveals HD cases with 36 repeats and apparently normal elderly individuals with 36-39 repeats. *Am. J. Hum. Genet.* **59**: 16–22.
- Sari Y. (2011): Huntington’s disease: From mutant huntingtin protein to neurotrophic factor therapy. *Int. J. Biomed. Sci.* **7**: 89–100.
- Southwell A.L., Ko J., Patterson P.H. (2009): Intrabody gene therapy ameliorates motor, cognitive, and neuropathological symptoms in multiple mouse models of Huntington’s disease. *J. Neurosci.* **29**: 13589–13602.
- Southwell A.L., Patterson P.H. (2011): Gene therapy in mouse models of Huntington disease. *Neuroscientist* **17**: 153–162.
- Tabrizi S.J., Flower M.D., Ross C.A., Wild E.J. (2020): Huntington disease: new insights into molecular pathogenesis and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Neurol.* **16**: 529–546.
- Tatum E.L. (1966): Molecular biology, nucleic acids, and the future of medicine. *Perspect. Biol. Med.* **10**: 19–32.
- Videnovic A. (2013): Treatment of huntington disease. *Curr. Treat. Options Neurol.* **15**: 424–438.
- Wang C.E., Zhou H., McGuire J.R., Cerullo V., Lee B., Li S.H., Li X.J. (2008): Suppression of neuropil aggregates and neurological symptoms by an intracellular antibody implicates the cytoplasmic toxicity of mutant huntingtin. *J. Cell Biol.* **181**: 803–816.
- Wang Y.L., Liu W., Wada E., Murata M., Wada K., Kanazawa I. (2005): Clinico-pathological rescue of a model mouse of Huntington’s disease by siRNA. *Neurosci. Res.* **53**: 241–249.
- Wexler N.S., Lorimer J., Porter J., Gomez F., Moskowitz C., Shackell E., Marder K.,

- Penchaszadeh G., ... Landwehrmeyer B. (2004): Venezuelan kindreds reveal that genetic and environmental factors modulate Huntington's disease age of onset. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**: 3498–3503.
- Wirth T., Parker N., Ylä-Herttuala S. (2013): History of gene therapy. *Gene* **525**: 162–169.
- Yamamoto A., Lucas J.J., Hen R. (2000): Reversal of neuropathology and motor dysfunction in a conditional model of Huntington's disease. *Cell* **101**: 57–66.
- Yen L., Strittmatter S.M., Kalb R.G. (1999): Sequence-specific cleavage of Huntingtin mRNA by catalytic DNA. *Ann. Neurol.* **46**: 366–373.
- Zeitlin S., Liu J.P., Chapman D.L., Papaioannou V.E., Efstratiadis A. (1995): Increased apoptosis and early embryonic lethality in mice nullizygous for the Huntington's disease gene homologue. *Nat. Genet.* **11**: 155–163.
- Zuccato C., Valenza M., Cattaneo E. (2010): Molecular mechanisms and potential therapeutical targets in Huntington's disease. *Physiol. Rev.* **90**: 905–981.
- Green, E. (2023): Contig. National Human Genome Research Institute (NIH). <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Contig#:~:text=A%20set%20of%20overlapping%20clones,this%20case%20a%20clone%20contig.> (pristupljeno 22. srpnja 2023.)
- Harding, R. (2023): Roche Phase II GENERATION HD2 study underway. HDBuzz. <https://en.hdbuzz.net/339> (pristupljeno 7. lipnja 2023.)
- Huntington's disease – NHS. <https://www.nhs.uk/conditions/huntingtons-disease/> (pristupljeno 16. ožujka 2023.)
- Neravnoteža vezanosti gena. Struna. Institut za hrvatski jezik i jezikoslovlje. <http://struna.ihjj.hr/naziv/neravnoteza-vezanosti-gena/24886/> (pristupljeno 16. travnja 2023.)
- Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP). National Library of Medicine. National Center for Biotechnology Information. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techrflp/> (pristupljeno 15. ožujka 2023.)

Tominersen. Ionis. <https://www.ionispharma.com/medicines/ionis-htt/> (pristupljeno 7. lipnja 2023.)

Životopis

Rođen sam 12. veljače 2002. godine u Zagrebu u Republici Hrvatskoj. Po završetku osnovne škole u Osijeku 2016. godine upisujem se u prirodoslovno-matematičku III. gimnaziju Osijek. Tijekom svojega srednjoškolskog obrazovanja sudjelujem u učeničkim natjecanjima na županijskoj razini. Godine 2020. upisujem se na Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, na smjer Molekularna biologija. Tijekom svojega fakultetskog obrazovanja dva puta sudjelujem u projektu popularizacije znanosti *Noć biologije*, sudjelujem kao aktivni sudionik na *Simpoziju studenata bioloških usmjerenja* (SiSB), kao demonstrator u praktikumu iz kolegija Fiziologija bilja te kao pasivni sudionik na konferencijama *Photosynthos* i *The 19th International Symposium on Carotenoids*. Od 2022. godine djelujem kao lektor za studentski časopis *In Vivo*.