

**Univerzita Karlova
1. lékařská fakulta**

Studijní program: Biochemie a patobiochemie



**UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta**

Mgr. Marie Vanišová

**Studium změn struktury a energetického metabolismu mitochondrií u pacientů
s Huntingtonovou chorobou a u transgenního modelu miniprasete**

Mitochondrial structure and energetic metabolism changes in patients with Huntington's
disease and in transgenic minipig model

Disertační práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: RNDr. Hana Hansíková CSc.

Praha, 2023

PROHLÁŠENÍ:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 29.7.2023

Mgr. Marie Vanišová

Podpis:

IDENTIFIKAČNÍ ZÁZNAM:

VANIŠOVÁ, Marie. *Studium změn struktury a energetického metabolismu mitochondrií u pacientů s Huntingtonovou chorobou a u transgenního modelu miniprasete. [Mitochondrial structure and energetic metabolism changes in patients with Huntington's disease and in transgenic minipig model]*. Praha, 2023. 96 s., 7 příl. Disertační práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Klinika pediatrie a dědičných poruch metabolismu. Vedoucí práce RNDr. Hana Hansíková CSc.

IDENTIFICATION RECORD:

VANIŠOVÁ, Marie. *Mitochondrial structure and energetic metabolism changes in patients with Huntington's disease and in transgenic minipig model. [Studium změn struktury a energetického metabolismu mitochondrií u pacientů s Huntingtonovou chorobou a u transgenního modelu miniprasete]*. Prague, 2023. 96 pages. PhD thesis. Charles University in Prague, First Faculty of Medicine, Department of Paediatrics and Inherited Metabolic Disorders. Supervisor: RNDr. Hana Hansíková CSc.

PODĚKOVÁNÍ A GRANTOVÁ PODPORA

Disertační práce byla vypracována v rámci autorčina postgraduálního studia oboru Biochemie a patobiochemie na 1. lékařské fakultě University Karlovy v Praze v letech 2013-2023.

Srdečné poděkování za pomoc a spolupráci na studii i přípravě publikací patří kolegyním z Laboratoře pro studium mitochondriálních poruch z Kliniky pediatrie a dědičných poruch metabolismu, 1.LF UK a VFN v Praze a především školitelce RNDr. Haně Hansíkové za její pomoc, vedení a nezměrnou trpělivost při plnění cílů disertační práce i sepsání tohoto textu.

Velké poděkování patří kolegům z Neurologické kliniky 1. LF UK a VFN v Praze a z Ústavu živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd ČR v Liběchově, kolegyním z laboratoře elektronové mikroskopie Ústavu patologie VFN a 1. LF UK a kolegům z Institutu klinické medicíny Univerzity v Oslo.

Práce vznikla s podporou projektů: MŠMT - Česko Norský výzkumný program 7F14308 (2014–2017), COST LD15099 (2015-2017) a institucionální podpory Univerzity Karlovy – Progres Q26/1.LF a SVV-UK 260516 a 260367, MZ ČR NU20-04-00136 a Všeobecné fakultní nemocnice MZ ČR RVOVFN64165/2012,

OBSAH

Abstrakt.....	7
Abstract.....	9
Zkratky.....	13
Úvod.....	14
Huntingtonova nemoc.....	14
Struktura huntingtinu, posttranslační modifikace a CAG repetice	15
Fyziologické a patologické vlastnosti huntingtinu.....	18
Mitochondrie.....	19
Mitochondriální onemocnění.....	23
Mitochondriální patologie u Huntingtonovy nemoci.....	24
1. Mitochondriální poškození mozkové tkáně u Huntingtonovy nemoci.....	26
2. Mitochondriální poškození ve vybraných periferních tkáních u Huntingtonovy nemoci.....	27
Transgenní modelové organismy pro studium Huntingtonovy nemoci.....	29
Experimentální část.....	34
Cíl práce.....	34
Specifické cíle disertační práce.....	34
Biologický materiál	34
Metody.....	38
Mikroimunoanalýza (MIA).....	38
Transmisní elektronová mikroskopie (TEM).....	40
Přehled dalších použitých metod	43
Výsledky a diskuse	45
Ad Cíl 1: Zavést a ověřit využití mikroimunoanalýzy (MIA) pro stanovení množství mitochondriálních komplexů I a IV systému oxidační fosforylace v buňkách bukalního střeru u pacientů s Huntingtonovou nemocí.....	45
1.1. U pacientů s Huntingtonovou nemocí bylo v buňkách bukalního epitelu pomocí mikroimunoanalýzy detekováno snížené množství komplexů I a IV systému oxidační fosforylace	45
1.2. Pacienti s Huntingtonovou nemocí s podporou výživy z důvodu kachexie mají v buňkách bukalní sliznice pravděpodobně vyšší množství komplexu I systému OXPHOS než pacienti s Huntingtonovou nemocí bez výživové podpory.	48

Ad Cíl 2): Analyzovat mitochondriální parametry ve vybraných periferních tkáních symptomatických pacientů s Huntingtonovou nemocí	50
2.1. Uspořádání mitochondriální sítě a ultrastruktura mitochondrií jsou v kultivovaných kožních fibroblastech u pacientů s Huntingtonovou nemocí významně postiženy	50
2.2. V lymfocytech izolovaných z periferní krve od pacientů s Huntingtonovou nemocí byla nalezena snížená exprese genů zodpovědných za aerobní metabolismus a snížená integrita jaderné DNA.	54
Ad Cíl 3): Charakterizovat mitochondriální ultrastrukturu a funkce v tkáních transgenního modelu miniprasete pro Huntingtonovu nemoc v pre-symptomatickém a časně symptomatickém období.	58
3.1. Biochemické a funkční změny mitochondrií předcházejí změnám jejich ultrastruktury a jsou detekovatelné již před nástupem pohybového postižení a poškození svalové tkáně u transgenního modelu miniprasete	58
3.2. Mitochondriální metabolismus ve spermiích transgenního prasečího modelu pro Huntingtonovu nemoc je narušen již v pre-symptomatickém období.....	62
3.3. Behaviorální a motorické změny u transgenních prasat ve věku 48 měsíců kopírují projevy Huntingtonovy nemoci u člověka.....	69
Závěrečný souhrn	74
Spoluautorské publikace s tématem Huntingtonovy nemoci	77
Reference:	79
Seznam příloh:	89

ABSTRAKT

Huntingtonova nemoc (HN) je závažné neurodegenerativní onemocnění s autosomálně dominantní dědičností. HN vzniká následkem expanze CAG tripletu v genu pro protein huntingtin (Htt), která vede k poškození a ztrátě funkcí tohoto proteinu. Htt je nezbytný při vývoji nervové soustavy, podílí se na axonálním transportu, regulaci exprese genů mitochondriálního metabolismu nebo spermiogenezi. U HN je nejvýznamněji poškozena nervová tkáň, ale patologické změny spojené s nemocí jsou detekovány v celém organismu. V současné době neexistuje uspokojivá léčba.

U pacientů s HN bylo prokázáno, že mitochondriální poškození významně ovlivňuje progresi nemoci, avšak mechanismy vzniku mitopatie a její další rozvoj se všemi dopady na fyziologii tkání u HN dosud nejsou zcela objasněny.

Cílem disertační práce bylo studium poškození energetického metabolismu, uspořádání mitochondriální sítě a ultrastruktury mitochondrií u HN ve vybraných tkáních pacientů a u modelového transgenního prasete pro HN (TgHN). Dále bylo snahou nalézt a charakterizovat mitochondriální biomarker HN, který by dobře odrážel patologický obraz momentálního stavu pacienta a v průběhu rozvoje onemocnění.

Studovaným materiálem od pacientů s HN byly buňky bukové sliznice, lymfocyty izolované z periferní krve a kultivované kožní fibroblasty. Od TgHN modelu byly analyzovány lymfocyty, spermie, kosterní sval, frontální kůra a bazální ganglia mozku.

Mezi hlavní výsledky práce patří zjištění, že míra poškození nDNA v lymfocytech pacientů s HN je až čtyřnásobně vyšší než u zdravých osob a koreluje s délkou onemocnění. Buněčné linie fibroblastů pacientů s HN mají významné ultrastrukturální a funkční postižení mitochondriálního aparátu. Snížený mitochondriální energetický metabolismus a hromadění mtHtt ve spermiích TgHN kanců přispívá ke zhoršené penetranci při fertilisaci. Biochemické změny mitochondriální bioenergetiky a dynamiky v kosterním svalu u TgHN předcházejí změnám ultrastruktury a pohybovému postižení. Potvrzení mitopatie ve všech sledovaných periferních tkáních pacientů s HN i transgenního modelu potvrdila vhodnost využití extraneuronálního materiálu pro studium patologie HN. Získané výsledky poslouží pro další výzkum mitochondriální patologie u HN a pro testování experimentální léčby.

Klíčová slova

Huntingtonova nemoc (choroba), mitochondrie, mitochondriální poškození, mikroimunoanalýza, systém oxidační fosforylace, transmisní elektronová mikroskopie, biomarkery, transgenní model miniprasete pro Huntingtonovu nemoc

ABSTRACT

Huntington's disease (HD) is a severe neurodegenerative disease with autosomal dominant inheritance. HD is caused by the expansion of the CAG triplet in the gene for the huntingtin protein (Htt), which leads to damage and loss of its functions. Htt is essential in the development of the nervous system, it is involved in axonal transport, regulation of mitochondrial metabolism gene expression or spermiogenesis. In HD, the nerve tissue is most significantly damaged, but pathological changes associated with the disease are detected throughout the organism. There is currently no satisfactory treatment.

Mitochondrial damage has been shown to significantly affect the progression of HD in patients with HD, but the mechanisms of mitopathy and its development with all the effects on tissue physiology in HD are still not fully understood.

The aim of the dissertation theses was to study mitochondrial energy metabolism impairment, mitochondrial network organization and mitochondrial ultrastructure in HD in selected tissues of patients with HD and in a minipig model transgenic for HD (TgHD). Furthermore, the effort was to find and characterize a mitochondrial biomarker of HD, which would well reflect the patient's current clinical phenotype state and it would be possible to monitor changes in its parameters during the course of the disease.

Buccal epithelial cells, lymphocytes isolated from peripheral blood and cultured skin fibroblasts were studied from HD patients. Lymphocytes, sperm, skeletal muscle and frontal cortex and basal ganglia of the brain were analyzed from the TgHD model.

Main results showed that the rate of nDNA damage in the lymphocytes of HD patients is up to four times higher than in healthy individuals and is correlated with the duration of the disease. Fibroblasts cell lines of HD patients revealed significant mitochondrial ultrastructural and functional impairment. Due to reduced mitochondrial energy metabolism and accumulation of mtHtt in TgHD sperm may have impaired penetration activity. Biochemical alterations of mitochondrial bioenergetics and dynamics in TgHD skeletal muscle precede ultrastructural changes and locomotor impairment.

The confirmation of mitopathy in all monitored peripheral tissues of HD patients and the TgHD model confirmed the suitability of tested extraneuronal material for the study of HD

pathology. The results will serve for further research of mitochondrial pathology in HD and for testing experimental therapy.

Key Words

Huntington's Disease, Mitochondria, Mitochondrial Disease, Microimmunoanalysis, Transmission Electron Microscopy, Biomarkers, Transgenic Minipig for Huntington's Disease

ZKRATKY

Å	Angström, jednotka délky odpovídající 0,1nm
AN	Alzheimerova nemoc
AMK	Aminokyselina
ADP	Adenosindifosfát (Adenosine diphosphate)
ATP	Adenosintrifosfát (Adenosine Triphosphate)
BAC	Bakteriální arteficiální chromosom, (Bacterial arteficial chromosome)
BF	Faktor větvení mitochondriální sítě, (Branching factor)
BN-PAGE	Modrá nativní elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (Blue native poly acryl amide electrophoresis)
CAG triplet	Cytosin-adenin-guanin – kodon pro aminokyselinu glutamin
Calp	Kalpain (Calpain)
Casp 3/2/6	Kaspáza 3/2/6 (Caspase 3,2,6)
CNS	Centrální nervový systém
CREB	cAMP vazebný protein (cAMP response element-binding protein)
Crispr/Cas9	(CRISPR - Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, Cas9 - CRISPR-associated genes), metoda pro genovou manipulaci
Cyt c	Cytochrom c
D	Aminokyselina aspartát
Da	Dalton
Drp1	Dynaminu příbuzný protein 1 (Dynamine-Related Protein 1)
E	Aminokyselina glutamát
e⁻	Elektron
FAD⁺	Flavinadenindinukleotid – oxidovaná forma
FADH₂	Flavinadenindinukleotid – redukována forma
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv v USA (Food and Drug Administration)
Fis1	Protein mitochondriálního dělení 1 (fission 1)
F1-F3 generace	První, druhá a třetí filiální generace potomků po křížení parentální generace
FDG	Fluoro-deoxyglukóza
H⁺	Proton
HAP-1	Protein 1 asociovaný s huntingtinem (Huntingtin-associated protein 1)
HD	Huntingtonova nemoc, z angl. Huntington's Disease
HN	Huntingtonova nemoc, Huntingtonova choroba
H₂O₂	Peroxid vodíku

Htt	Protein huntingtin
JHN	Juvenilní Huntingtonova nemoc
KO	Knock out – vypnutí vybraného genu
KI	Komplex I systému oxidační fosforylace, NADH: ubichinon oxidoreduktáza
KII	Komplex II systému oxidační fosforylace, sukcinát: ubichinon oxidoreduktáza
KIII	Komplex III systému oxidační fosforylace, ubichinol: cytochrom <i>c</i> oxidoreduktáza
KIV	Komplex IV systému oxidační fosforylace, cytochrom <i>c</i> oxidáza
KV	Mitochondriální komplex V, ATP syntáza
kV	Kilo Volt
KDa	Kilo Dalton
M	Muž (označení pohlaví u humánních vzorků)
MIA	Mikroimunoanalýza
MD	Mitochondriální denzita (Mitochondrial Density)
MEGS	Měření kapacity mitochondriálního energetického metabolismu (Mitochondrial Energy Generating system capacity)
mHtt	Mutovaný protein huntingtin
MMP10	Metaloproteináza 10
MSA	Multisystémová atrofie
mtDNA	Mitochondriální DNA
<i>MT-RNR1</i>	Gen pro mitochondriální ribosomální podjednotku
<i>MT-ND2</i>	Gen v mitochondriální DNA pro podjednotku ND2 komplexu I
<i>MT-ND6</i>	Gen v mitochondriální DNA pro podjednotku ND6 komplexu I
NAD⁺	Nikotinamidadenindinukleotid – oxidovaná forma
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid – redukována forma
NF-κB	Nukleární faktor kappa B, transkripční faktor
nDNA	Nukleární (jaderná) DNA
NDUFA9	Podjednotka komplexu I
OXPHOS	Systém oxidační fosforylace (Oxidative Phosphorylation System)
OPA1	Mitochondriální protein: dynaminu podobná GTPáza Optic atrophy1 (Mitochondrial dynamin like GTPase optic atrophy 1)
P	Aminokyselina prolin
Palm	Palmitoyl
pb	Páry bazí u nukleových kyselin

PET	Pozitronová emisní tomografie
PIC	Inhibitor proteáz (Protein inhibitory cocktail)
P1-P10	Pacient 1-10
p53	Protein p53, transkripční faktor
PBS	Fosfátový pufr (Phosphate buffer saline)
PDH E1-α	Podjednotka E1- α pyruvát dehydrogenázového komplexu
PGC1α	Transkripční koaktivátor mitochondriální biogeneze (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha)
PN	Parkinsonova nemoc
Poly-Q	Polyglutaminový řetězec
Real-time qPCR	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (Quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR)
RNA	Ribonukleová kyselina
ROS	Reaktivní formy kyslíku (Reactive Oxygen Species)
RyR1 rec.	Svalový Ryanodinový receptor 1
S	Aminokyselina serin
<i>SDHB</i> gen	Gen pro SDHB podjednotku mitochondriálního komplexu II
<i>SDS PAGE</i>	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis)
Sumo	Sumoyl
<i>SURF1</i>	Gen pro protein Surf1, asemblační faktor komplexu IV
T	Aminokyselina treonin
TAF4	Transkripční faktor skupiny TFIID podílející se na iniciaci transkripce genu (Transcription initiation factor TFIID subunit 4)
TEM	Transmisní elektronová mikroskopie
Ubi	Ubiquitin
<i>UCP2</i>	Gen pro „odpřahovací“ protein 2 (Uncoupling protein 2)
UTR	Nepřekládaná oblast genu (Untranslated region).
WT	Divoký kmen (Wild type), jedinec bez genetické mutace
YAC	Kvasinkový arteficiální chromosom, (Yeast artificial chromosome)
Ž	Žena (označení pohlaví u humánních vzorků)
♂	Značka pro samčí pohlaví u prasečího transgenního modelu
♀	Značka pro samičí pohlaví u prasečího transgenního modelu

ÚVOD

Huntingtonova nemoc

Huntingtonova nemoc (HN, angl. Huntington's disease) je závažné progresivní onemocnění nervového systému. Poprvé bylo popsáno roku 1872 lékařem Georgem Huntingtonem, který sledoval několik rodin postižených neurodegenerativním onemocněním s nápadnými choreatickými pohyby (Neylan, 2003). HN se dědí autosomálně dominantně. V západní populaci se nemoc objevuje s prevalencí přibližně 10,6-13,7 jedinců na 100 000 obyvatel (McColgan and Tabrizi, 2018). Dochází při ní ke ztrátě neuronů především v oblasti *striata* koncového mozku, což vede ke zhoršování pohybových, kognitivních a psychiatrických schopností pacienta (Roos, 2010).

První příznaky se zpravidla objevují v produktivním věku, nejčastěji mezi 30. a 45. rokem života, jsou individuálně rozmanité, avšak jedná se o soubor závažných změn, které během 15-20 let progredují k naprosté závislosti pacienta na nejbližších. Onemocnění je fatální a i přes usilovný výzkum jsou možnosti současné terapie schválené americkou agenturou FDA (FDA, Úřad pro kontrolu potravin a léčiv, z Angl. Food and Drug Administration,) omezené na léčbu symptomatickou, která cílí především na motorické, kognitivní a psychiatrické symptomy (Kim et al., 2021). V probíhajících klinických studiích. jsou zahrnuty potenciální látky a přístupy modulující HN, zaměřené nejčastěji na snížení hladiny mHtt ve tkáních. Např. testování látky AMT-130 vyvíjené společností uniQure využívající RNA interferenci pro redukci mHtt se nachází v klinické fázi I/II. A látka RG6042 (IONIS-HTTRx), která cílí na pre-mRNA Htt (vzniká ve spolupráci Roche a Ionis Pharmaceuticals) je v současné době dokonce v klinické fázi III (Lawlor et al., 2022).

Prvními symptomy, které ale zpravidla nevedou k diagnóze HN, protože nejsou specifické pouze pro toto onemocnění, bývají psychiatrické změny (např. deprese, zvýšená iritabilita a náladovost se sklony k agresivitě, časté jsou apatie a pocity úzkosti, které mohou vést až k sebevraždným sklonům (Roos, 2010).

Typickými motorickými příznaky popsanými samotným Huntingtonem jsou mimovolní pohyby, například zvedání obočí, náklon hlavy apod. Nechtěné pohyby mají trvalý charakter, postupně progredují a mohou být pro pacienta velmi obtěžující. Chůze pacientů s HN je nestabilní a podobá se pohybu podnapilé osoby. Dochází ke zhoršování rovnováhy, ovládnutí

kosterních svalů, které může vést hypokinezi a celkovému zpomalování pohybů, zvláště v pozdějších stádiích nemoci (Purdon et al., 1994).

Kognitivní poruchy u pacientů s HN se týkají především zhoršování flexibility myšlení, plánování aktivit a složitější zvládání každodenních problémů (Nopoulos, 2016).

Závažnost HN nesouvisí pouze s čistě klinickými symptomy, ale také s jejich přesahem do osobní úrovně života pacientů. Například změna osobnosti spojená s nemocí může vést ke ztrátě zaměstnání kvůli zpomalování pracovního tempa nebo nově vzniklé neschopnosti dotáhnout pracovní úkol do konce. Vyvíjející se agresivita rovněž ovlivňuje sociální vztahy a osobní zázemí.

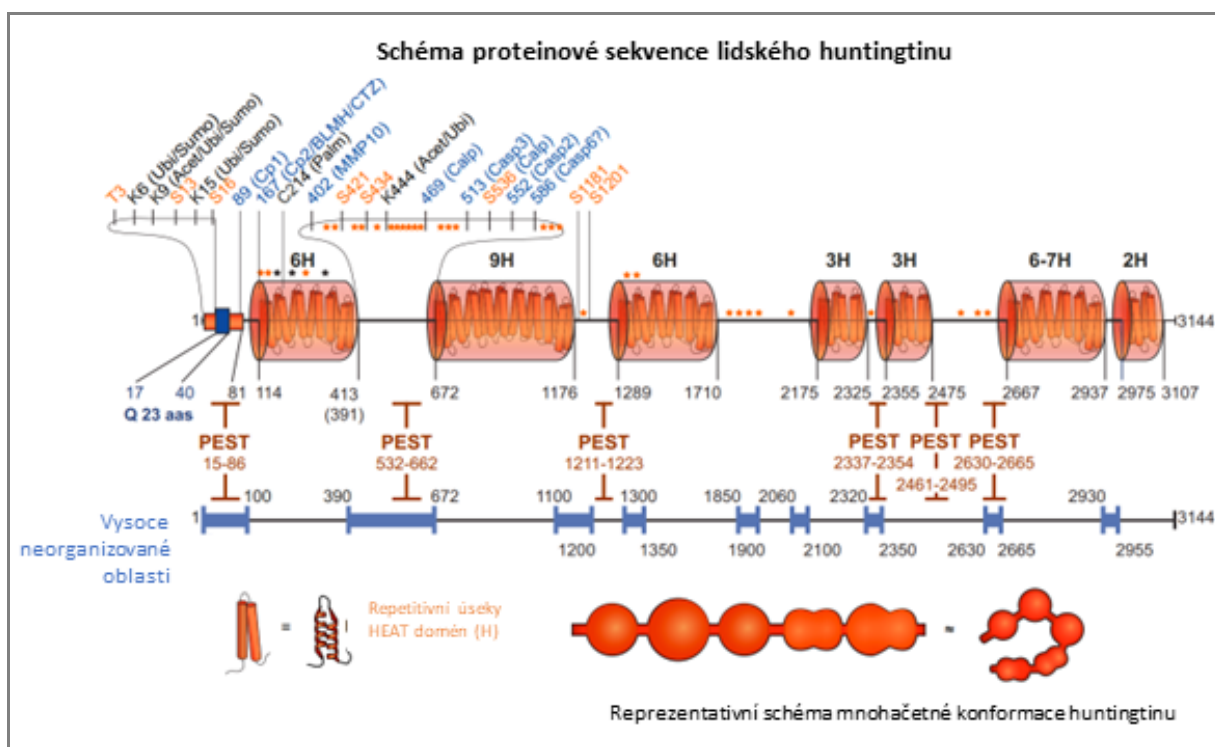
V roce 1993 bylo prokázáno, že HN je způsobena mutací v genu pro protein Huntingtin (Htt), nacházejícím se na krátkém raménku 4. chromozomu. Mutace vede k expanzi CAG repetice exonu 1, čímž dochází k prodloužení polyglutaminového (poly-Q) řetězce Htt a tím k poškození/ztrátě jeho funkcí (Collaborative group, 1993). Mutovaný huntingtin (mHtt) nebo jeho fragmenty se kromě ztráty původní funkce v buňkách hromadí a způsobují poškození a následné odumírání specifických neuronů v centrálním nervovém systému (CNS), především GABA-nergních neuronů *striata*, které jsou u HN zasaženy nejvýrazněji (Ross and Tabrizi, 2011) (Vonsattel, 2008) (Rikani et al., 2014).

Struktura huntingtinu, posttranslační modifikace a CAG repetice

Huntingtin (OMIM 613004) je 348 kDa velký solubilní protein exprimovaný u všech obratlovců (Zuccato and Cattaneo, 2007). Obsahuje 67 exonů, z nichž nejvíce studovaný je exon 1, ve kterém se nachází Poly-Q sekvence, jejíž expanze vede ke vzniku HN. Produktem genu pro Huntingtin jsou 2 mRNA transkripty umožňující syntézu dvou izoform Htt proteinu o velikosti 10 366 párů bazí (pb) a 13 711 pb. Ačkoli je kratší varianta častější, delší izoforma Htt je více zastoupena v mozku (Lin et al., 1993) Htt je široce exprimován napříč tkáněmi, nejvyšší exprese je v mozkové tkáni a testes (Guo et al., 2003) (Sharp et al., 1995).

Htt je bohatě posttranslačně modifikován, což ovlivňuje jeho funkce i počasí života (Obr. 1). Např. fosforylace na serinu (S13, S16) je významná pro jeho jadernou lokalizaci, pomocí fosforylace/defosforylace serinů (S421, S1181/S1201) reguluje Htt intracelulární transport organel po mikrotubulech. U myši bylo prokázáno, že acetylace lysinu (K444) aktivuje degradaci mutovaného Htt (mHtt) v autofagosomech a tím redukuje jeho toxicitu. V nemutovaném Htt proteinu se tato modifikace vyskytuje srovnatelně méně (Jeong et al.,

2009). Dalšími častými posttranslačními modifikacemi Htt jsou palmitoylace, ubiquitinilace a sumoylace (Saudou and Humbert, 2016). 2D struktura Htt tvoří řadu „HEAT“ domén bohatých na α -helikální struktury, které slouží jako lešení (scaffold) pro intra- a intermolekulární interakce Htt (Palidwor et al., 2009). Ve struktuře Htt je také řada tzv. PEST domén, které obsahují množství proteolyticky senzitivních míst vhodných například pro proteázy calpain, některé kaspázy nebo cathepsiny (Saudou and Humbert, 2016). Označení PEST domény je odvozeno od aminokyseliny, za kterou probíhá štěpení peptidové vazby - prolin (P), glutamát nebo aspartát (E/D), serin (S) a treonin (T). Ačkoli jsou proteolytická místa přítomna jak v normálním Htt, tak mHtt, je aktivita proteáz u mHtt (u pacientů v mozku) ve srovnání se zdravými kontrolami zvýšená (Benn et al., 2005).

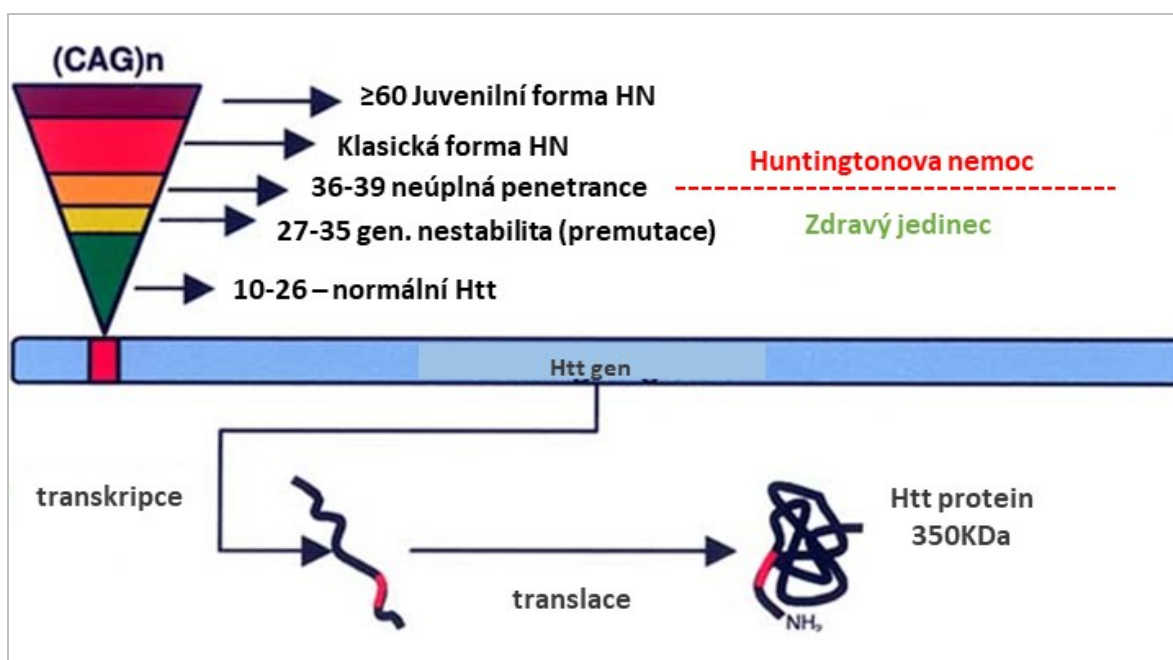


Obr. 1.: Schéma proteinové sekvence lidského huntingtinu.

Aminokyseliny (AMK) psané oranžově: místa pro fosforylaci (identifikováno pomocí hmotnostní spektrometrie), AMK psané černě: místa posttranslačních modifikací, AMK psané modře: místa štěpení proteázami. Oranžové a černé *: místa fosforylace a acetylce (predikované díky hmotnostní spektrometrii). Oranžové helikální HEAT domény (číslo nahoře označuje počet HEAT repetitivních úseků HEAT domény), PEST domény - citlivé k proteolýze. Sférické schéma znázorňuje schopnost huntingtinu zaujímat mnohačetné konformace. (Ubi - ubiquitin; Sumo - sumoyl; Acet -acetyl; Palm - palmitoyl; MMP10 - metaloproteináza10; Calp - calpain; Casp3/2/6 - , kaspáza3/2/6.). Upraveno podle Saudou a Humbert, 2016 (Saudou and Humbert, 2016).

V N-terminální části Htt v exonu 1 se za prvními 17 aminokyselinami vyskytuje polyglutaminová sekvence (Poly-Q) kódovaná CAG tripletem, jejíž expanze vede k rozvinutí Huntingtonovy choroby. Za poly-Q řetězcem následuje prolin bohatá doména, která tvoří amfipatický helix stabilizující proteinovou konformaci Htt. Poly-Q řetězec a prolin bohatá doména jsou vysoce konzervované u všech savců, což potvrzuje jejich důležitost (Tartari et al., 2008).

Délka CAG sekvence se u běžné populace pohybuje mezi 10-26 opakováními (Obr. 2). V tomto rozsahu je repetice stabilní a HN se nerozvíjí. Délka CAG tripletu mezi 27 a 35 nevede k manifestaci onemocnění, ale může být v rámci genetického přenosu nestabilní a představuje možné riziko pro budoucí generace. Přítomnost 36 a více CAG repetic alespoň na jedné alele vede k rozvoji HN. U malého procenta nositelů CAG repetice o délce 36-39 dochází k neúplné penetranci a onemocnění je nemusí postihnout (Kremer et al., 1994).



Obr. 2.: Schématické znázornění genu pro protein huntingtin se znázorněním, jak délka CAG sekvence v 1. exonu ovlivňuje propuknutí Huntingtonovy nemoci.

Schéma Htt genu s červeně zvýrazněnou oblastí CAG repetice v 1. exonu. Počet CAG tripletů ≤ 26 odpovídá normální zdravé populaci, přítomnost 36-39 CAG tripletů obvykle vede k propuknutí nemoci, avšak s neúplnou penetrancí. ≤ 40 CAG opakování vede k manifestaci nemoci v dospělém věku (35-50 let), počet CAG repetice ≥ 60 odpovídá juvenilní formě HN. Upraveno podle (Rego and Pereira de Almeida, 2005).

U osob s 40 a více CAG repeticemi se Huntingtonova choroba rozvine a to obvykle v období mezi 30. a 50. rokem života. Délka CAG opakování je jedním z faktorů ovlivňujících věk nástupu HN a platí, že vyšší počet repetic značí dřívější propuknutí onemocnění. Přibližně u pěti procent případů mluvíme o tzv. Juvenilní Huntingtonově chorobě (JHN), kdy bývá počet CAG repetic vyšší než 60 a první příznaky se objevují již před desátým rokem věku (Gonzalez-Alegre and Afifi, 2006).

Fyziologické a patologické vlastnosti huntingtinu

Htt je exprimován ve všech buňkách a nejvyšší míra exprese je v nervové tkáni (Sharp et al., 1995) a testes (Guo et al., 2003). Je nezbytný pro správný embryonální vývoj nervové soustavy, ovlivňuje stabilitu neuronů, synaptický přenos (Trushina et al., 2004) a jeho „knock out“ (vyřazení/vypnutí) je v období gastruly embryonálně letální (Nasir et al., 1995).

Kromě funkcí vázaných striktně na nervovou tkáň, zasahuje Htt i do obecných procesů v buňkách, kde se často vyskytuje jako stavební součást proteinových komplexů, tzv. „scaffold“ protein (lešení). Htt mimo jiné ovlivňuje vezikulární transport a to interakcí s dyneinem a kinezinem-1 přes HAP-1 protein (Huntingtin-associated protein 1) (Caviston et al., 2011). Tím kromě dalšího reguluje obousměrný transport organel, autophagosomů, endosomů a lysosomů v neuronech (Orr, 2012) (Wong and Holzbaur, 2014). Htt je lokalizován rovněž na astrálních mikrotubulech a dělicích vřeténkách, kde spolu s dyneinem reguluje dělení buněk (Godin et al., 2010).

Díky obsahu LC3 vazebných domén může Htt aktivovat selektivní autofagii. Elongovaná Poly-Q sekvence mHtt míru autofagie významně zvyšuje, avšak v kombinaci s deregulací transportu váčků včetně autophagosomů, dochází u HN pacientů k neefektivitě celého procesu a tím následnému poškození a ztrátě buněk (Ochaba et al., 2014).

Objasnění veškerých funkcí proteinu komplikují značná velikost Htt, množství posttranslačních modifikací, ale i fakt, že kromě strukturních proteinů jako je např. výše zmíněný HAP-1, interaguje Htt také s transkripčními faktory. Je prokázáno, že Htt váže transkripční faktory s (CREB)-vazebnými doménami, tumorsupresorový protein p53 nebo PGC1 α a hraje tedy roli v genové expresi (Saudou and Humbert, 2016). I přes intenzivní výzkum, nejsou všechny funkce Htt ani dnes zcela objasněny.

Vliv mHtt na genovou expresi je dobře popsán například na neuronech striata, kde mHtt narušuje vazbu transkripčních faktorů skupiny CREB/TAF4 do promotoru genu PGC1 α , což

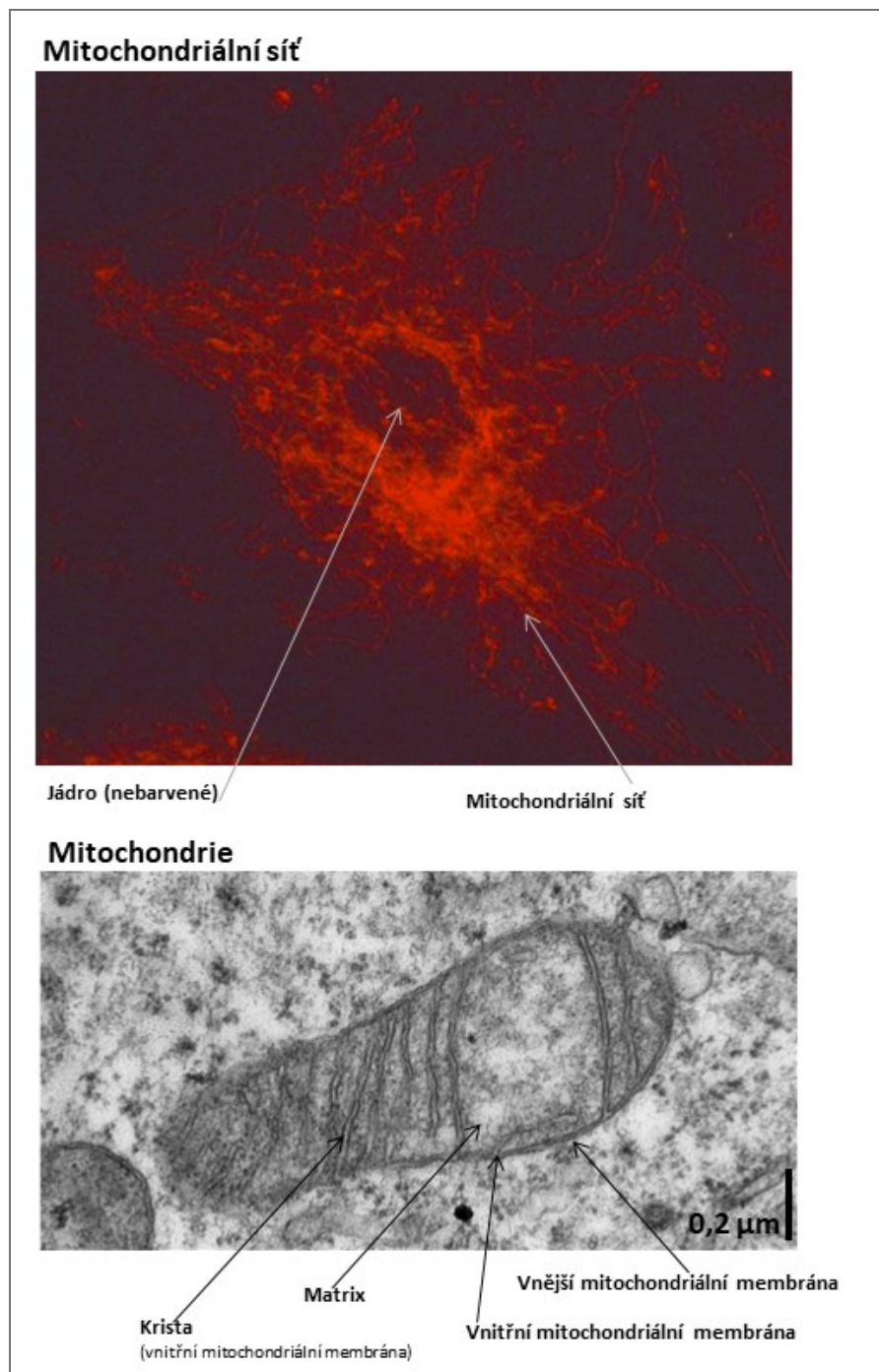
je transkripční koaktivátor genů regulujících mimo jiné biogenezi mitochondrií a oxidační fosforylaci. Inhibice exprese PGC1 α tak vede k narušení neuronálního energetického metabolismu a odumírání striatálních neuronů, které patří mezi nejvíce energeticky náročné neurony vůbec (Cui et al., 2006) (Pickrell et al., 2011).

Mitochondrie

Mitochondrie jsou organely eukaryotických buněk (obr. 3), které se vyvinuly v procesu endosymbiozy z bakterií rodu *Rickettsia* zřejmě proto, že byly schopné zpracovávat kyslík, který byl pro tehdejší eukaryota toxický (Davidov and Jurkevitch, 2009). I přesto, že společný evoluční vývoj posiloval závislost mitochondrií na vyspělejší eukaryotické buňce do té míry, že je dnes většina mitochondriálních genů kódována jadernou DNA (nukleární, nDNA) a exprimována eukaryotickým translačním a proteosyntetickým aparátem (Martin and Herrmann, 1998), mitochondrie mají stále vlastní cirkulární DNA (mitochondriální, mtDNA) bakteriálního typu. MtDNA je dlouhá 16659 pb a kóduje 13 genů pro hydrofobní podjednotky komplexů OXPHOS a vlastní aparát pro jejich expresi včetně ribosomálních (2 geny, 12S a 16S podjednotky) a transferových RNA (22 genů) (Lightowers et al., 1997). V každé mitochondrii je 5-10 molekul mtDNA, které jsou replikovány samostatně a nezávisle na replikaci nDNA. MtDNA neobsahuje introny a některé geny se překrývají. Mají-li všechny mtDNA v buňce stejnou sekvenci, hovoříme o homoplasmii. Dojde-li k mutaci a sekvence se liší, označujeme populaci mitochondrií za heteroplasmickou (Sollignac et al., 1983). Výsledný fenotyp mutace mtDNA pak závisí nejen na kauzalitě mutace samotné, ale také na poměru mutovaných a „zdravých“ mtDNA, tedy na úrovni heteroplasmie. Pro rozvoj mitopatie musí množství mutovaných mtDNA v mitochondriích překročit určitou hladinu (tzv. práh, angl. Threshold effect), která se může lišit v závislosti na typu tkáně i typu mutace (Rossignol et al., 2003).

Význam mitochondrií pro eukaryotické buňky je velmi dobře vyjádřen množstvím funkcí, které mitochondrie zajišťují. Kromě nejvýznamnější syntézy ATP v procesech systému oxidační fosforylace (OXPHOS) a Krebsova cyklu, jsou mitochondrie místem, oxidace mastných kyselin, metabolismu aminokyselin a nukleotidů, syntézy železosírných kofaktorů, ale i signalizačním uzlem v komunikaci s dalšími organelami v buňce, což je umožněno mimo jiné díky jejich schopnosti regulovat intracelulární hladinu vápenatých iontů a jiných signalizačních molekul (Rizzuto et al., 2012). Např. uvolnění cytochromu *c*, který je za

normálních okolností součástí elektron-transportního řetězce vnitřní mitochondriální membrány, vede společně s vazbou na Apaf-1 a pro-kaspázu 9 k tvorbě apoptozómu, čímž dochází k aktivaci apoptotické kaskády. Jedná se o tzv. vnitřní cestu aktivace buněčné smrti a mitochondrie jsou jejím klíčovým spouštěčem (Kiraz et al., 2016).

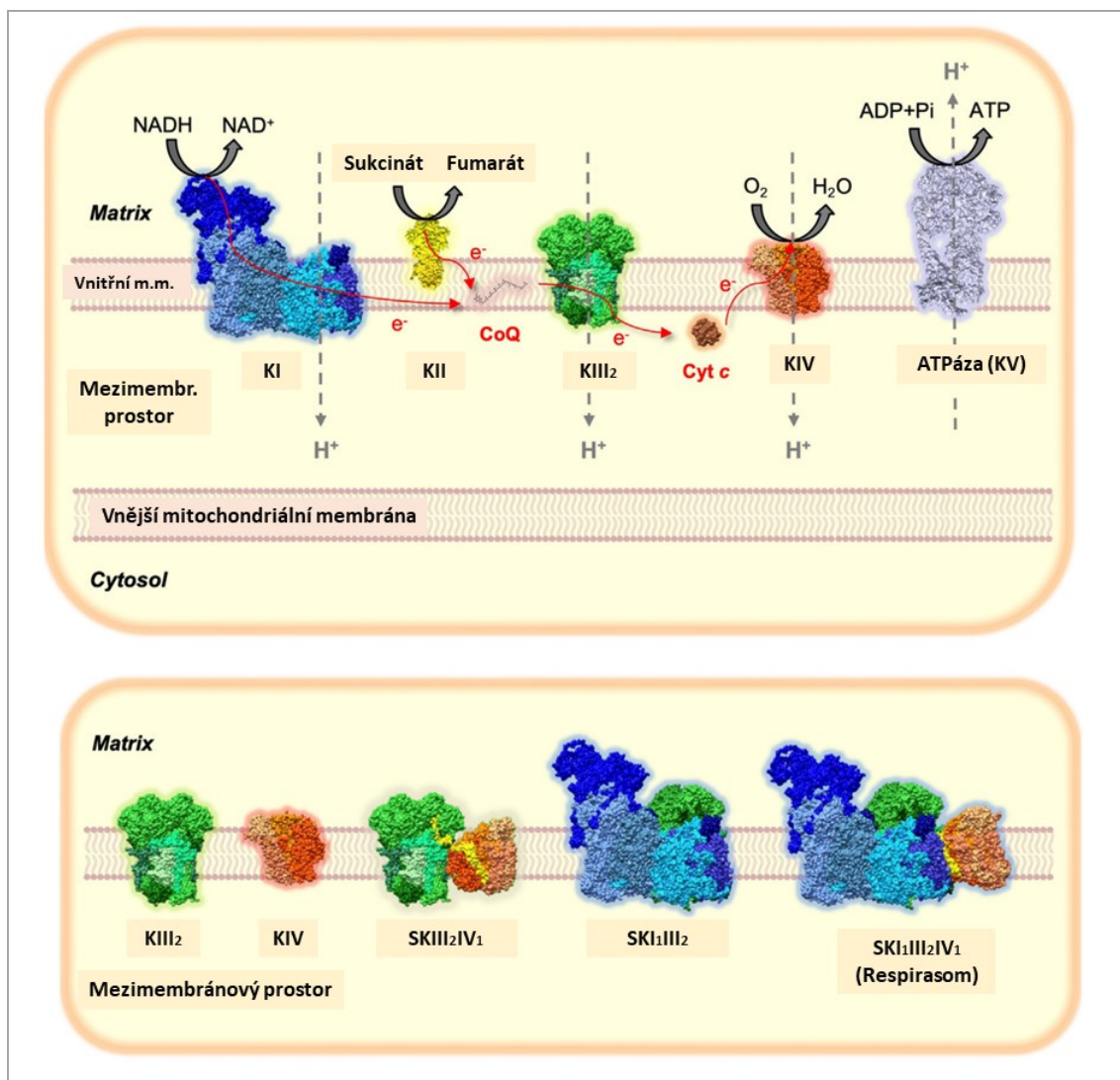


Obr. 3.: Epifluorescenční snímek mitochondriální sítě a elektronmikroskopický snímek ultrastruktury mitochondrie v buněčné cytoplasmě.

Mitochondriální síť: Kontrolní kultivovaný fibroblast, vitální barvení mitochondrií pomocí MitoTrackerRED, originální zvětšení 600x, Ultrastruktura mitochondrie: Kontrolní HEK293 buňka,

Mitochondrie měří okolo 1 μm a jejich tvar i množství kolísá v závislosti na typu buněk od několika set (hepatocyt: cca. 800) po desítky tisíc (lidský oocyt: cca 100 000) (Scheffler, 2007). Mitochondrie jsou dynamické organely, které reagují na změny v buněčné fyziologii tvorbou/remodelací nebo rozpadem propojených mitochondriálních sítí (z angl. „mitochondrial network“) (Obr. 3). Mitochondrie jsou tvořeny dvěma membránami. Vnější je hladká a svými póry propustí molekuly do velikosti 5kDa (Pollard et al, 2008). Vnitřní membrána se vchlipuje do matrix, kde vytváří krysty. Membránové přenašeče a enzymy udržují vnitřní membránu vysoce selektivní a tím vznikají koncentrační gradienty a membránový potenciál v jednotlivých kompartmentech, které jsou nezbytné nejen pro správnou funkci komplexů systému OXPHOS (Benard et al., 2007).

Nejvýznamnější funkcí mitochondrií je syntéza ATP v systému oxidační fosforylace, který je lokalizován na vnitřní mitochondriální membráně a je tvořen 5 multipodjednotkovými komplexy (K) (KI - komplex I, NADH: ubichinon oxidoreduktáza, KII - komplex II - sukcinát:ubichinon oxidoreduktáza, KIII - komplex III - ubichinol:cytochrom *c* oxidoreduktáza, KIV – komplex IV - cytochrom *c* oxidáza a KV- komplex V - ATP syntáza) a solubilními elektronovými přenašeči koenzymem Q (ubichinonem) a cytochromem *c*. Systém OXPHOS umožňuje reoxidovat koenzymy NADH a FADH₂, které byly redukovány v průběhu Krebsova cyklu nebo při oxidaci mastných kyselin a elektrony z nich uvolněné putují dle rostoucího redoxního potenciálu jednotlivými komplexy systému ke svému konečnému akceptoru na komplexu IV (molekula kyslíku je pak převedena na molekulu vody). Průchod elektronů kaskádou umožňuje postupně uvolňovat energii z oxidace substrátu (NADH, FADH₂) a využít ji k translokaci protonů do mezimembránového prostoru. Vzniklý protonový gradient pohání ATP syntázu (KV), což vede k syntéze ATP a k návratu protonů zpět do mitochondriální matrix (Obr. 4 nahoře).



Obr. 4.: Schéma strukturní a funkční organizace savčího systému oxidační fosforylace na vnitřní mitochondriální membráně.

Nahoře: Znárodněny jsou komplexy KI-IV a ATP syntáza (KV) včetně naznačení míst translokace protonů, elektronové přenašeče koenzym Q (CoQ) a cytochrom c (Cyt c). e^- : elektrony, ADP: adenosindifosfát, ATP: adenosintrifosfát, P_i : anorganický fosfát, H^+ : proton (ion vodíku), vnitřní m.m.: vnitřní mitochondriální membrána, mezimembr. prostor: mezimembránový prostor. Dole: Schéma uspořádání komplexů systému OXPHOS do superkomplexů (SK). KI (modře), KIII₂ (zeleně) a KIV (červeně). Předpokládá se, že KI asociuje především do superkomplexu s KIII₂ (tvorí tedy SKI₁III₂) a do respirasomu (SKI₁III₂IV₁). KIII₂ a KIV se nacházejí buď jako samostatné jednotky nebo vázané na SKIII₂IV₁, SK I+III₂ a respirasom (Fernández-Vizarra and Ugalde, 2022).

Oxidační metabolismus mitochondrií však kromě pozitivních produktů jako je ATP vede ke vzniku reaktivních forem kyslíku (ROS, z Angl. Reactive Oxygen Species). Za fyziologických podmínek uniká při oxidační fosforylaci přibližně 2 % kyslíku ve formě superoxidu, jehož největšími producenty jsou KII a KIII systému OXPHOS. K nárůstu produkce ROS dochází např. při poklesu syntézy ATP, případně při zvýšeném poměru

redukované a oxidované formy NAD nebo koenzymu Q (Cadenas and Davies, 2000). Kyselé pH naopak produkci ROS snižuje. Dalším mechanismem redukujícím množství vzniklých reaktivních forem kyslíku je enzymatická přeměna superoxidu pomocí superoxid dismutázy na méně reaktivní peroxid vodíku (H_2O_2). Ten pak přechází do cytosolu a do jádra, kde je přeměněn na vodu díky glutathionperoxidáze a kataláze. Perfektní funkčnost enzymové antioxidační ochrany je nezbytná především kvůli vysoké reaktivitě ROS, které při kontaktu se strukturami buněk způsobují mutace DNA, peroxidaci mastných kyselin a lipidových molekul, poškozují strukturu proteinů, vedou k jejich agregaci, ztrátě funkcí a konečným důsledkem může být spuštění apoptózy. Dlouhodobě zvýšený oxidativní stres je spojen s řadou patologických stavů spojených se stárnutím (Cadenas and Davies, 2000), neurodegenerací (Chen et al., 2012), aterosklerózou (Mashima et al., 2001) nebo kancerogenezí (Liou and Storz, 2010).

Mitochondriální onemocnění

Správná funkce mitochondrií je zásadní pro buněčnou fyziologii a jakékoli zhoršení jejich funkce se rychle projeví především v energeticky náročných tkáních (nervová, srdeční, svalová nebo jaterní tkáň). Onemocnění může propuknout krátce po narození nebo kdykoli v průběhu života a vede k závažnému multi-systémovému poškození se špatnou prognózou, nicméně u dětí bývá průběh závažnější (Procaccio and Wallace, 2004). První mitochondriální porucha byla popsána v šedesátých letech (LUFT et al., 1962), v roce 1988 byla jako možná příčina onemocnění potvrzena také mutace mtDNA (Holt et al., 1988) a v souvislosti s tím byl později navržen model maternální dědičnosti mitochondriálních onemocnění (Shoffner, 1996; Wallace, 1999). V současné době jsou popsány patologické mutace způsobující mitochondriální onemocnění ve více než 300 genech jak v mtDNA, tak v nDNA (Russell et al., 2020).

Ačkoli jsou mitochondriální poruchy řazeny k vzácným onemocněním, jsou nejčastějšími metabolickými chorobami a předpokládá se, že prevalence onemocnění je přibližně 1:10 000 v dospělé populaci a 0,5-1,5:100 000 u dětí pro onemocnění způsobené jak mutací mtDNA, tak nDNA (Schaefer et al., 2019). Snížení mitochondriálního metabolismu, zvýšená produkce reaktivních forem kyslíku nebo poruchy mitochondriální dynamiky však nemusí být způsobeny primárně mutací v mitochondriálních genech. Mohou být sekundárním, avšak významným jevem doprovázejícím i jiná závažná onemocnění. V posledních letech se

pozornost při studiu neurodegenerativních onemocnění věnuje rovněž regulaci mitochondriální dynamiky a metabolismu. Bylo potvrzeno, že mitochondriální změny nezanedbatelně ovlivňují patologii daného onemocnění. Mitochondriální poškození jako průvodní jev byla popsána například u Alzheimerovy nemoci (AN), Huntingtonovy nemoci (HN), Parkinsonovy nemoci (PN), Friedreichovy ataxie (FA) nebo u multi-systémové atrofie (MSA) (Kawamoto et al., 2016), (Lezi and Swerdlow, 2012).

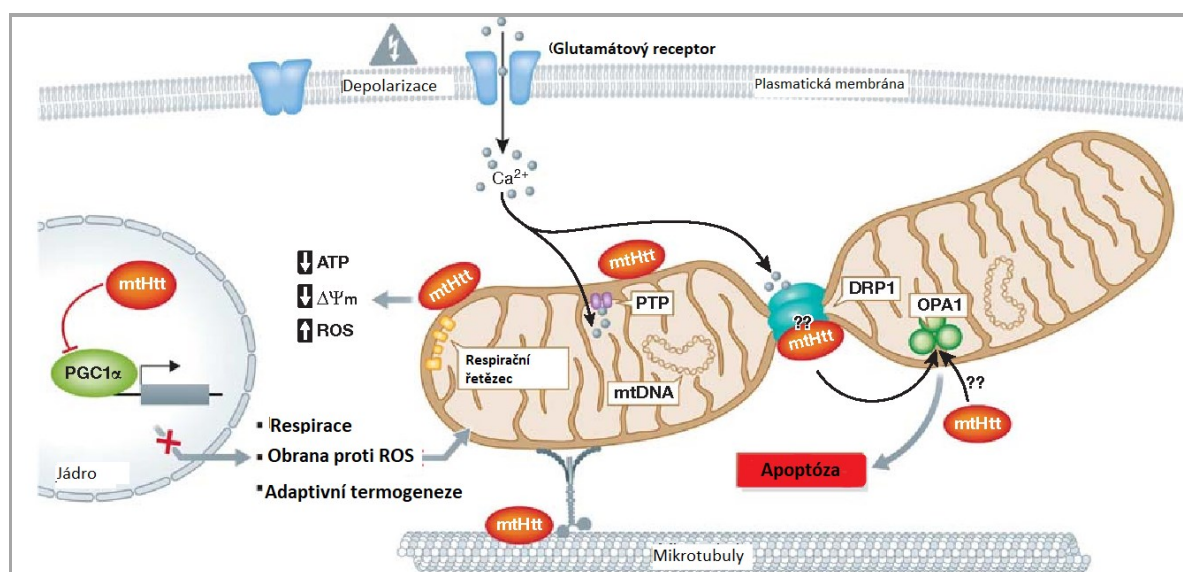
Mitochondriální patologie u Huntingtonovy nemoci

Vztah mitochondriální dysfunkce a HN byl popsán při studiu patogeneze tohoto onemocnění začátkem 80. let v souvislosti s významným poklesem hmotnosti pacientů a sníženou spotřebou fluoro-deoxyglukózy (FDG) v mozku na PET (Sanberg et al., 1981) (Kuhl et al., 1982). Další měření ukázala např. zvýšenou hladinu laktátu ve frontální kůře a bazálních gangliích pacientů s HN (Jenkins et al., 1993), signifikantně snížené aktivity komplexů systému OXPHOS (KII, KIII a KIV) v mozku pacientů s HN (Gu et al., 1996) a byly popsány první případy mitochondriálního poškození mimo nervovou tkáň. Konkrétně se jednalo o sníženou aktivitu KI v kosterním svalu (Arenas et al., 1998) a trombocytech (Parker et al., 1990). Popsání sekvence genu pro Htt a kauzální mutace vyvolala otázku, jaké interakce mezi mHtt a mitochondriemi mohou způsobovat jejich poškození. V současné době je známo, že mHtt ovlivňuje mitochondrie na mnoha úrovních (biogeneze, homeostáza vápenatých iontů, regulace hladiny ROS...) ať už přímou interakcí s proteiny mitochondriální membrány nebo nepřímo přes regulaci exprese genů řídících mitochondriální biogenezi (PGC1 α) a další procesy (Saudou and Humbert, 2016) (Obr. 5). Mutovaný Htt blokuje vazbu transkripčních faktorů skupiny CREB/TAF4 na PGC1 α , což vede k inhibici jeho exprese a tím k poklesu mitochondriální biogeneze a následně poklesu energetického metabolismu. Pokles produkce ATP je následně pro energeticky náročné neurony striata jednou z hlavních příčin neuronální smrti (Vonsattel, 2008).

Vedle nepřímého vlivu mHtt na mitochondriální biogenezi přes transkripční faktory, může v mozku docházet i k přímému kontaktu mHtt a vnější mitochondriální membrány (Panov et al., 2002). Toto spojení mimo jiné zhoršuje pohyb mitochondrií po mikrotubulech. Interakce agregátů mHtt s mitochondriální membránou vede k poklesu membránového potenciálu a vyvolává uvolnění cytochromu *c* z mitochondrií (otevřením póru přechodné propustnosti z angl. Mitochondrial transition pore) a tím spouští apoptotickou dráhu v buňce (Chakraborty

et al., 2014). Mitochondrie dále hrají významnou roli v udržování nízké (cca 100 nM) intercelulární hladiny Ca^{2+} inotů, která je nezbytná pro správné fungování nervových buněk. Je-li hladina Ca^{2+} vyšší, dochází k nesprávné buněčné signalizaci, protože vápenaté ionty fungují jako tzv. druhý posel při aktivaci řady protein kináz a fosfatáz, regulují vypouštění některých synaptických váčků a v neposlední řadě otvírají napětově ovládané kanály, čímž dále destabilizují hladinu Ca^{2+} v buňkách (Raymond, 2017). Porušená homeostáza Ca^{2+} iontů byla prokázána v neuronech *striata* v časných i pozdních fázích HN (Panov et al., 2002).

Mutovaný Htt porušuje mitochondriální dynamiku - rovnováhu mezi fúzí a dělením. Tvoří komplex s cytoplasmatickým proteinem drp1 a mitochondriálním proteinem fis1, který je zodpovědný za dělení mitochondrií. Zvýšená vazba mHtt na drp1 amplifikuje tvorbu komplexu drp1/fis1 a tím stimuluje rozpad mitochondriální sítě. Narušená dynamika mitochondriální sítě má negativní dopad na mitochondriální fyziologii. Zvyšuje senzitivitu k apoptotickým signálům, zhoršuje axonální transport mitochondrií nebo porušuje architekturu krist, což vede k poklesu syntézy ATP, zvýšení oxidačního stresu a na to navazující akceleraci buněčného stárnutí (Costa and Scorrano, 2012).



Obr. 5.: Schéma přímého a nepřímého působení mutovaného huntingtinu na mitochondriální fyziologii v buňkách.

Interakce mHtt s mitochondriální membránou vede k její depolarizaci, což vyvolá snižování produkce ATP a zvyšování tvorby reaktivních forem kyslíku (ROS). Vazba mHtt na mikrotubuly a interakce s proteiny mitochondriální dynamiky (drp1, opa1) brání v distribuci mitochondrií v rámci buněk a dereguluje stabilitu mitochondriální sítě. Interakce mHtt s transkripčním koaktivátorem PGC1 α blokuje expresi genů mitochondriální biogeneze, čímž dochází k poruchám mitochondriálního metabolismu. PTP: mitochondriální pór přechodné propustnosti, mtDNA: mitochondriální DNA, ATP:

adenosin trifosfát, mtHtt: mutovaný huntingtin, Ψ m: membránový potenciál. Upraveno podle (Costa and Scorrano, 2012).

1. Mitochondriální poškození mozkové tkáně u Huntingtonovy nemoci

Změny mitochondriálního metabolismu vyvolané mutací genu pro Htt mají nejvýznamnější dopad na fyziologii CNS. Důvodem (kromě vysoké energetické náročnosti neuronů) je také jejich senzitivita i k nepatrným výkyvům z fyziologického stavu buňky. Snaha objasnit mechanismy patologických jevů v mozku pacientů s HN zahrnuje i intenzivní výzkum změn mitochondriálního metabolismu. Už v roce 1974 byl v souvislosti s HN popsán defekt sukcinát dehydrogenázy (KII) v post mortem analyzované mozkové tkáně (*nucleus caudatus, frontální cortex*) pacientů s HN (Stahl and Swanson, 1974). V devadesátých letech potvrdila PET analýza u 23 pacientů s HN v různých stádiích onemocnění sníženou spotřebu glukózy v oblasti striata na rozdíl od kontrolních vzorků a to dokonce i v období, kdy ještě nebyla detekovatelná atrofie tkáně (Kuwert et al., 1990). Dále byly popsány snížené enzymatické aktivity KI, KIII a KIV systému OXPHOS v bazálních ganliích pacientů v pokročilých stádiích nemoci (Browne et al., 1997).

Post mortem analýza mozkové tkáně pacientů s HN rovněž prokázala dysregulaci mitochondriální fúze a dělení (bazální ganglia a f. cortex) směrem ke zvýšenému rozpadu mitochondriální sítě u pacientů s HN. Dissipace mitochondriální sítě komplikuje, podobně jako samotná vazba mHtt na mitochondriální membránu, distribuci mitochondrií podél axonů, což přispívá k tomu, že oblast synapsí je nedostatečně zásobená ATP a dochází k degeneraci synaptických spojů, jak bylo popsáno např. na myším modelu (Reddy and Shirendeb, 2012).

Předpokládá se, že přímá interakce polyQ sekvence s vnější mitochondriální membránou, se podílí také na zvyšování oxidativního stresu mitochondrií a to platí zřejmě jak při vazbě fragmentů mHtt, tak celého celého proteinu (Puranam et al., 2006).

Mitochondrie hrají nezastupitelnou roli při udržování hladin Ca^{2+} nejen ve striálních neuronech. Neschopnost mitochondrií dostatečně pufrovat změny hladin Ca^{2+} ve striálních neuronech (a nejen tam), vede k depolarizaci cytoplazmatické membrány, vylití cytochromu *c* z mitochondrií a aktivaci kaspáz (Kolobkova et al., 2017). Deregulace hladin Ca^{2+} ve striálních neuronech vedoucí k apoptóze byla potvrzena v časných i pozdních stádiích HN jak u pacientů (Choo et al., 2004) (Panov et al., 2002) tak v modelových orgaismech a je

jedním z významných faktorů, proč jsou u HN nejhůře postiženy právě neurony striata a dochází k jejich ztrátám.

2. Mitochondriální poškození ve vybraných periferních tkáních u Huntingtonovy nemoci

Kosterní sval

Ztráta tělesné váhy, která nesouvisí s množstvím přijaté stravy, úbytek svalové tkáně a choreatické mimovolní pohyby pacientů patřily k prvním důvodům, proč se mitochondrie v kosterním svalu dostaly do centra výzkumu periferních tkání u HN. Intenzivní výzkum svalové tkáně potvrdil významný vliv poškození mitochondriálního metabolismu na svalovou fyziologii jak u pacientů, tak u modelových organismů. První popsání případy svalového poškození u pacientů s HN se sníženou funkcí KI systému OXPHOS popsala v roce 1998 španělská skupina (Arenas et al., 1998). Dalším příkladem byl případ maratonského běžce (s 43 CAG repeticemi na mutované alele), u něhož byla detekována pomalu progredující svalová myopatie s poškozením KIV systému OXPHOS mnoho let před výskytem chorey (Kosinski et al., 2007). Výsledky studie poukázaly mimo jiné na fakt, že mitochondriální patologie ve svalu může být u HN detekovatelná dlouho před prvními neurologickými příznaky. Podobně studie Ciammoly a kolegů, prokázala snížený anaerobní „threshold“ a zvýšenou hladinu plasmatického laktátu u pacientů s HN i u pre-symptomatických jedinců. Tento fakt může signalizovat preferované využití glykolýzy na úkor oxidační fosforylace. Při zátěži však měli pacienti, pre-symptomatické osoby i kontrolní jedinci srovnatelnou svalovou kapacitu (Ciammola et al., 2011). Bylo popsáno, že snížený oxidační metabolismus mitochondrií ve svalu vede k progresi svalové atrofie a k dalšímu zhoršování klinického stavu pacienta s HN. V myoblastech pacientů s HN byl detekován snížený mitochondriální membránový potenciál vedoucí k vyplavení cytochromu *c* do cytosolu, aktivaci kaspáz (-3, -8, -9) a apoptotické dráhy. V diferencovaných myotubulech pak docházelo k tvorbě inkluzí mHtt (Ciammola et al., 2006). Změny byly patrné i na úrovni ultrastruktury mitochondrií pacientů s HN. Jejich mitochondrie byly signifikantně prodloužené, nafouklé a měly porušené uspořádání krist na rozdíl od kontrolních vzorků (Ciammola et al., 2011). U R6/2 myšího modelu pro HN bylo zjištěno, že interakce mHtt s mitochondriemi a RyR1 receptory sarkoplasmatického retikula dereguluje rovnováhu Ca^{2+} iontů v myoplasmě, což vede k depolarizaci mitochondriální membrány, zvyšování produkce ROS a poklesu oxidačního metabolismu (Braubach et al., 2014).

Rozsáhlé studie posledních let navíc napovídají, že mitochondriální dysfunkce a s ní související svalové poškození u HN nejenže hraje významnou roli v patologii onemocnění, ale může být do určité míry nezávislé na poruše bazálních ganglií nebo kortexu (van der Burg et al., 2009) (Mantovani et al., 2016).

Kožní fibroblasty

Podobně jako v kosterním svaly, byla mitochondriální patologie popsána i u kožních fibroblastů, které jsou relativně dobře dostupným a v laboratořích hojně využívaným, a tedy dobře charakterizovaným biologickým materiálem pacientů různých onemocnění. Potvrzená exprese huntingtinu pak otevřela možnosti studia mitochondriální patologie i v tomto typu periferní tkáně (Li et al., 1993).

Mezi prvními negativními projevy HN ve fibroblastech byly popsány patologické ultrastrukturální změny mitochondrií. Studie prokázala snížené množství krist a tzv. mitochondriální swelling, neboli patologické bobtnání mitochondrií u fibroblastů od pacientů s HN ve srovnání s kontrolou. Porovnání vzorku od homozygotního a heterozygotního pacienta navíc odhalilo významnější ultrastrukturální změny u homozygotního jedince a předpoklad, že je míra patologie HN ovlivněna dávkou mHtt. Stejný mitochondriální fenotyp byl popsán i u myoblastů pacientů s HN (Squitieri et al., 2010).

V roce 2018 byly publikovány výsledky analýzy porovnávající fibroblasty od 9 pacientů s HN. Každý pár obsahoval fibroblasty od pacienta s nižším věkem nástupu onemocnění a fibroblasty od pacienta, u kterého HN propukla v pozdějším věku a cílem bylo zjistit, zda věk nástupu HN, hraje roli v patologii mitochondrií či nikoli. A bylo prokázáno, že změny mitochondriálního metabolismu ve fibroblastech jsou ovlivněné věkem nástupu onemocnění. U pacientů s dřívějším propuknutím nemoci byla naměřena snížená hladina ATP při expozici H_2O_2 a nižší míra maximální respirace ve srovnání se vzorky od pacientů s pozdějším nástupem HN. To naznačuje, že fibroblasty pacientů s dřívějším nástupem nemoci hůře reagují na zvýšení energetické poptávky, čímž dochází k prohlubování toxických efektů poškození mitochondrií (Gardiner et al., 2018). Jedrak a kolektiv pak ve své studii týkající se fibroblastů dospěli k podobným závěrům a pozorovali, že u fibroblastů s HN je snížená produkce ATP i proliferační rychlost na rozdíl od kontrolních linií (Jędrak et al., 2018).

Krevní komponenty - lymfocyty

Lymfocyty izolované z periferní krve jsou další snadno dostupnou tkání, kde byla evidována patologie spojená s HN včetně mitochondriálního poškození. Konkrétně byl popsán toxický

vliv fragmentů mHtt, které se jednak hromadí v lymfocytech heterozygotních pacientů s HN a jednak přímo interagují s mitochondriální membránou, což ovlivňuje interakci s dalšími vazebnými partnery mitochondrií i procesy fúze a rozpadu mitochondrií samotných (Panov et al., 2002). Studie periferní krve také prokázala v monocytech a lymfocytech od pacientů s HN signifikantně zvýšenou hladinu pro-apoptotického proteinu Bax a u patientských vzorků bylo navíc ve srovnání s kontrolou zvýšené množství ROS (Almeida et al., 2008) .

Dále byl v lidských lymfoblastech heterozygotních pacientů s HN pozorován snížený membránový potenciál mitochondrií a celkově pokles mitochondriálního metabolismu (Panov et al., 2002). A v neposlední řadě byly popsány i patologické změny ultrastruktury mitochondrií v lymfoblastech pacientů s HN. Docházelo u nich k výrazné remodelaci krist a změnám velikosti mitochondrií ve srovnání s kontrolními vzorky. Patologie byla navíc intenzivnější u homozygotů než u heterozygotních osob (Squitieri et al., 2006).

Transgenní modelové organismy pro studium Huntingtonovy nemoci

Jak již bylo výše zmíněno, k nejzávažnějšímu postižení u HN dochází v CNS, v oblasti *striata* bazálních ganglií. Vzhledem k uložení *striata* hluboko v šedé kůře koncového mozku je možné studovat tuto oblast u humánních vzorků získaných post mortem, nejčastěji v terminálním stadiu onemocnění. Pro studium progresu nemoci na biochemické a molekulárně genetické úrovni pacientů s HN jsou tedy dostupné pouze periferní tkáň. Ačkoli je studium patologických změn spojených s HN v periferních tkáních hojně a s úspěchem využíváno, neumožňuje například odpovědět, proč je u HN nejvíce postiženo právě *corpus striatum* a jak cílit terapii přímo pro tuto oblast mozku.

Nedostupnost vhodných humánních vzorků si vyžádala přípravu a využití transgenních zvířecích modelů. Přestože má korelace a interpretace výsledků humánních tkání a tkání modelových organismů mnohá úskalí, současný výzkum neurodegenerativních chorob bez vhodného transgenního modelu není možný.

Od devadesátých let byla vyvinuta řada modelových organismů exprimujících mutovaný huntingtin ať už se jednalo o jednobuněčné *Saccharomyces cerevisiae* (Wang and Qin, 2006), bezobratlé rodu *Drosophilla* (Jackson et al., 1998) nebo *Caenorhabditis elegans* (Faber et al., 2002). Všechny připravené modely vykazovaly určité symptomy (biochemické a/nebo behaviorální) pozorované u pacientů s HN, avšak závažnost onemocnění i rozsah jeho patologií si vyžádalo přípravu transgenních modelů evolučně podobnějších člověku.

Při přípravě savčího modelu HN byla preferovanou volbou transgenní myš (Mangiarini et al., 1996). Prvním myším modelem pro HN byla linie R6 myši (model pro HN R6/1 a R6/2). Model R6/2 je dodnes nejrozšířenějším myším modelem pro HN a exprimuje exon 1 lidského Htt se 144 CAG repeticemi, který je pod kontrolou lidského promotoru o přibližné délce 1 Kb (Mangiarini et al., 1996). Jako první se u těchto myši objevují 9-11 týdnů po narození změny chování, dále se přidávají reprodukční problémy, ztráta tělesné váhy, epileptické záchvaty a přibližně po 2-3 týdnech od prvních příznaků dochází k úmrtí jedince. Rychlý průběh onemocnění a malý rozměr mozku však neumožňuje u tohoto modelu uspokojivě sledovat patologické změny spojené s progresí HN přímo v mozkové tkáni (Van Raamsdonk et al., 2005).

Řízené poškození myšího homologu lidského Htt (mutace v 5.exonu genu pro *Hdh^{ex5}*) umožnilo objasnit význam huntingtinu pro embryonální vývoj nervové soustavy. U homozygotních jedinců nesoucích zmíněnou mutaci docházelo k embryonální letalitě v období časně gastrulace. U heterozygotů byly popsány motorické a kognitivní defekty bylo tak potvrzeno, že Htt je nezbytný pro správný postimplantační vývoj nervové soustavy a hraje důležitou roli ve správném fungování bazálních ganglií (Nasir et al., 1995).

Problémem myších transgenních modelů pro HN je to, že ačkoli je myší homolog Htt vysoce evolučně konzervovaný a celkově má s humánním proteinem 91% homologii, že se významně liší právě v oblasti CAG repetice prvního exonu. Ta u těchto hlodavců kóduje pouze 7 glutaminů (Q), na rozdíl od 10-26 Q vyskytující se v běžné lidské populaci (Barnes et al., 1994).

I další myší modely, ať už byly vytvořeny inzercí různě dlouhých úseků lidského nebo myšího mHtt genu (např. *HdhQ111* myš), pomocí bakteriálních vektorů (BAC, Bacterial artificial chromosomes) nebo kvasinkových chromosomů (YAC, Yeast artificial chromosomes), se vesměs potýkají s podobnými limity příliš brzkého nástupu onemocnění, jehož průběh bývá tak rychlý, že neumožňuje sledovat progresi onemocnění. Projevy choroby se navíc liší v rámci generací. V neposlední řadě nevýhodou myšího modelu je i rozdílné uspořádání mozkových struktur, kdy na rozdíl od člověka, nejsou u myši rozeznatelné oblasti bazálních ganglií *putamen* a *nucleus caudatus*, které jsou u pacientů s HN poškozeny nejvýznamněji (Ross and Tabrizi, 2011).

Zkušenosti s malými transgenními modely pro HN vedly k potřebě vyvinout k tzv. velký transgenní savčí model (Angl. Large animal model), který by se délkou života, velikostí těla,

uspořádáním mozku nebo komplexitou imunitního systému co nejvěrněji podobal lidskému organismu a umožňoval by dlouhodobě studovat jak období preklinické, tak progresi nemoci.

Díky tomu byl roku 2008 pomocí lentivirové transdukce vytvořen transgenní nehumánní primát makak rhesus (Yang et al., 2008). Následovala ovce vyvinutá po mikroinjekci cDNA humánního genu pro Huntingtin s 69 CAG repeticemi přímo do zygoty (full-length cDNA) (Jacobsen et al., 2010).

Dalším zvířetem vhodným pro přípravu velkého transgenního modelu pro studium HN, je prase. Na rozdíl od eticky problematického studia primátů, je prase, podobně jako ovce, dlouhodobě zvyklé na řízený chov, dobře se množí a je možné u něj provádět i určité behaviorální a kognitivní testy. Ukázalo se, že projevy HN u prasečích modelů jsou výraznější než u ovčí, kde může onemocnění probíhat velmi mírně a patologii je tak možné pozorovat jen na behaviorální úrovni, například změnami cirkadiálních rytmů (Morton and Howland, 2013). Vedle výraznějších příznaků HN, mezi další výhody prasečího modelu, ve srovnání s ovčím, patří vyšší počet potomků ve vrhu, člověku podobnější uspořádání a velikost mozku, velikost těla, podobnější imunitní systém a dlouhý životní cyklus.

V roce 2009 byl v Ústavu živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd v Liběchově pomocí lentivirové transdukce vytvořen model miniaturního transgenního prasete, které exprimuje prvních 548 aminokyselin Htt genu pod kontrolou lidského Htt promotoru ((HTT)1–548). Podařilo se tak vytvořit transgenní model miniprasete, které má do oblasti 1q24-q25 genomu vnesenou jednu kopii lidského (HTT) 1–548 inzertu a obsahuje 145 CAG repetit. Úspěšný přenos v zárodečné linii byl ověřen v F0, F1, F2 a F3 generacích (Baxa et al., 2013). Analýza mozkové tkáně u čtyřměsíčního prasete F2 generace potvrdila přítomnost fragmentů mHTT ve frontální kůře, *putamenu*, *nucleu caudatu*, *hipocampu*, *hypothalamu*, *thalamu*, *cerrebellu*, míše a vybraných periferních tkáních (Baxa et al., 2013).

	Myš	Ovce	Prase	Opice
Gestační perioda	20 dní	145 dní	114-115 dní	167 dní
Obvyklý počet potomků	5-10	1-2	5	1
Délka života (roky)	2	15	9-14	15
Hmotnost mozku (gramy)	0,5	130-140	90	90
Anatomie kortexu	Lissencephalický	Gyrencephalický	Gyrencephalický	Gyrencephalický
způsob pohybu	kvadrupédní	kvadrupédní	kvadrupédní	bipédní
Etická zátěž	nízká	nízká	střední	velmi vysoká

Obr. 6.: Porovnání vybraných parametrů u organismů využívaných pro přípravu transgenních zvířecích modelů pro Huntingtonovu chorobu.

Vybrané položky představují příklad parametrů důležitých při výběru zvířete vhodného pro vývoj transgenního modelu pro HN. S důrazem na stavbu mozku i životní cyklus. Upraveno podle (Sorby-Adams et al., 2018), (Růna Vochozková 2019).

Výše představené transgenní zvířecí modely jsou označovány jako modely první generace a to proto, že techniky, kterými byly vytvořeny, neumožňovaly cílenou integraci studovaného genu nebo fragmentu do konkrétního místa genomu. Úspěšnost vzniku stabilního modelu tak závisela především na náhodě. Umístění transgenního fragmentu a jeho exprese pak mohla být ovlivněna strukturou okolního genomu. V současnosti probíhá příprava tzv. modelů druhé generace, u kterých je snaha vnést mutovaný huntingtin na správné místo genomu, tedy na krátké raménko 4. chromosomu.

V roce 2018 byl představen prasečí model vytvořený metodou Crispr/Cas9, u něhož byl prasečí 1. exon nahrazen lidským obsahujícím 150-CAG repetice (tzv. Knock-in pig model). Ale kromě vysoké mortality potomků byl u tohoto transgenního modelu pro HN problém

s nestabilitou CAG repetice, která zde není stabilní a její délka se liší v rámci tkání i generací (Yan et al., 2018).

Příprava podobného „knock-in“ transgenního prasečího modelu pro HN proběhla úspěšně v laboratořích Exemplar Genetics (USA) a potomci jsou nyní kříženi a testováni v PIGMOD centru Ústavu živočišné fyziologie v Liběchově. U tohoto modelu byla pomocí LoxP rekombinace a technologie somatického jaderného přenosu (z Angl. „LoxP mediated recombination and somatic cell nuclear transfer technology“) do endogenního genu Htt vpravena repetice 82 CAG doplněných o úsek CAACAGCAG, což vedlo ke vzniku modelu s 85Q v Htt proteinu. Na vybraných tkáních u 15 měsíců starých knock-in jedinců (F1 a F2 generace) byla ověřena exprese mHtt srovnatelná s hladinou endogenního Htt. U těchto jedinců nebyly zatím detekovány agregáty mutovaného Htt. Nově vyvinutý knock-in prasečí model by měl nalézt uplatnění především v testování molekulární terapie HN cílené právě na expandovanou CAG repetici mutovaného huntingtinu (Howland et al., 2020).

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Cíl práce

Tématem práce bylo studium poškození energetického metabolismu, uspořádání sítě a ultrastruktury mitochondrií u Huntingtonovy nemoci ve vybraných periferních tkáních pacientů a modelového transgenního prasete.

Kromě samotné charakterizace mitochondriálního poškození bylo záměrem zavést a optimalizovat metody pro studium mitochondriální patologie u HN v dostupných tkáních a charakterizovat případný vhodný biomarker onemocnění, který by dobře odrážel patologický obraz momentálního stavu pacienta, a zároveň, aby bylo možné změny jeho parametrů snadno sledovat během nástupu a progresu onemocnění, případně během experimentální léčby.

Specifické cíle disertační práce

- 1) *Zavést a ověřit využití mikroimunoanalýzy pro stanovení množství mitochondriálních komplexů I a IV systému oxidační fosforylace v buňkách bukálního stěru u pacientů s Huntingtonovou nemocí.*
- 2) *Analyzovat mitochondriální parametry ve vybraných periferních tkáních symptomatických pacientů s Huntingtonovou nemocí.*
- 3) *Charakterizovat mitochondriální ultrastrukturu a funkce v tkáních transgenního modelu miniprasete pro Huntingtonovu nemoc v pre-symptomatickém a časně symptomatickém období.*

Biologický materiál

U Huntingtonovy nemoci je nejvýznamněji poškozena centrální nervová soustava (*corpus striatum*, bazální ganglia), ale patologické změny byly mnohokrát popsány i v periferních tkáních (Marques Sousa and Humbert, 2013), což umožňuje snadněji studovat negativní dopady onemocnění na organismus.

Při výběru biologického materiálu pro výzkum mitochondriálního poškození u pacientů s Huntingtonovou nemocí je důležité, aby studovaná periferní tkáň byla jednak dobře

dostupná pro odběr (např. buňky bukalní sliznice, spermie) a měla významnou mitochondriální aktivitu (např. kožní fibroblasty, krevní komponenty, kosterní sval).

Spolupráce s Ústavem živočišné fyziologie v Liběchově nám umožnila podílet se na charakterizaci transgenního modelu miniprasete pro HN. Transgenní model prasete exprimuje prvních 548 aminokyselin Htt genu pod kontrolou lidského Htt promotoru ((HTT)1–548) (Baxa et al., 2013). Výhodou byla možnost testovat ucelený soubor geneticky dobře definovaných transgenních i kontrolních jedinců (vždy stejného věku) od narození, přes propuknutí nemoci i její následnou progresi.

U transgenního modelu pro HN byly testovány mitochondriální charakteristiky v širším spektru tkání než u pacientů a výsledky byly využity pro cílení dalšího výzkumu u pacientů s HN.

Vzorky od pacientů s Huntingtonovou nemocí a kontrolních osob

Všechny humánní vzorky (pacientů s HN i kontrolní) byly odebrány ve spolupráci s lékaři neurologické kliniky 1. LF UK a VFN v Praze v souladu s protokolem schváleným etickou komisí Všeobecné fakultní nemocnice a 1. lékařské fakulty UK v Praze. Všem odběrům předcházelo poučení testovaných osob a podepsání informovaného souhlasu (č. 115/15 Grant COST MSMT COST 1. LF UK 29.9.2015, č. 14/19 Grant AZV VES 2020 VFN 23.5.2019).

Všichni sledovaní pacienti s Huntingtonovou nemocí byli symptomatictí heterozygoti. Délka CAG repetice na mutované alele byla v rozmezí 40-62. Nikdo z nich netrpěl juvenilní formou onemocnění.

Kontrolní biologický materiál byl získán z řad dobrovolníků ve věku 21-76 let, kteří nebyli s pacienty s HN v genetické příbuznosti.

Tabulka 1: Přehled použitých vzorků od pacientů s HN v jednotlivých studiích s informacemi o pohlaví, věku (roky) a o počtu CAG repetit na mutované alele (u pacientů).

Kapitola výsledků	Biologický materiál	Pacienti					Kontroly			
		Počet	M	Ž	Věk (roky)	CAG	Počet	M	Ž	Věk (roky)
1.1.	Buňky bukální sliznice	6	3	3	22-58	42-53	2	0	2	25-30
1.2.	Buňky bukální sliznice	34	15	19	36-64	40-53	22	11	11	32-58
2.1.	Kultivované kožní fibroblasty	10	8	2	31-62	42-62	15	9	6	21-50
2.2.	Lymfocyty	36	19	17	22-74	40-58	49	25	24	21-76

Vzorky od transgenního modelu miniprasete pro Huntingtonovu nemoc (TgHN) a kontrolních jedinců (WT)

Pro studium mitochondriálního poškození u Huntingtonovy choroby byl použit model transgenního miniprasete (F1, F2 a F3 generace), které ve svém genomu exprimuje prvních 548 aminokyselin N-terminální části lidského mHtt. Vnesený fragment obsahuje 145 CAG repetit a použitý model se řadí do kategorie tzv. velkých savčích modelů, které se délkou života, velikostí těla a uspořádáním mozku co nejvíce blíží lidskému organismu. Kontrolními jedinci byli zdraví sourozenci, kteří odpovídali TgHN zvířatům věkově, genetickým pozadím a stejným prostředím, ve kterém vyrůstali (Baxa et al., 2013). Veškeré vzorky byly získány ve spolupráci s Ústavem živočišné fyziologie a genetiky Akademie Věd ČR v Liběchově, kde byly rovněž odebrány.

Všechny experimenty s modelovými zvířaty a odběry biologického materiálu byly provedeny v souladu s Výborem pro péči o zvířata a jejich použití Ústavu živočišné fyziologie a genetiky a byly provedeny podle aktuálních českých předpisů a pokynů pro péči o zvířata se souhlasem Státní veterinární správy ČR.

Zvířata byla sledována od narození. Kromě biochemických a molekulárně genetických analýz byla podrobována také kognitivním a behaviorálním testům. Testy a odběry tkání u nich probíhaly v přesně stanovených obdobích obvykle ve věku 13, 24, 36, 48 a 66 měsíců od narození.

Tabulka 2: Přehled použitých vzorků transgenních a kontrolních miniprasat v jednotlivých studiích s informacemi o pohlaví, věku (měsíce) a v případě TgHN jedinců o počtu CAG repetice

Kapitola výsledků	Tkáň	Transgenní prase					Kontrolní prase			
		počet	♂	♀	Věk (měsíce)	CAG	počet	♂	♀	Věk (měsíce)
3.1.	Kosterní sval	27	13	14	24-66	145	24	9	15	24-66
3.2.	Spermie	6	6	-	12-65	145	6	6	-	12-65
3.3.	Lymfocyty	19	10	9	24-69	145	18	10	8	24-69
	Mozek, frontální kůra	18	8	10		145	15	7	8	
	Mozek, Bazální ganglia	11	4	7	24-48	145	10	5	5	24-48

METODY

Následující text je rozdělen na část metodologickou s důrazem na zavedení mikroimunoanalýzy a využití transmisní elektronové mikroskopie. Tyto metody byly do laboratoře zaváděny a optimalizovány právě v souvislosti se studiem mitochondriální patologie u Huntingtonovy nemoci.

Další metody jsou uvedeny v samostatné tabulce s odkazy na konkrétní publikace v přílohách disertační práce, kde jsou podrobněji popsány.

Mikroimunoanalýza (MIA)

Stanovení množství komplexu I a komplexu IV systému OXPHOS pomocí kitu Complex I /Complex IV Human Protein Quantity Dipstick Assays (ab109722, ab109877, Abcam Mitosciences, Cambridge, UK).

A) Odběr epiteliálních buněk bukové sliznice

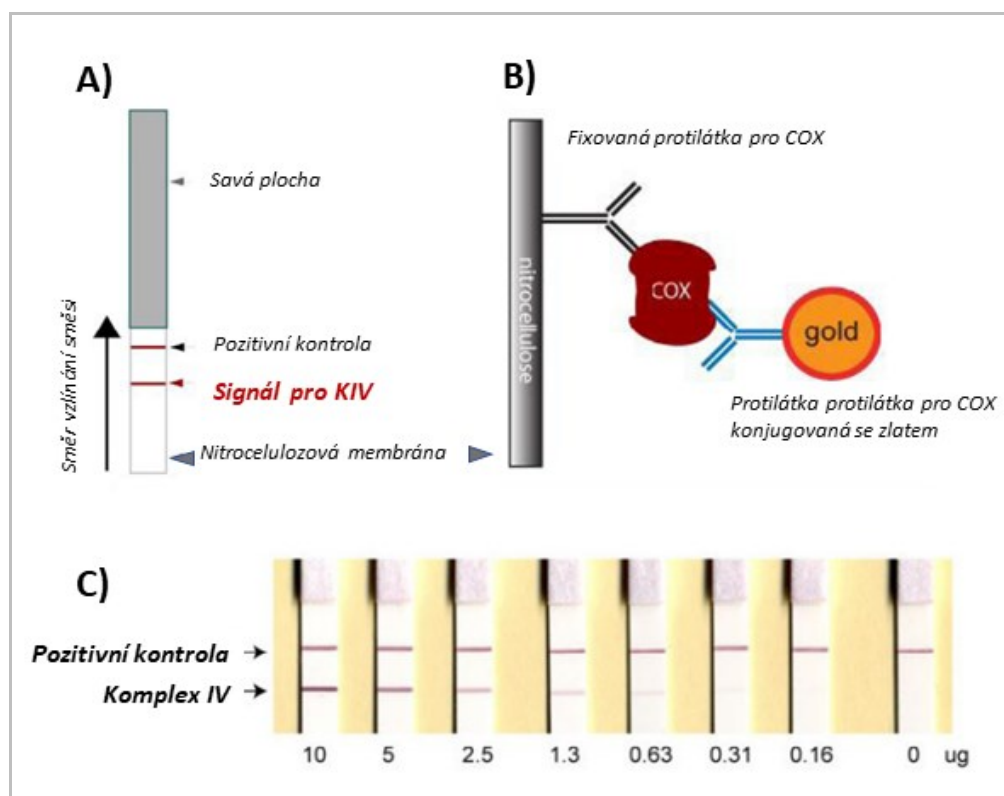
Štěr epiteliálních buněk z bukové sliznice pacientů a kontrolních jedinců byl odebrán pomocí „štětečků“ Sterile OmniSwab (Whatman, St. Louis, MO). Odběr byl proveden jemným seškrábnutím buněk sliznice dutiny ústní (vnitřní strana tváře), aby nedošlo k poranění a kontaminaci vzorku krví. Od každého jedince byly odebrány dva „štětečky“ a nejpozději do 4 hodin od odběru hluboce zmrazeny (-80°C). Pro plnou analýzu množství komplexu I a IV dýchacího řetězce pomocí Dipstick Quantity Assay (ab109722, ab109877, Abcam Mitosciences, Cambridge, UK) byl spotřebován vždy jeden „štěteček“. Stejným způsobem byly odebrány i vzorky od TgHN a kontrolních miniprasat, u nichž jsme metodu mikroimunoanalýzy rovněž testovali (Rodinova et al., 2015).

B) Postup metody

Buňky bukového štěru na štětečku byly lyzovány v 500 µl Pufru A, lyzát byl centrifugován 20 minut na 15,000 g při 4 °C. Do supernatantu byl přidán inhibitor proteáz 1% (V/V) PIC, protease inhibitor cocktail Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

Celková koncentrace proteinů ve vzorcích byla stanovena Lowryho metodou (Lowry et al., 1951). Vzorek o celkovém množství proteinu 200 µg (pro analýzu KI) nebo 100 µg (pro analýzu KIV) byl mixován s 25 µl pufru B a směs byla přenesena na mikrodestičku s dehydratovanými se zlatem konjugovanými (barevná signalizace) protilátkami proti

komplexu I nebo IV systému OXPHOS. Po rehydrataci protilátek byla do jamky přidána detekční tyčinka, která obsah jamky absorbovala, a protilátky byly specificky zachyceny na detekčním proužku. Následného zlepšení kontrastu bylo docíleno přidavkem 30 μ l oplachovacího pufru C. Vysušené tyčinky byly skenovány a intenzita signálu pro KI nebo KIV byla vyhodnocena pomocí programu Quantity One 1-D Analysis Software (BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA). Analýza byla vždy prováděna v sériích s kontrolami, patientskými vzorky a interní kontrolní směsí. Každý vzorek byl pro minimalizaci vzniku chyby pipetování měřen v dubletu. Optimalizace odběru a uchování vzorků stejně jako validace samotné metody byla již dříve v laboratoři provedena na vzorcích pacientů s mutací v *SURF1* genu pro asemblační faktor komplexu IV (Rodinová et al., 2014).



Obr. 7: Schéma detekčních tyčinek pro stanovení množství Komplexu IV pomocí mikroimunoanalýzy.

A) Celá detekční tyčinka se signály pro KIV a pozitivní kontrolu. B) Detail sendvičového uspořádání protilátek interagujících s komplexem IV na nitrocelulózové části tyčinky. C) Pokles intenzity signálu pro KIV s nižší koncentrací proteinu ve vzorkové směsi. (Upraveno podle uživatelské příručky Abcam, (Copyright © 2012 Abcam))

Transmisní elektronová mikroskopie (TEM)

Popsaná metoda byla shodně využita jak pro vzorky od pacientů s HN a kontroly, tak pro transgenní model miniprasete pro HN a kontroly.

A) Příprava vzorků z kultivovaných adherentních buněk (kožní fibroblasty)

Buňky z jedné kultivační lahvičky o ploše 25 cm² byly pěstovány do konfluence 70% - 90% a byly při pokojové teplotě fixovány 15 minut v roztoku 2% (w/v) KMnO₄ ve fosfátovém pufru (1x phosphate-buffered saline, PBS, BioWhittaker, Lonza, Walkersville, MD). Fixované vzorky byly dehydratovány v etanolové řadě (10 min v 50%, 70% a 90% etanolu, 30 min, ve 100 % etanolu) a převedeny do durcupanové pryskyřice (2 hodiny - Durcupan Epon : propylén oxid 1 : 1, přes noc - Durcupan Epon : propylén oxid 3:1). Polymerizované bloky byly pomocí ultramikrotomu (Ultracut III Reichert microtome) nakrájeny na řezy o síle 600-900 Å, nanесeny na měděné sítky (SPI, Mesh 3 mm 200) a barvené citrátem olova a uranyl acetátem. Vzorky byly snímány na transmisním elektronovém mikroskopu JEOL JEM 1200 (JEOL, MA) na Ústavu patologie VFN a 1. LF UK (Rodinova et al., 2019).

B) Příprava vzorků z tkání

Pro potřeby TEM byly fixovány kousky tkáně získané z biopsie nebo autopsie o velikosti cca 1,5 x 1,5 mm. Do fixačního roztoku byly vloženy neprodleně po odběru a ponechány týden při 4 °C před dalším zpracováním. Fixačním roztokem byl 2,5% paraformaldehyd ve fosfátovém pufru (pH 7,2-7,4) pro svalovou a srdeční tkáň a 2,5-3% glutaraldehyd ve fosfátovém pufru (pH 7,2-7,4) pro mozkovou tkáň. Dehydratace vzorku a další kroky byly shodné se zpracováním adherentních buněk, tedy dehydratace v etanolové řadě (10 min v 50%, 70% a 90% etanolu, 30 min, ve 100% etanolu) a převedení do durcupanové pryskyřice (2 hodiny - Durcupan Epon : propylén oxid 1 : 1, přes noc - Durcupan Epon : propylén oxid 3:1). Polymerizované bloky byly pomocí ultramikrotomu (Ultracut III Reichert microtome) nakrájeny na tzv. polotenkové řezy o síle 0,5 µm pro výběr vhodné části tkáně a její správnou orientaci (podélný nebo příčný řez svalovou tkání apod.). Vybrané části byly krájeny pomocí ultramikrotomu (Ultracut III Reichert microtome) na řezy o síle 600-900 Å, nanесeny na měděné sítky (SPI, Mesh 3 mm 200) a barvené citrátem olova a uranyl acetátem a snímány transmisním elektronovým mikroskopu JEOL JEM 1400 (Plus) (Rodinova et al., 2019).

Tabulka 3: Biologický materiál a použité způsoby fixace pro transmisní elektronovou mikroskopii. Platí pro vzorky od pacientů s HN i vzorky od transgenního prasečího modelu pro HN. Tkáně byly fixovány bezprostředně po odběru. PBS – fosfátový pufr (z Angl. Phosphate buffer saline).

Materiál	Fixační činidlo	Délka fixace	Teplota
Kultivované kožní fibroblasty, lymfocyty, spermie	2,5% čerstvý manganistan draselný v PBS	15 min	pokojová
Kosterní sval, srdeční tkáň	10% paraformaldehyd v PBS	7 dní	4 °C
Mozek (frontální kůra, bazální ganglia, neuroretina)	2,5% glutaraldehyd v PBS	7 dní	4 °C

C) Snímání vzorků připravených pro transmisní elektronovou mikroskopii

Připravené vzorky byly snímány pomocí transmisního elektronového mikroskopu JEOL na Ústavu patologie VFN a 1. LF UK, Studničkova 2, Albertov, Praha 2.

Převážná většina připravených vzorků kultivovaných buněk i tkání pro TEM byla nasnímána na mikroskopu JEOL JEM 1400 plus (dodán 2015). Jedná se o mikroskop s wolframovou katodou a urychlovacím napětím až 120kV vhodný pro studium biologických vzorků. Zvětšení mikroskopu je až 2 000 000x a rozlišení 0,20 nm. Mikroskop je doplněn vysoce senzitivní externí digitální kamerou VELETA G3 (Emsis GmbH System, Německo) s rozlišením 4 megapixely a rychlostí snímání 30 obrázků za sekundu při plném rozlišení. Snímky byly uchovány v elektronické databázi laboratoře, sítky s připravenými vzorky byly rovněž archivovány a je možné je opakovaně snímat.

Starší vzorky kultivovaných buněk (nikoli tkání) byly snímány na mikroskopu JEOL JEM 1200 s urychlovacím napětím až 120kV a zvětšením 500 000x. Součástí mikroskopu nebyla kamera a snímky byly vytvářeny přímým exponováním fotografického filmu letícími elektrony. Filmová kazeta byla uložena v dolní části tubusu mikroskopu a získaný obraz byl vyvolán jako klasický černobílý negativ. Negativy byly po digitalizaci (skenování na Epson perfection V500 PHOTO) archivovány společně s připravenými sítěmi v databázi vzorků. Absence digitální kamery významně snižovala praktické možnosti využití mikroskopem

nabízeného zvětšení. Intenzita obrazu na stínítku, který umožňoval kontrolovat například ostrost, s přibývajícím zvětšením rychle klesala, což způsobovalo komplikace při práci.

D) Spolupráce při realizaci metody TEM

Příprava vzorků probíhala ve spolupráci s pracovníky laboratoře elektronové mikroskopie Ústavu patologie VFN a 1. LF UK (Paní Kirchmanová a Odvodyová). Zabezpečovaly část přípravy zahrnující převod dehydratovaného vzorku do pryskyřice, následné rutinní krájení ultratenkých řezů včetně kontrastování vzorku na měděné mřížce. Při práci s původním mikroskopem JEOL JEM 1200 vyvolávaly snímky.

Autorčina část přípravy zahrnovala odběr, případně spolupráci při odběru materiálu, fixaci, dehydrataci, u vzorků tkání i výběr vhodných řezů a následné snímání vzorků včetně jejich analýzy a vyhodnocení.

Přehled dalších použitých metod

Tabulka 4a: Stručný přehled biochemických metod použitých k charakterizaci mitochondriálních parametrů v různých tkáních u pacientů s HN a transgenního modelu pro HN – miniprasete a příslušných kontrol.

U každé metody je odkaz na podrobnější popis v příloze s původním odborným článkem na dané téma.

Pacienti: pacienti s HN, model: transgenní miniprase pro HN, stejné postupy metod platily i pro přípravu kontrolních vzorků, příloha: odkazuje na označení původní autorské publikace, kde je metoda podrobněji popsána včetně konkrétních studií.

	Metoda/ parametr	Organismus	Tkáň	Příloha
Biochemické metody	aktivita komplexů OXPHOS a CS/ spektrofotometrie	pacienti	fibroblasty	P.2.1.
			lymfocyty	P.2.2.
		model	kosterní sval	P.3.1.
			spermie	P.3.2.
			lymfocyty, mozek	P.3.3.
	aktivita PDH komplexu / radiochemická analýza	model	lymfocyty, mozek	P.3.3.
	Obsah vybraných mitochondriálních proteinů (SDS, WB, imunodetekce)	pacienti	fibroblasty	P.2.1.
			lymfocyty	P.2.2.
		model	spermie	P.3.2.
			lymfocyty	P.3.3.
	Obsah komplexů OXPHOS (BN, WB, imunodetekce)	model	kosterní sval	P.3.1.
	celkové množství koenzymu Q10/ HPLC			
	Měření kapacity mitochondriálního energetického metabolismu (MEGS)	pacienti	fibroblasty	P.2.1.
		model	spermie	P.3.2.
	Respirometrie pomocí oxygrafu OROBOROS Oxygraph 2K	pacienti	fibroblasty	P.2.1.
		model	kosterní sval	P.3.1.
			spermie	P.3.2.
	Histochemické značení aktivity komplexů systému OXPHOS v BN-PAGE gelu	model	spermie	P.3.2.
	Izolace mitochondriální frakce	model	kosterní sval	P.3.1.
	Analýza peroxidace lipidů	model	lymfocyty	P.3.3.

Tabulka 4b: Stručný přehled molekulárně genetických a dalších vybraných metod použitých k charakterizaci mitochondriálních parametrů v různých tkáních u pacientů s HN a transgenního modelu pro HN – miniprase a příslušných kontrol.

U každé metody je odkaz podrobnější popis v příloze s původním odborným článkem na dané téma.

Pacienti: pacienti s HN, model: transgenní miniprase pro HN, stejné postupy metod platily i pro přípravu kontrolních vzorků, příloha: odkazuje na označení původní autorské publikace, kde je metoda podrobněji popsána včetně konkrétních aplikací.

	Metoda	Původ vzorku	Tkáň	Příloha
Molekulárně genetické metody	Izolace DNA	model	lymfocyty	P.2.2.
		pacienti	lymfocyty	P.2.2.
	Analýza integrity DNA	model	kosterní sval, lymfocyty	P.3.3.
	Analýza kvantitativní real-time qPCR	pacienti	lymfocyty	P.2.2.
		model	lymfocyty	P.3.3.
	Analýza genové exprese	pacienti	lymfocyty	P.2.2.
	Stanovení DNA-glykosylázové aktivity - reparační schopnosti DNA	model	lymfocyty	P.3.3.
	počet kopií mtDNA	model	lymfocyty	P.3.3.
Metody tk. kultur	Kultivace a sklízení fibroblastů	Pacienti, model	fibroblasty	P.2.1.
	Epifluorescence, Nativní značení mitochondriální sítě a její analýza	pacienti	fibroblasty	P.2.1.
Jiné	Motorické a kognitivní testy	model	Živý jedinec	P.3.3.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Ad Cíl 1: Zavést a ověřit využití mikroimunoanalýzy (MIA) pro stanovení množství mitochondriálních komplexů I a IV systému oxidační fosforylace v buňkách bukalního stěru u pacientů s Huntingtonovou nemocí.

Hlavní myšlenkou studie bylo jednoduché, rychlé a reprodukovatelné testování biologického materiálu od pacientů s HN s co nejmenším dopadem na jejich životní komfort při odběru. Právě výběr vhodné tkáně je pro studium primárních i sekundárních mitochondriálních chorob včetně HN naprosto nezbytné. Neméně důležitá je však také co nejmenší zátěž pacienta ať už z hlediska počtu odběrů nebo invazivity zákroku.

Pro studium mitochondriálních charakteristik jsou preferovány energeticky náročné tkáně jako svalová, jaterní nebo srdeční, avšak jejich biopsie je velmi zatěžující a někdy není vůbec proveditelná. Vhodným materiálem, který byl pro sledování HN navržen, se zdály být např. rychle proliferující epiteliální buňky bukalní sliznice s významnou mitochondriální aktivitou. Jejich odběr je jednoduchý, pacienta nezatěžuje a je možné ho získat opakovaně. Navíc se jedná o tkáň ektodermálního původu stejně jako u HN nejpostiženější nervová tkáň (Patten and Carlson, 1996).

Snadné opakování odběru a následné MIA analýzy bylo navíc dobrým předpokladem pro potenciální monitorování mitochondriálních změn v progresi onemocnění.

1.1. U pacientů s Huntingtonovou nemocí bylo v buňkách bukalního epitelu pomocí mikroimunoanalýzy detekováno snížené množství komplexů I a IV systému oxidační fosforylace

Příloha P.1.1.:

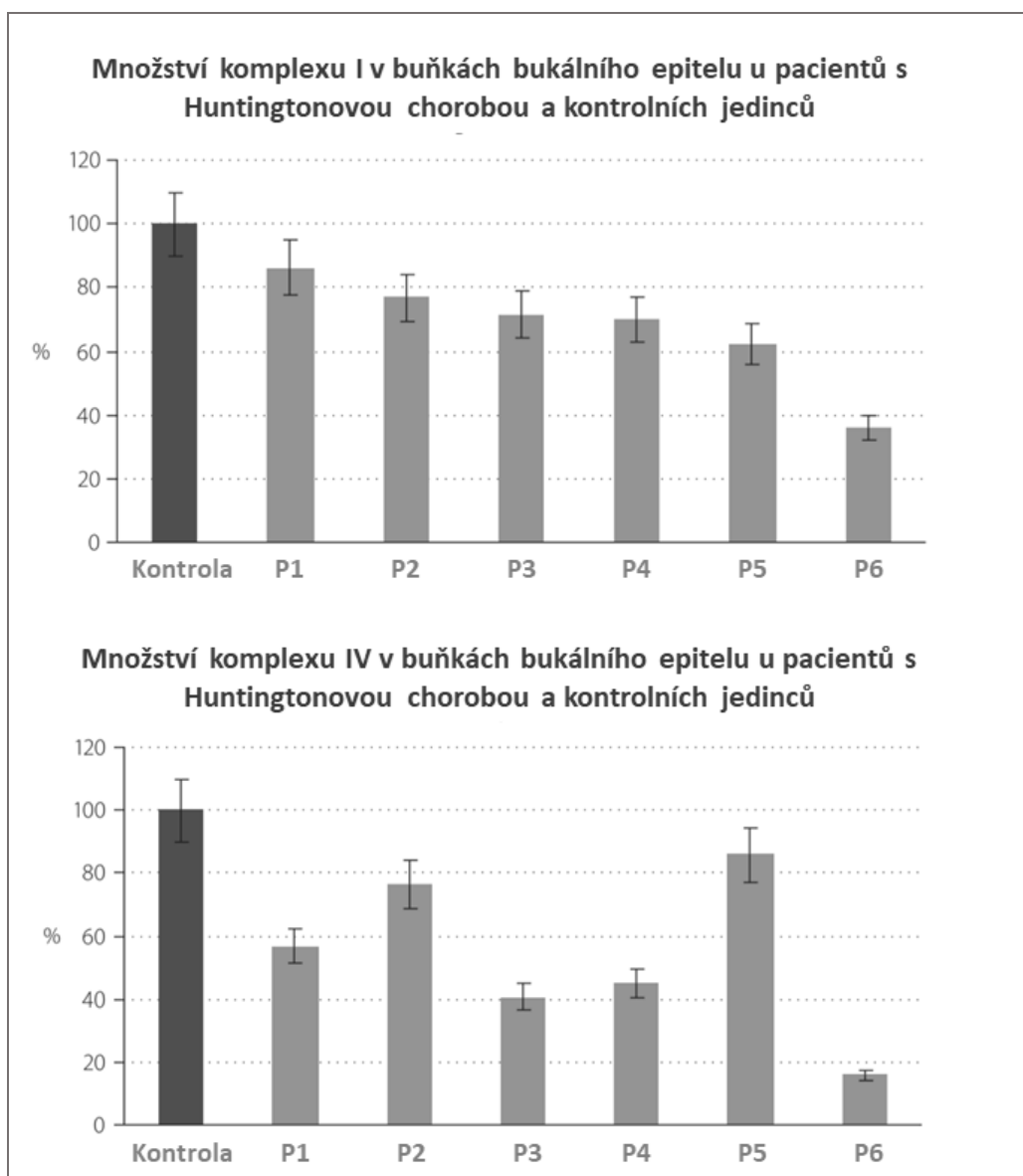
Rodinova M., Trefilova E., Liskova I., Klempir J., Ellederova Z., Vidinska D., Motlik J., Zeman J., Hansikova H. Buccal Epithelial Cells as Potential Non-invasive Materials for the Monitoring of Mitochondrial Disturbances to Track Huntington's Disease Progression – a Pilot Study. *Cesk Slov Neurol N*;78/111 (Supl 2):2S49-2S54, 2015

V letech 2012-2014 byla v epiteliálních buňkách ústní sliznice od dětských pacientů s poruchou komplexu IV zavedena metoda neinvazivní analýzy MIA pro kvantifikaci množství KI a KIV systému OXPHOS (Rodinová et al., 2014). Následně byla metoda optimalizována pro dospělé pacienty s HN a kontrolní osoby podobného věku. Kontrolní materiál byl získán od osob z řad dobrovolníků a geneticky nepříbuzných rodinných příslušníků.

Paralelně při optimalizaci MIA pro KI a KIV u dospělých pacientů s HN (3 M, 3 Ž) a kontrol (2 Ž) bylo rovněž testováno její možné využití pro transgenní prasečí model (3 TgHN a 3 WT). Jedinci byli ve věku 36 měsíců.

Zatímco u pacientů s HN byla pozorována snížená hladina obou sledovaných komplexů (KI, KIV) ve srovnání s kontrolními vzorky (obr. 8), u transgenního modelu pro HN nebyl pozorován jednotný trend ve srovnání s kontrolou. Důležitým zjištěním však bylo, že intenzita signálu získaná ze vzorkové směsi od prasečího modelu byla dostatečně silná pro interpretaci výsledků a pro případné využití při testování zvířat v pozdějším věku, kdy je možné očekávat výraznější fenotyp spojený s HN a tedy i jednotnější výsledky v rámci testovaných skupin modelových zvířat.

Výsledky množství komplexů KI a KIV u pacientů s HN potvrdily, že metoda je použitelná pro testování vzorků bukové sliznice u dospělých pacientů s HN a že může být provedena u většího souboru osob, kde by bylo možné výsledky statisticky vyhodnotit (Kompletní výsledky viz příloha P.1.1.).



Obr. 8.: Proteinové množství mitochondriálních komplexů I a IV systému oxidační fosforylace v epiteliálních buňkách bukalní sliznice u pacientů s HN a kontrol.

Výsledky jsou vyjádřeny jako průměrná hodnota intenzity signálu ze dvou měření pomocí kitů Complex I / Complex IV Human Protein Quantity Dipstick Assays (ab109722, ab109877, Abcam Mitosciences, Cambridge, UK). Jako 100% je vyjádřena průměrná hodnota intenzity signálu ze dvou kontrolních vzorků. Kvantifikace byla provedena pomocí programu Quantity One 1-D Analysis Software (Bio-Rad Laboratories). Upraveno podle (Rodinova et al., 2015).

Autorčin podíl na studii: Odběr materiálu u kontrol, optimalizace metody u vzorků od pacientů, kontrol i modelových zvířat, provedení a vyhodnocení analýzy celého souboru vybraných vzorků, sepsání publikace.

1.2. Pacienti s Huntingtonovou nemocí s podporou výživy z důvodu kachexie mají v buňkách bukalní sliznice pravděpodobně vyšší množství komplexu I systému OXPHOS než pacienti s Huntingtonovou nemocí bez výživové podpory.

Příloha P.1.2.:

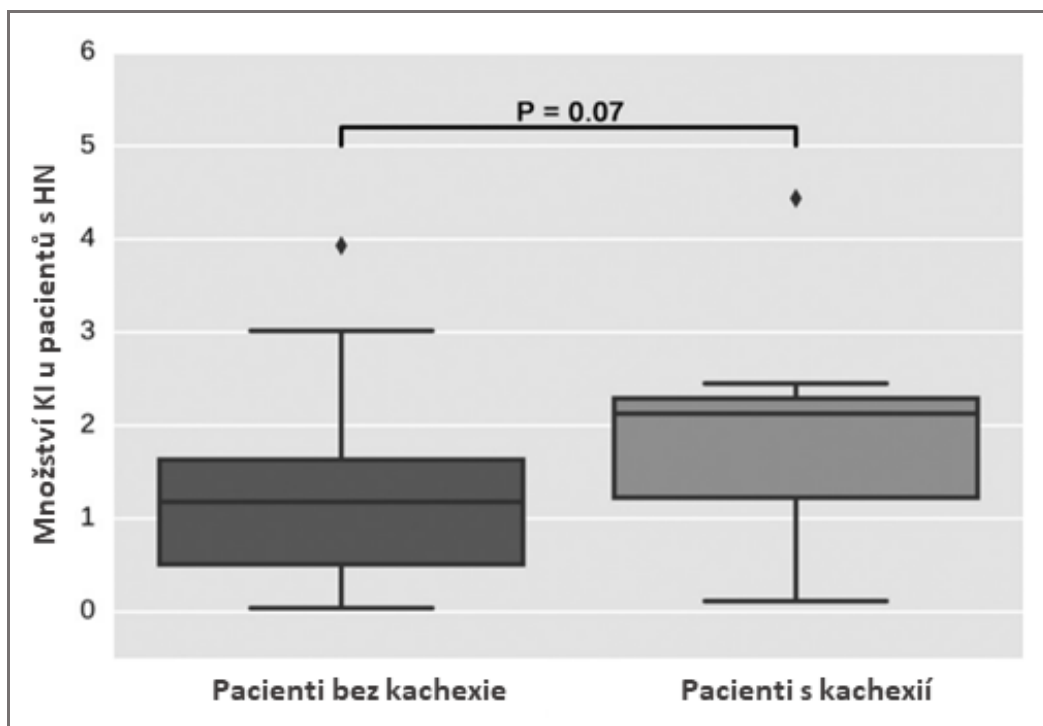
Dušek P, **Rodinová M**, Lišková I, Klempíř J, Zeman J, Roth J, Hansíková H. Buccal Respiratory Chain Complexes I and IV Quantities in Huntington's Disease Patients. *Folia Biol (Praha)*. 2018;64(1):31-34

Pro ověření vhodnosti a praktického využití metody MIA v bukalním stěru u pacientů s HN byla provedena studie, která zahrnovala soubor vzorků 34 symptomatických pacientů (19 M, 15 Ž) a 22 kontrol (11 M, 11 Ž) odpovídajícího věku.

Výsledné hodnoty KI a KIV systému OXPHOS u pacientů byly korelovány s jejich věkem, pohlavím a bylo zohledněno, zda jejich stav vyžadoval výživovou podporu (13 pacientů s HN), kvůli významnému úbytku tělesné hmotnosti (tzv. kachexie) či nikoli (11 pacientů s HN).

Bylo prokázáno, že hodnoty množství KI a KIV se mezi pacienty s HN a kontrolními subjekty významně neliší. Detailnější analýza skupiny pacientů ukázala, že pacienti s kachexií (n=13) mají mírně zvýšené množství KI (Obr. 9) ve srovnání se skupinou pacientů bez kachexie (n=11) na hladině významnosti $p=0,07$ (Mann-Whitney U-Test). Podobný trend v podobě zvýšené aktivity KI byl dříve popsán v krevních destičkách u pacientek s anorexií ve srovnání s kontrolami stejného věku (Böhm et al., 2007). Oba výsledky podporují domněnku, že nutriční status pacienta hraje významnou roli v expresi komplexů systému OXPHOS. V bukalním stěru u pacientů a kontrol nebyla nalezena významná korelace obsahu KI s věkem ani pohlavím.

I přesto, že získaná data neměla dostatečně silnou výpovědní hodnotu pro individuální testování množství KI systému OXPHOS u pacientů s Huntingtonovou nemocí, otevřela možnosti neinvazivní doplňkové analýzy KI a KIV u HN v dobře dostupné externí tkáni ektodermálního původu na větším souboru pacientů (Výsledky studie viz příloha P.1.2.).



Obr. 9.: Porovnání množství komplexu I systému OXPHOS v epitelálních buňkách bukové sliznice pacientů s HN v závislosti na kachexii.

Měření bylo provedeno pomocí kitu Complex I Human Protein Quantity Dipstick Assay (ab109722, Abcam MitoSciences). Počet pacientů s kachexií $n=13$, počet pacientů bez kachexie $n=11$. Veškeré měření bylo prováděno v dubletu. Statistická analýza byla provedena pomocí Mann-Whitney U-testu. (Dušek et al., 2018).

Autorčin podíl práce na studii: Odběr materiálu u kontrolních osob, zaučení metodymikroimunoanalýzy a kvantifikace v programu Quantity One, kontrola a provedení části testů u vzorků (od pacientů s HN i kontrol). Spolupráce při přípravě publikace.

Ad Cíl 2): Analyzovat mitochondriální parametry ve vybraných periferních tkáních symptomatických pacientů s Huntingtonovou nemocí.

2.1. Uspořádání mitochondriální sítě a ultrastruktura mitochondrií jsou v kultivovaných kožních fibroblastech u pacientů s Huntingtonovou nemocí významně postiženy

Příloha P.2.1.:

Vanisova M, Stufkova H, Kohoutova M, Rakosnikova T, Krizova J, Klempir J, Rysankova I, Roth J, Zeman J, Hansikova H. Mitochondrial organization and structure are compromised in fibroblasts from patients with Huntington's disease. *Ultrastruct Pathol.* 2022 Sep 3;46(5):462-475. doi: 10.1080/01913123.2022.2100951. Epub 2022 Aug 10. PMID: 35946926.

Ke sledování mitochondriální patologie, především u primárních mitochondriálních onemocnění, jsou s úspěchem využívány kultivované kožní fibroblasty pro svou dobrou dostupnost a relativně vysokou aktivitu mitochondriálního aparátu.

Potvrzení exprese huntingtinu ve fibroblastech (Sharp et al., 1995) a zjištění, že patologie HN se neomezuje jen na nervovou soustavu (Marques Sousa and Humbert, 2013) (Squitieri et al., 2010) byly dobrými výchozími atributy pro studium mitochondriální patologie ve fibroblastech pacientů s HN jako zástupce periferní tkáně, tentokrát mezodermálního původu.

Pro co nejobsáhlejší popis mitochondriálních změn u fibroblastů od pacientů s HN byly sledovány jak strukturní (uspořádání mitochondriální sítě, ultrastruktura mitochondrií a zastoupení vybraných mitochondriálních proteinů), tak funkční mitochondriální parametry (měření respirace, enzymatické aktivity vybraných komplexů systému OXPHOS a Krebsova cyklu nebo stanovení kapacity energetického metabolismu mitochondrií).

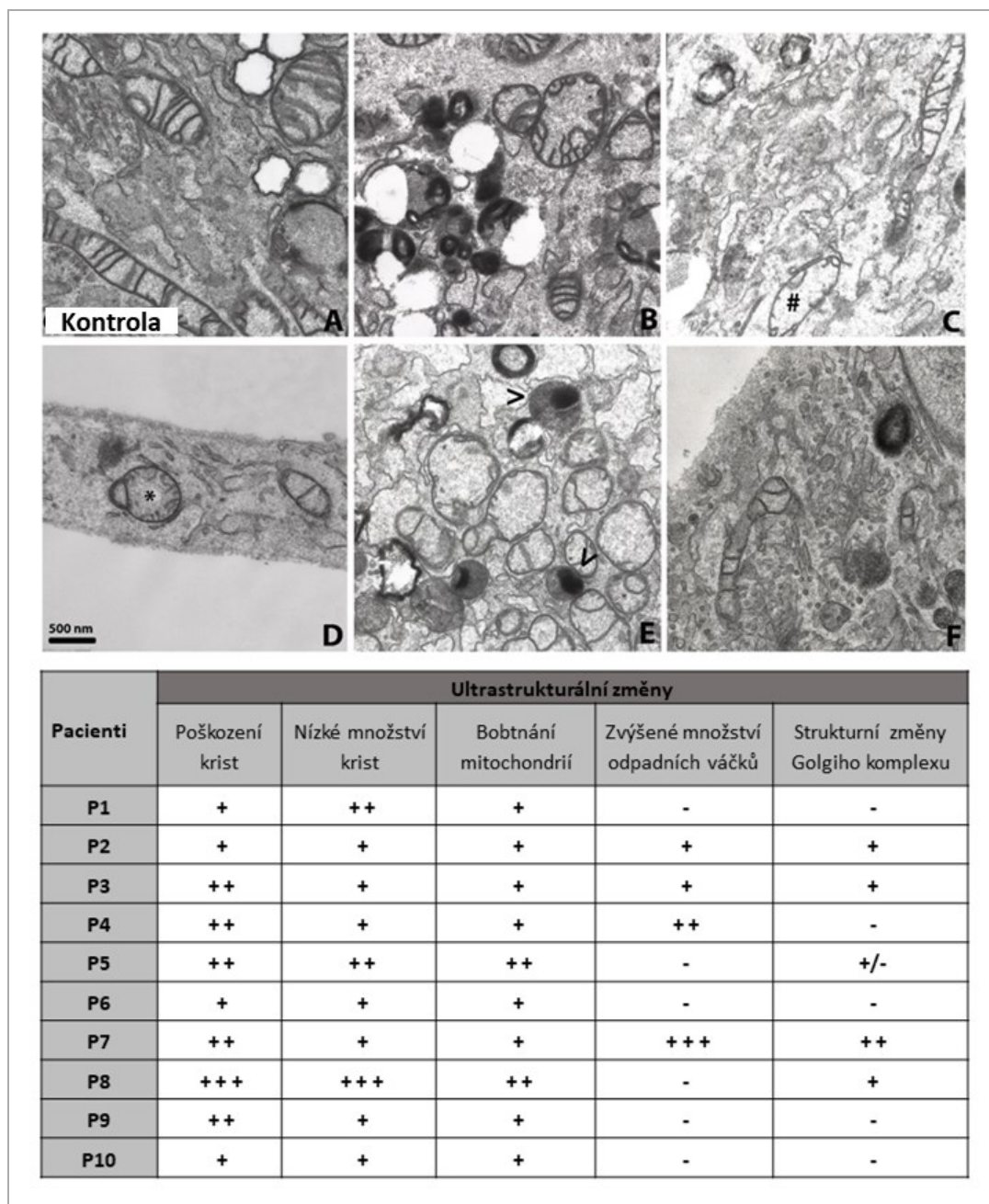
Soubor vzorků čítal 10 primárních linií kožních fibroblastů heterozygotních symptomatických pacientů (8 M, 2 Ž). Počet CAG repetice na mutované alele se pohyboval v rozmezí 42-62. V kontrolní skupině byly linie od 15 zdravých dobrovolníků (9 M, 6 Ž).

Změny mitochondriální struktury a/nebo mitochondriálních funkcí byly dobře detekovatelné ve fibroblastech všech sledovaných pacientů nezávisle na délce trvání nemoci (kožní biopsie byla prováděna v rozmezí 1 až 14 let od nástupu onemocnění - od prvního pozorovaného příznaku).

Kvalitu a správnou funkci mitochondrií odráží kromě funkčních parametrů (např. respirace) i vzhled mitochondriální sítě společně s jejich ultrastrukturou. Proto byla provedena i komplexní mikroskopická charakterizace.

Na strukturní úrovni byly pozorovány signifikantní změny uspořádání mitochondriální sítě – u pacientů s HN byla nižší mitochondriální denzita, tedy množství mitochondrií v buňce a snížený tzv. „Branching factor“ (faktor větvení mitochondriální sítě). Pomocí TEM bylo ve fibroblastech pacientů detekováno pět patologických parametrů (Obr. 10), poškození nebo snížené množství krist (Obr. 10B, C), časté mitochondriální bobtnání (z Angl. „mitochondrial swelling“) (Obr. 10 D), výskyt vyššího množství buněčného odpadního materiálu ve formě lysosomů (Obr. 10 E). V liniích pacientů s HN byla navíc pozorována změna architektury Golgiho komplexu, kde byly typické cisterny často rozpadlé do většího množství váčků, označovaných jako „Golgi bodies“ (Obr. 10 F), již dříve pozorované v souvislosti s neurodegenerativními chorobami (Ranftler et al., 2017).

Proteinová analýza panelu 13 vybraných podjednotek komplexů systému OXPHOS, pyruvát dehydrogenázového komplexu (PDHc) a proteinů Opa1, mitofilinu a Drp1, které ovlivňují mitochondriální dynamiku, potvrdila pokles množství podjednotky NDUF9 KI (snížení na 78-26% kontrolních hodnot) a podjednotky PDH E1- α pyruvátdehydrogenázového komplexu (snížení na 34-72% kontrolních hodnot), které bylo detekováno v 8/10 případech. Podobná byla situace u proteinu Opa1, jehož množství se pohybovalo v rozmezí 66,5 - 79,5% kontrolních hodnot v 8 případech. Zatímco protein Opa1 zodpovědný za mitochondriální fúzi byl u pacientů převážně snížen, množství Drp1, který způsobuje disipaci mitochondriální sítě, bylo u 5 pacientů naopak vyšší ve srovnání s kontrolou (až na 182% u P4). Zdá se, že zvýšené množství cytosolického proteinu Drp1 u pacientů s HN je zřejmě v souladu se změnami uspořádání mitochondriální sítě pozorované u patientských linií při mikroskopické analýze. Snímky nativně značené mitochondriální sítě byly analyzovány v programu Fiji a bylo potvrzeno, že u pacientů s HN je signifikantně nižší denzita mitochondrií/buňku ($p = 0,0012$) (MD, Mitochondrial density) a mitochondriální síť je méně větvená (BF, Branching factor) v porovnání s kontrolami (Vanisova et al., 2022).



Obr. 10.: Elektronmikroskopická ultrastrukturální analýza fibroblastů od pacientů s Huntingtonovou nemocí.

Horní část snímku: reprezentativní ukázka patologických změn mitochondrií a normální stav u kontrolní linie: A) Fyziologická struktura mitochondrie ve fibroblastech zdravé kontroly, B) poškozené mitochondriální kristy: # (P7), C) Snížené množství krist u mitochondrií (P3), D) mitochondriální bobtnání: * (P8), E) Odpadní materiál v lysosomech: > (P2), F) strukturní abnormality v Golgiho komplexu (P2); Spodní tabulka: Sloupce reprezentují míru zastoupení nejčastějších patologických změn pozorovaných u pacientů s HN. Počet křížků (+) udává míru poškození, (-) označuje, že sledovaný fenotyp nebyl v daném vzorku pozorován. Data byla získána z analýzy přibližně 100 buněk na jedné síťce. Originální zvětšení: 15 000x (A-E), (F) 25 000x. Snímáno pomocí transmisního elektronového mikroskopu JEOL JEM 1200, Upravevo podle (Vanisova et al., 2022).

Měření spotřeby kyslíku u 6 pacientů s HN v digitoninem permeabilizovaných fibroblastech odhalila ve třech případech mírně sníženou respiraci po přidavku substrátů pro KI (glutamát + malát), pro KII (sukcinát) a KIV.

Kapacita mitochondriálního metabolismu prokázala u 7 pacientů s HN nižší oxidaci substrátů v inkubační směsi, která odpovídala zhoršenému fungování KII systému OXPHOS. Spektrofotometricky měřená enzymatická aktivita KII normalizovaná na aktivitu CS byla u pacientů ve srovnání s kontrolou rovněž snižena a hodnoty aktivity KII významně korelovaly s pohlavím. Překvapením však byl poznatek, že ačkoli bylo na proteinové úrovni u pacientů detekováno významně snížené množství podjednotky PDH E1- α pyruvátdehydrogenázového komplexu, tento pokles se neprojevil na úrovni enzymatické aktivity PDH komplexu. Je možné, že je množství PDH komplexu ve fibroblastech za normálních podmínek natolik naddimenzováno (vysoká hodnota thresholdu), že i námi pozorované významné snížení hladiny PDH komplexu u pacientů s HN se nemusí projevit na jeho aktivitě.

Výsledky předložené studie mitochondriálního poškození v kultivovaných kožních fibroblastech od pacientů s HN společně s recentně publikovanými daty (Squitieri et al., 2010) (Gardiner et al., 2018) dokazují, že kožní fibroblasty jsou vhodným biologickým materiálem využitelným při studiu neurodegenerativní Huntingtonovy nemoci. Je možné v nich sledovat mitochondriální patologické procesy spojené s HN na úrovni periferní tkáně. Jejich studiem můžeme přispět k nalezení vhodného biomarkeru onemocnění nebo usnadnit proces charakteristiky stádia rozvoje HN v biologickém materiálu dostupnějším, než je například svalová biopsie.

Autorčin podíl práce na studii: Kultivace linií fibroblastů, vitální barvení mitochondriální sítě, příprava vzorků a ultrastrukturální analýza pomocí TEM, vyhodnocování mitochondriálních sítí, spolupráce při proteomické analýze (SDS, imunocytochemická detekce vybraných proteinů). Zpracování výsledků a příprava publikace.

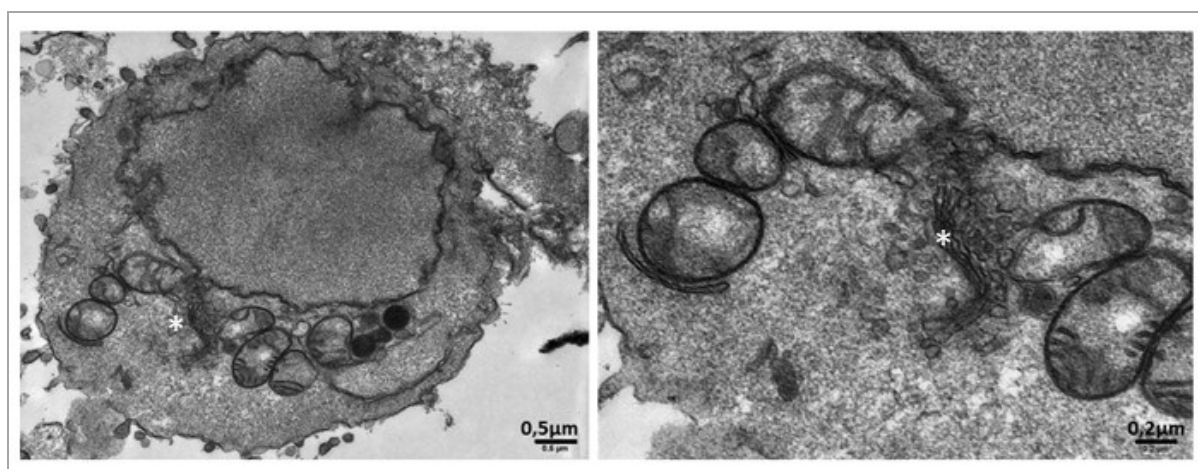
2.2. V lymfocytech izolovaných z periferní krve od pacientů s Huntingtonovou nemocí byla nalezena snížená exprese genů zodpovědných za aerobní metabolismus a snížená integrita jaderné DNA.

Příloha P.2.2.:

Askeland G, Dosoudilova Z, **Rodinova M**, Klempir J, Liskova I, Kuśnierczyk A, Bjørås M, Nesse G, Klungland A, Hansikova H, Eide L. Increased nuclear DNA damage precedes mitochondrial dysfunction in peripheral blood mononuclear cells from Huntington's disease patients. *Sci Rep.* 2018 Jun 29;8(1):9817. doi: 10.1038/s41598-018-27985-y

Lymfocyty izolované z periferní krve jsou dalším příkladem dobře dostupného materiálu s potenciálem pro studium mitochondriálních změn u pacientů s HN.

Jedná se o mononukleární bílé krvinky (Obr. 11), které produkují široké spektrum cytokinů a protilátek a jedná se tedy o buňky energeticky náročné, se značnou mitochondriální aktivitou a bohatým proteosyntetickým aparátem (Abbas, Lichtman, 2004).



Obr. 11: Ilustrační elektronmikroskopický snímek kontrolního lymfocytu.

Vlevo: Snímek celé buňky s výrazným jádrem, Golgiho komplexem () a mitochondriemi v cytoplasmě (originální zvětšení: 20 000x), Vpravo: Detail mitochondrií a Golgiho komplexu lymfocytu, (originální zvětšení: 50 000x). Snímáno transmisním elektronovým mikroskopem JEOL JEM 1400 plus, (Vanišová archiv, 2020)*

Kromě analýzy funkčních a proteinových mitochondriálních parametrů byl v lymfocytech testován také vliv HN na mitochondriální DNA (mtDNA) a nukleární DNA (nDNA), jejich integritu a opravné mechanismy. Převážná část molekulárně genetických analýz probíhala na

pracovišti partnerské laboratoře na univerzitě v Oslo (*Department of Medical Biochemistry, Institute of Clinical Medicine, University of Oslo, Oslo, Department of Microbiology, Oslo University Hospital, Oslo*).

V testovaném souboru bylo celkem 36 pacientů (19 M, 17 Ž) s manifestovanou HN ve věku 22 až 74 let a 49 kontrolních osob (25 M, 24 Ž) ve věkovém rozmezí 21 až 76 let. Délka CAG repetice na mutované alele u pacientů se pohybovala mezi 40-58 opakováními, všichni byli heterozygoti (Tab. 1).

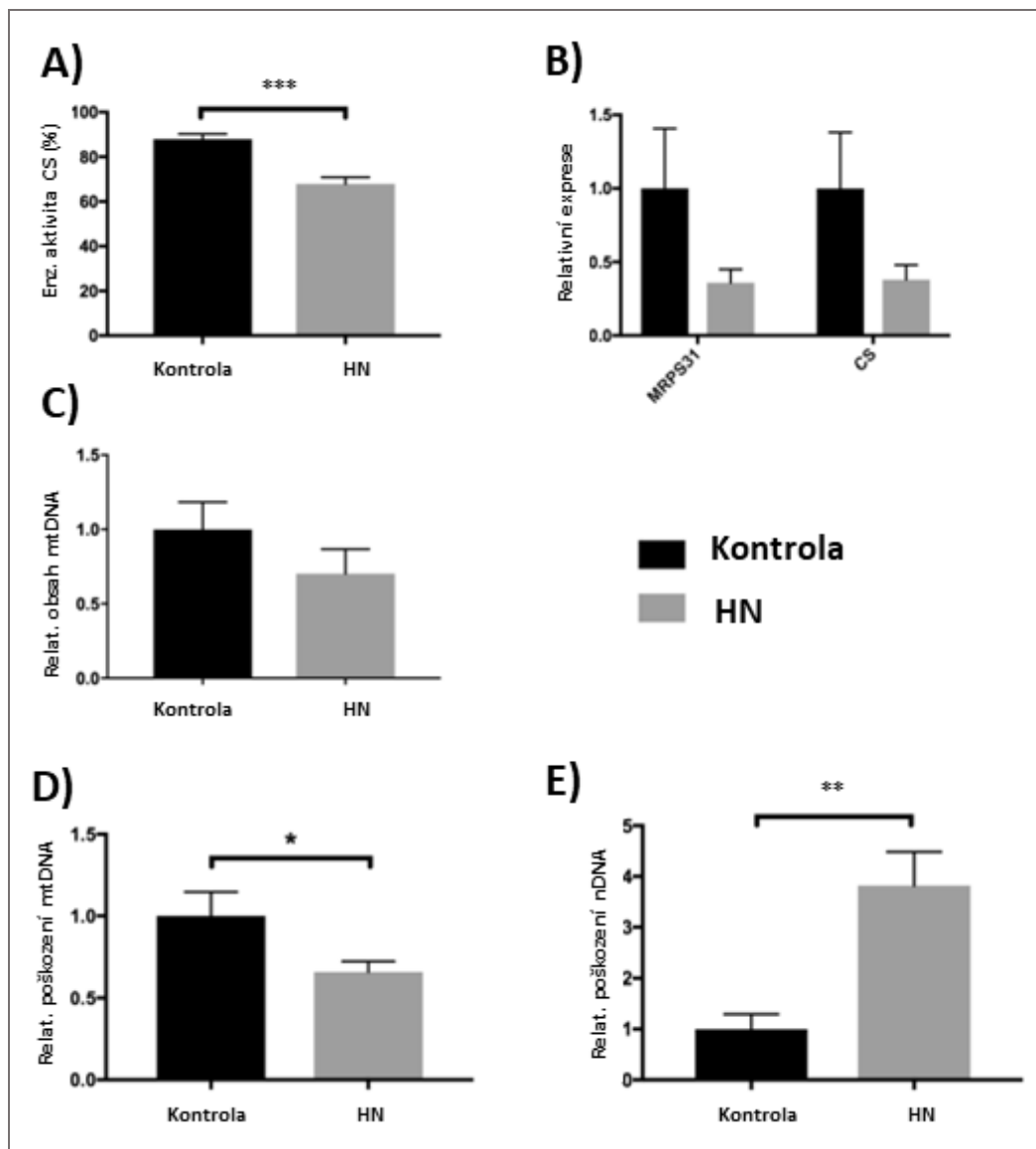
Mitochondriální metabolismus lymfocytů byl analyzován z pohledu měření hladiny exprese mitochondriálně a jaderně kódovaných genů zodpovědných za mitochondriální procesy společně s funkční charakterizací aktivit komplexů OXPHOS.

Bylo detekováno významné snížení množství i enzymatické aktivity u CS (Obr. 12A, B), která je často prvním markerem změn obsahu mitochondrií v buňce, popisované u primárních mitochondriálních onemocnění (Larsen et al., 2012). Detekovaný pokles aktivity CS však nijak nekoreloval se závažností klinických projevů HN. Relativní exprese *SDHB* genu pro podjednotku sukcinát dehydrogenázového komplexu (KII) byla u vzorků od pacientů s HN také snižena, avšak tato redukce neměla vliv na aktivitu enzymu. Další sledované mitochondriální proteiny byly beze změn u obou skupin. Nebyly detekovány rozdíly exprese genů pro podjednotky KI (*MT-ND2*, *MT-ND6*) a genu pro malou mitochondriální ribosomální podjednotku (*MT-RNR1*) kódované v mtDNA

Podobné bylo i měření aktivit komplexů KI, KII a KIV v lymfocytech u pacientů s HN, kde se aktivita u pacientů nelišila od kontrolních hodnot.

Analýza vybraných genů kódovaných v jádře (nDNA) prokázala signifikantně sníženou expresi genů *CYCS* (gen pro cytochrom *c*) a *DRP1* (gen pro protein drp1) u pacientů s HN ($P < 0.05$) a hraniční snížení exprese *UCP2* (genu pro odpráhovací protein 2, z Angl. „Uncoupling protein 2“), jehož proteinový produkt zkratuje mitochondriální membránový potenciál a tím reguluje syntézu ATP.

Dále byl prokázán celkový pokles úrovně opravných mechanismů nDNA a to na základě detekce nižší exprese skupiny genů reparačního mechanismu „base excision repair“ a signifikantně snížené exprese genu pro protein p53, aktivujícího mimo jiné právě opravu DNA.



Obr. 12: Biomarkery indikující redukci mitochondriální aktivity a integrity mitochondriální DNA v lymfocytech od pacientů s Huntingtonovou chorobou.

A) Enzymatická aktivita citrátsyntázy u lymfocytů pacientů s HN (n=17) a kontrolních osob (n=32) *** $P < 0.001$, měřeno spektrofotometricky. B) Expresce ribosomální podjednotky MRPS31 a citrátsyntázy v lymfocytech u pacientů s HN (n=17) a u kontrolních osob (n=5), elektroforetická analýza, WB, imunodetekce. C) Relativní množství kopií mtDNA (z Angl. Mitochondrial copy number) v lymfocytech od pacientů s HN a kontrol, stanoveno pomocí RT-qPCR. D) Integrity mtDNA v lymfocytech u pacientů s HN (n=21) a kontrol (n=16), E) Integrity nDNA v lymfocytech u pacientů s HN (n=21) a kontrol (n=16), parametry D, E měřeny pomocí qPCR metody s využitím kitu DNAdamage assay, upraveno podle: (Askeland et al., 2018a).

Vedle exprese genů zodpovědných za mitochondriální metabolismus byla studována rovněž celková integrita jaderného i mitochondriálního genomu pomocí detekce vybraných inhibičních modifikací restrikčního enzymu TaqαI metodou qPCR. Výsledky prokázaly, že integrita mtDNA u pacientů s HN koreluje s poklesem mitochondriálních funkcí. Tedy při snížené funkci mitochondrií je přibližně o třetinu nižší i hladina poškození mtDNA u pacientů s HN ve srovnání se zdravými kontrolami. Naopak úroveň poškození nDNA je v lymfocytech pacientů s HN až čtyřnásobně vyšší než u kontrolních vzorků. Ve snaze zjistit, zda je mezi poškozením nDNA a mtDNA nějaká souvislost byly testovány různé parametry a zdá se, že události vedoucí k poškození jaderné a mitochondriální DNA jsou na sobě nezávislé. V rámci kontrolní skupiny se také zdá, že k poškození nDNA zřejmě dochází častěji než u mtDNA. U vzorků pocházejících od pacientů ale nebyla mezi oběma genomy (mtDNA a nDNA) nalezena žádná korelace.

Důležitými poznatky předložené studie jsou zjištění, že úroveň poškození nDNA u pacientů s HN koreluje s délkou onemocnění a především, že míra poškození nDNA koreluje se skóre škály TFC¹ (inverzní korelace, $R = 0,045$, $P < 0,05$). Tato skutečnost by mohla být příslibem, že lymfocyty jsou vhodným a dobře dostupným materiálem využitelným pro popis systémových změn v rámci HN, které by bylo možné dobře klasifikovat aniž bychom cílili přímo do oblasti postiženého mozku. (Kompletní výsledky viz příloha P.2.2.).

V současné době probíhá sběr biologického materiálu pro ověření našeho předpokladu na rozsáhlejší soubor pacientů s HN.

Autorčín podíl práce na studii: Sběr a příprava biologického materiálu, proteinová analýza vybraných komplexů OXPHOS a CS, spolupráce při měření enzymatické aktivity CS, sepsování publikace.

¹ „TFC“: z Angl. Total functional capacity. Jedná se o celosvětově unifikovanou škálu, která slouží pro zhodnocení klinického obrazu pacienta s Huntingtonovou chorobou. U osoby posuzuje počet CAG repetice pacientů, jejich motorické a kognitivní funkce, abnormality chování a celkově funkční kapacitu organismu pacienta.

Ad Cíl 3): Charakterizovat mitochondriální ultrastrukturu a funkce v tkáních transgenního modelu miniprasete pro Huntingtonovu nemoc v pre-symptomatickém a časně symptomatickém období.

Mitochondriální patogenezi související s Huntingtonovou nemocí je nejlepší sledovat přímo ve vzorcích získaných od pacientů, nicméně podobně jako u jiných neurodegenerativních chorob může být z etického i klinického hlediska v mnoha případech žádoucí využití vhodného zvířecího transgenního modelu. U modelového organismu na rozdíl od pacientů je možné například sledovat jedince již v pre-symptomatickém období, plánovat experimenty v přesných časových úsecích, případně vybrat širší repertoár tkání pro sledování konkrétních mitochondriálních změn na relativně velkém souboru jedinců.

Spolupráce s Ústavem živočišné fyziologie a genetiky v Liběchově umožnila pro studium mitochondriální patologie u HN využít velmi kvalitní model transgenního miniprasete, které se řadí do skupiny tzv. velkých savčích modelů 1. generace (Baxa et al., 2013). Hlavními výhodami tohoto modelu jsou nejen podobná velikost a stavba těla, včetně uspořádání mozku, ale i dlouhý životní cyklus spolu s pomalým nástupem onemocnění a možnost testování kognitivních a behaviorálních schopností.

Časná spolupráce umožnila s předstihem optimalizovat metody studia mitochondriálních parametrů přímo pro potřeby transgenního prasete i lépe plánovat směr výzkumu.

3.1. Biochemické a funkční změny mitochondrií předcházejí změnám jejich ultrastruktury a jsou detekovatelné již před nástupem pohybového postižení a poškození svalové tkáně u transgenního modelu miniprasete

Příloha P.3.1.:

Rodinova M, Krizova J, Stufkova H, Bohuslavova B, Askeland G, Dosoudilova Z, Juhas S, Juhasova J, Ellederova Z, Zeman J, Eide L, Motlik J, Hansikova H. Deterioration of mitochondrial bioenergetics and ultrastructure impairment in skeletal muscle of a transgenic minipig model in the early stages of Huntington's disease. *Dis Model Mech.* 2019 Jul 5. pii: dmm.038737. doi: 10.1242/dmm.038737

Nejnápadnějším a často prvně pozorovaným příznakem u pacientů s Huntingtonovou nemocí jsou mimovolní choreatické pohyby, podle nichž byla nemoc kdysi popsána. V průběhu

onemocnění dále dochází ke ztrátě svalové hmoty a zhoršení pohybové kondice pacientů (Mantovani et al., 2016) (van der Burg et al., 2009). Proto je svalová tkáň u HN intenzivně studována na mnoha úrovních. Mitochondriální změny ve svalu jsou významněji zkoumány od devadesátých let, kdy byl u pacienta s HN poprvé popsán defekt KI systému OXPHOS v této tkáni (Arenas et al., 1998).

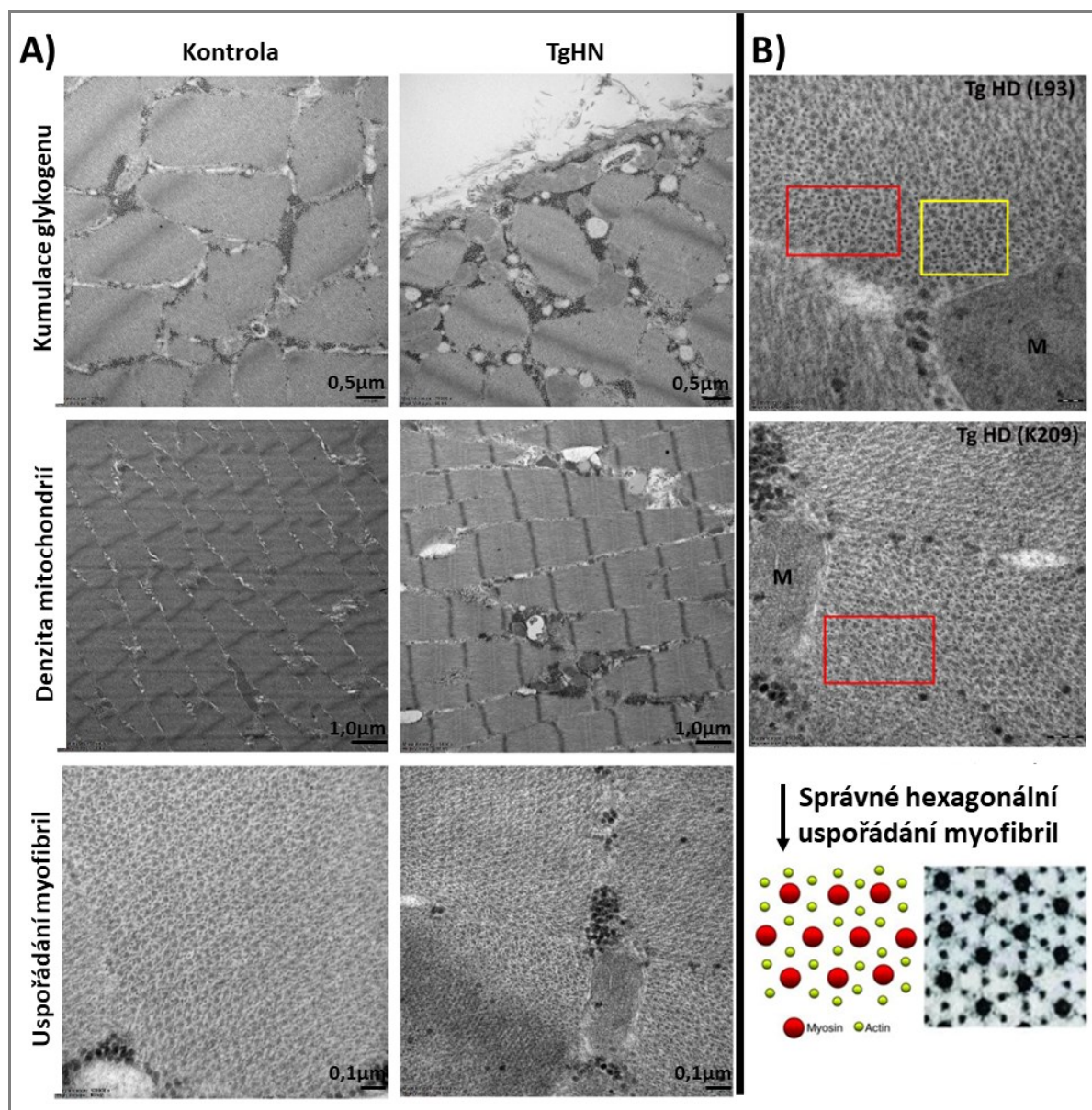
Pro objasnění změn mitochondriálního metabolismu a struktury v období před začátkem onemocnění a krátce po rozvoji příznaků, byla provedena studie v kosterním svalu transgenního modelu miniprasete pro HN. Zvířata byla sledována od věku 24 měsíců, kdy ještě nevykazovala žádné vnější příznaky HN, až do stáří 66 měsíců. Analýzy byly provedeny na biopsicky získaném *quadriceps femoris* od jedinců z F1 a F2 generace v intervalech 24, 36, 48 a 66 měsíců. Celkový počet sledovaných zvířat byl 51, z toho bylo 27 transgenních (TgHN: 13 ♀, 14 ♂) a 24 kontrol (9 ♀, 15 ♂). V každém experimentu bylo vždy minimálně 6 TgHN a 6 kontrolních miniprasat. Jako věkově i geneticky odpovídající kontrolní jedinci sloužili zdraví sourozenci.

Cílem studie bylo sledování změn mitochondriálních parametrů před nástupem onemocnění HN a během postupného rozvoje klinických příznaků v naději, že jednak lépe porozumíme rozvoji nemoci a také, že se v kosterním svalu podaří popsat vhodný parametr mapující progresi nemoci. Za tímto účelem byla provedena komplexní funkční analýza mitochondriálního metabolismu, strukturní analýza vybraných mitochondriálních proteinů a vše bylo doplněno o rozsáhlou ultrastrukturální studii, provedenou pomocí transmisní elektronové mikroskopie.

V souvislosti se ztrátou svalové hmoty a celkové hmotnosti pozorované u pacientů s HN byla vždy v den biopsie zaznamenána hmotnost TgHN i kontrolních prasat. V námi sledovaném období 24-66 měsíců nebyl pozorován rozdíl hmotnosti mezi TgHN a kontrolní skupinou. Váhový úbytek u TgHN zvířat ve srovnání s kontrolní skupinou byl zaznamenán až později, ve věku 72 měsíců (Vidinská et al., 2018).

V naší studii bylo zjištěno, že významnější rozdíly mitochondriálního metabolismu na biochemické úrovni mezi kontrolní a TgHN skupinou je možné detekovat od 36 měsíců věku ještě před nástupem viditelných klinických příznaků, jako jsou poruchy lokomoce nebo kognitivní změny, které byly popsány až u jedinců ve věku 48 měsíců (viz kapitola 3.3.). Následně byly u TgHN skupiny ve věku 48 měsíců dále pozorovány významné změny na úrovni ultrastruktury kosterního svalu (Obr. 13). U TgHN jedinců docházelo k hromadění

glykogenu, mitochondrie měly vyšší denzitu (Obr. 13A) a uspořádání myofibril na příčném řezu neodpovídalo obvyklému hexagonálnímu uspořádání. Architektura myofibril byla rozvolněná, místy se sklonem k zmnožení aktinových filament (Obr. 13 B).



Obr. 13.: Ultrastruktura kosterního svalu miniprasat transgenních pro N-terminální část lidského mutovaného huntingtinu a kontrol ve věku 48 měsíců zobrazená pomocí TEM.

A) Kumulace glykogenu, změny mitochondriální denzity a uspořádání myofibril u TgHN jedinců v porovnání s kontrolou. B) Reprezentativní detail porušeného hexagonálního uspořádání myofibril pozorovaného lokálně u TgHN prasat. Žlutý box: zvýšený počet aktinových vláken, červený box: rozvolněná architektura myofibril, M – mitochondrie, K209, L93 – náhodně vybraní reprezentativní zástupci testovaného souboru. Snímáno Jeol JEM 1400 plus. Originální zvětšení: A) 1. řádek: 25 000x, 2. řádek: 15 000x, 3. řádek: 150 000x, B) 120 000x. upraveno podle: (Rodinova et al., 2019).

Analýza dat spektrofotometrických měření aktivit komplexů dýchacího řetězce a CS ukázala 4 signifikantně rozdílné parametry, kterými se lišila TgHN a kontrolní skupina, a to nezávisle na pohlaví nebo věku. U TgHN skupiny byla snižená aktivita cytochrom *c* oxidázy (COX), CS, aktivita KII+III dýchacího řetězce a poměr KII k aktivitě CS. Snižovanou funkci COX potvrdila také vysoce citlivá respirometrie.

Pokles funkcí mitochondriálních enzymů byl korelován s analýzou vybraných proteinů provedením nativní i SDS elektroforézy. Nativní elektroforéza prokázala celkově snížené množství plně uspořádaných komplexů systému OXPHOS u TgHN skupiny v porovnání s kontrolou a statistické zhodnocení panelu 17 vybraných mitochondriálních proteinů separovaných pomocí SDS elektroforézy ukázala významně snížené množství podjednotky SDH30 KII ($P=0.0132$) a snížené množství podjednotky OSCP KV u TgHN jedinců ($P=0.0357$). Podobně bylo sníženo i množství podjednotky PDHE2 PDH komplexu ($P=0.0460$).

Proteinová analýza také prokázala u TgHN skupiny změny exprese proteinů mitochondriální dynamiky (Opa1 a Drp1). Podobně jako ve fibroblastech pacientů s HN byla i u TgHN prasat exprese Opa1 snižená a exprese Drp1 zvýšená ve srovnání s kontrolami. Tento trend se navíc s postupným rozvojem nemoci zvyšoval.

Rozsáhlá pětiletá studie mitochondriálních parametrů v kosterním svalu TgHN modelu miniprasete prokázala postupný pomalý rozvoj onemocnění podobně jako je tomu u pacientů s HN, u nichž však není možné z etických důvodů provádět analýzy v pre-klinickém období. Naše výsledky prokázaly, že biochemické změny mitochondriálních parametrů předcházejí rozvoji viditelných klinických příznaků podobně, jako změny ultrastruktury mitochondrií. Tyto změny v kosterním svalu úzce souvisejí s postupným rozvojem klinických příznaků (např. zhoršení pohybu TgHN jedince) a jsou zřejmě vhodným ukazatelem časného rozvoje HN u TgHN jedinců. Jedním z důležitých znaků rozvoje mitochondriální patologie jsou pozorované změny množství podjednotky SDH30 KII spolu se snížením enzymatické aktivity KII/CS. Detekované poškození KII je významné hlavně proto, že se jedná o enzym, který je součástí Krebsova cyklu i dýchacího řetězce a jeho poškození tedy ovlivňuje hned dvě ústřední dráhy energetického metabolismu mitochondrií. Snižovaná funkce Krebsova cyklu a systému OXPHOS vede k poklesu syntézy ATP, zvyšování oxidačního stresu a to dále spouští kaskádu změn prohlubující mitochondriální a na to navazující tkáňovou patologii. Změny uspořádání myofibril, odchylky exprese proteinů opa1 a drp1 v průběhu rozvoje nemoci a

rozdílný metabolismus glykogenu v kosterním svalu u TgHN jedinců jen podporují následné funkční změny vedoucí k zhoršení lokomoce, významného symptomu HN.

Autorčin podíl na studii: Kompletní TEM analýza, spolupráce na proteinové analýze vybraných mitochondriálních proteinů, spolupráce při přípravě publikace.

3.2. Mitochondriální metabolismus ve spermiích transgenního prasečího modelu pro Huntingtonovu nemoc je narušen již v pre-symptomatickém období

Příloha P.3.2.:

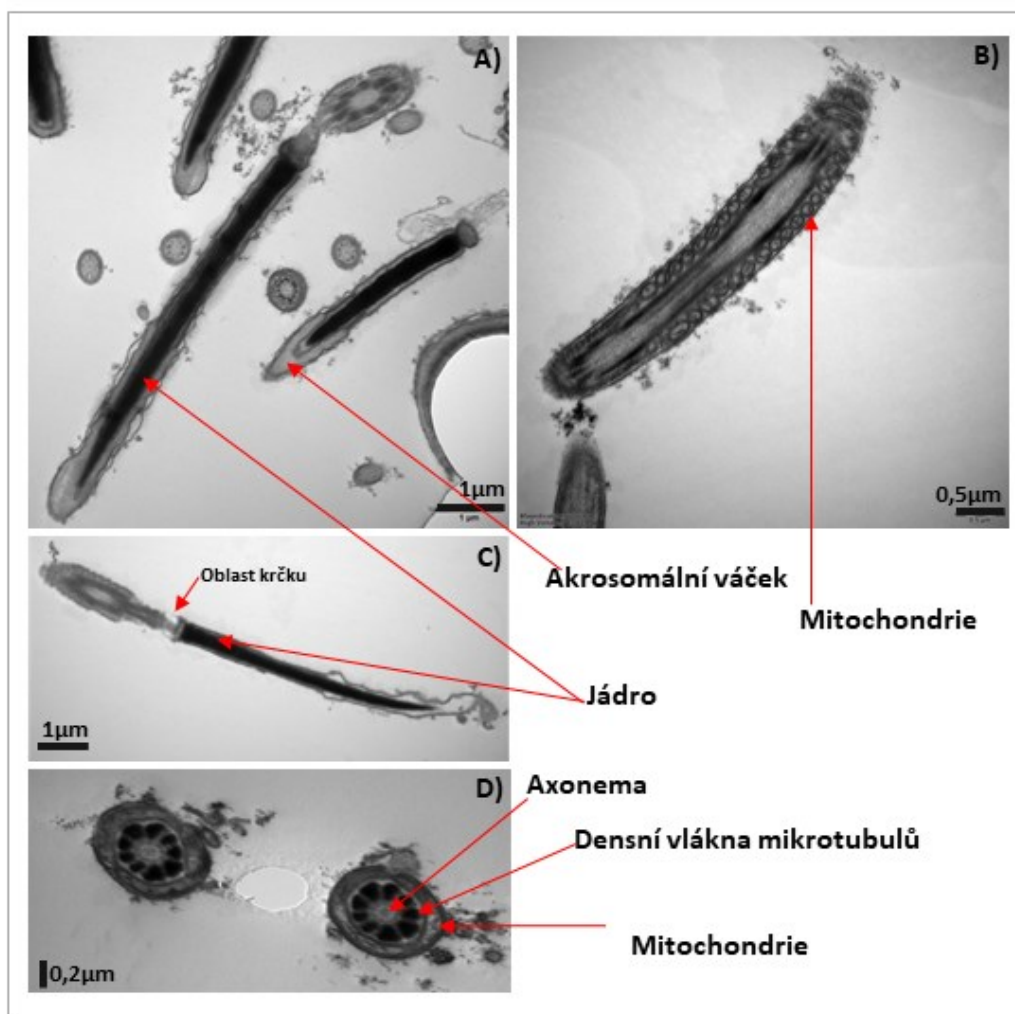
Krizova J, Stufkova H, **Rodinova M**, Macakova M, Bohuslavova B, Vidinska D, Klima J, Ellederova Z, Pavlok A, Howland DS, Zeman J, Motlik J, Hansikova H. Mitochondrial Metabolism in a Large-Animal Model of Huntington Disease: The Hunt for Biomarkers in the Spermatozoa of Presymptomatic Minipigs. *Neurodegener Dis.* 2017;17(4-5):213-226. doi: 10.1159/000475467. Epub 2017 Jun 21

Jedním z prvních fenotypových projevů u Liběchovských TgHN miniprasat již ve věku 13 měsíců byl u samců nižší počet spermií (Baxa et al., 2013). Spolu s poklesem jejich počtu byla u spermií TgHN samců detekována snížená schopnost spermií penetrovat *zónu pellucidu* a tedy oplodnit vajíčko. Popsaná zhoršená fertilita nebyla ovlivněna hormonálně ani poklesem libida TgHN samců a pozorovaný fenotyp zůstal na stejné úrovni až do věku 26 měsíců (Baxa et al., 2013).

Ve spermiích TgHN skupiny strukturní analýza odhalila přítomnost mHtt na rozdíl od kontrolních vzorků. Bylo nutné ověřit, zda může být právě přítomnost mHtt příčinou zhoršené aktivity spermií TgHN samců (Obr. 14). Kromě strukturních změn by dalším možným důvodem pro zhoršenou funkci spermií mohlo být poškození mitochondrií, jejichž metabolismus energeticky zajišťuje právě průchod spermií přes *zónu pellucidu*.

Kromě objasnění, zda je zhoršená kvalita spermií TgHN samců způsobena mitochondriální patologií, či pouze změnami ve struktuře buněk jsme hledali případný marker pro klasifikaci progresu HN, protože spermie patří podobně jako neurony k buňkám s nejvyšší hladinou exprese Htt (Guo et al., 2003). Jedná se o velmi dobře dostupný biologický materiál, který je možné odebírat neinvazivně a tedy opakovaně. Zřejmou nevýhodou však je, že by potenciální marker bylo možné využít jen u pacientů mužského pohlaví.

Pro komplexní charakterizaci mitochondriálních funkcí spermií byla využita kombinace měření kapacity mitochondriálního energetického metabolismu pomocí radioaktivních substrátů (MEGS), polarografické měření respirace, spektrofotometrické měření aktivity CS a histochemické značení aktivity komplexů OXPHOS v nativním polyakrylamidovém gelu. Metabolická měření byla doplněna i o proteinovou analýzu vybraných podjednotek komplexů systému OXPHOS pomocí SDS elektroforézy spojené s western blotem a imunodetekcí specifickými protilátkami.

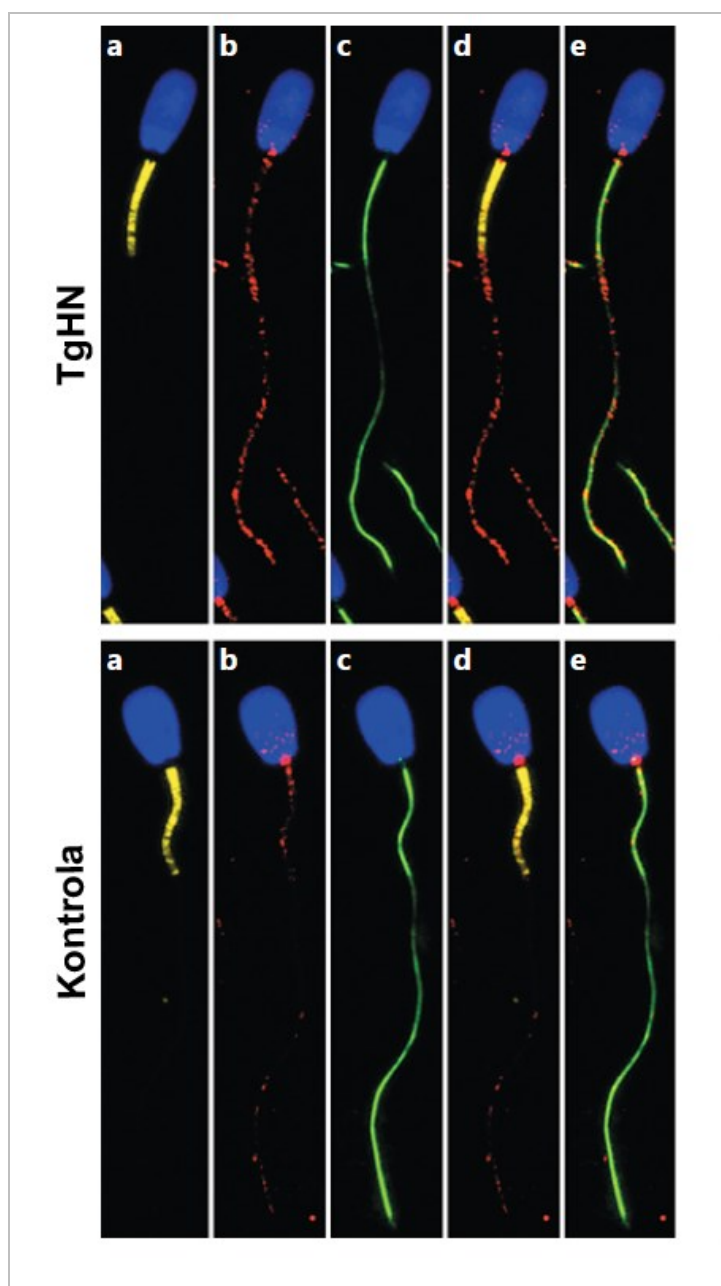


Obr. 14.: Ultrastruktura hlavičky a střední části bičíku spermie prasete.

A) Hlavička spermie (podélný řez) s vysoce densním jádrem a dobře patrným akrosomálním váčkem. Zvětšení: 15 000x B) Podélný řez střední částí bičíku. Při vnějších okrajích jsou viditelné mitochondrie obíhající mikrotubulární vlákna. Ve vnitřní části jsou částečně patrné mikrotubuly (tmavé podlouhlé částice) Zvětšení: 40 000x C) Hlavička spermie, krček a neúplná střední část bičíku. Zvětšení 15 000x D) Příčný řez střední částí bičíku s mitochondriemi, mikrotubuly a axonemou. Zvětšení: 40 000x. (Vanišová 2022, archiv)

Do studie bylo zahrnuto celkem 24 samců F1 a F2 generace (12 TgHN a 12 kontrol) ve věku 12-65 měsíců. U sledovaných jedinců byl až osmkrát během 3 let zopakován neinvazivní odběr spermií. Analýzy probíhaly ve schématu provnávání parametrů dvanácti dvojic, vždy TgHN jedinec a stejně starý WT sourozenec. Ačkoli byl sledovaný soubor zvířat relativně malý v porovnání např. s testováním myších transgenních modelů pro HN, uspořádání do párů: WT vs. TgHN jedinec stejného věku a identického genetického pozadí, umožnilo u získaných výsledků provést párovou statistickou analýzu, u níž byly zohledněny tři možné interferující faktory: Huntingtonova nemoc, generace a věk.

Pomocí imunohistochemického značení byl podél celého bičíku spermie lokalizován polyQ signál včetně střední oblasti bohaté na mitochondrie. Výsledek histochemického značení spolu s dříve provedenou proteinovou analýzou (Macakova et al., 2016) byl v souladu s předpokladem, že mitochondrie ve spermiích mohou přímo interagovat s mHtt díky vzájemné blízké lokalizaci (Obr. 15).



Obr. 15.: Histochemické značení mitochondrií a proteinů obsahujících PolyQ sekvenci (včetně mutovaného huntingtinu) ve spermiích TgHN a kontrolních samců prasete.

A) Mitochondrie ve střední části bičíku (žlutá) značené protilátkou anti-MTCO1. B) Proteiny obsahující polyglutaminovou sekvenci (červená) značené pomocí protilátky 3B5H10. Signál je dobře patrný u TgHN vzorků, u kontroly se intenzita blíží k hranici detekce pozadí. C) Značení mikrotubulů (zeleně) pomocí protilátky proti acetylovanému tubulinu (AcTub). D) Spojený obraz mitochondrií (anti-MTCO1) a polyQ proteinů (3B5H10). E) Spojený obraz mikrotubulů (AcTub) a polyQ proteinů (3B5H10). n TgHN=2, n kontrol=2, samostatný polyQ signál byl značen u šesti kontrolních a 6 TgHN jedinců. Zvětšení: 1200x. (Krizova et al., 2017).

V homogenátu spermií byla měřena kapacita mitochondriálního metabolismu v deseti různých inkubacích, které obsahují jak substráty, tak inhibitory jednotlivých mitochondriálních komplexů. Celkovým výsledkem je ucelený obraz fungování mitochondriálního metabolismu. Snížená respirace u TgHN samců (měřená polarograficky) funkční testování mitochondrií doplnilo.

Celkem bylo sledováno 36 parametrů, z nichž 4 parametry vykazovaly signifikantní snížení u TgHN skupiny, v porovnání s kontrolními vzorky. Jednalo se o sníženou KI dependentní respiraci u TgHN mitochondrií a dále o tři reakce z palety inkubací MEGS (obr. 16), (detaily viz příloha P.3.2). Tyto čtyři parametry by v budoucnu mohly posloužit jako biomarkery mitochondriálního poškození pro popis HN v neinvazivně dostupném materiálu, kterým spermie bezesporu jsou.

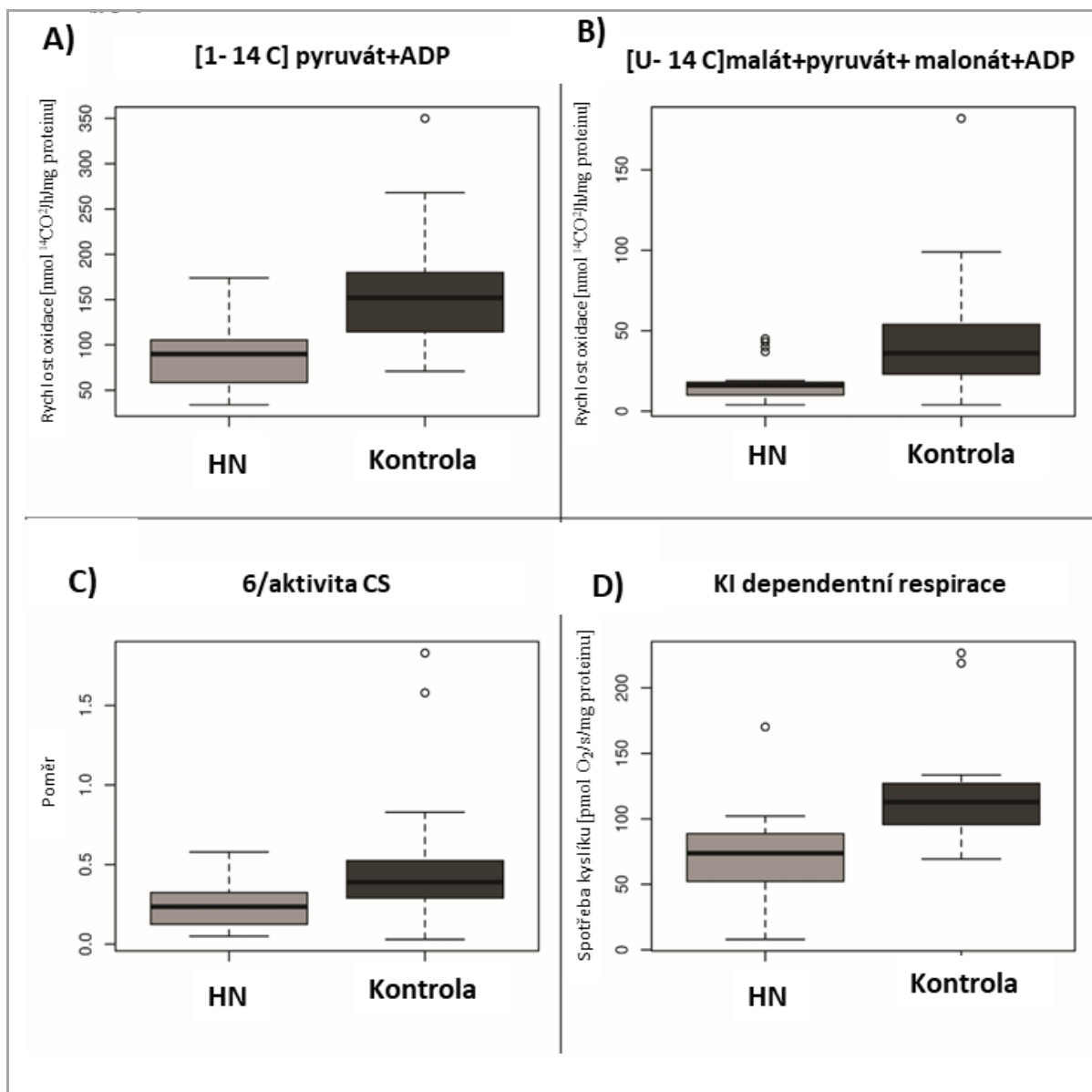
Získané výsledky potvrdily domněnku, že za sníženou schopností penetrovat vajíčko (překonat *zónu pellucidu*) stojí u TgHN spermií ultrastrukturální změny společně se poklesem mitochondriálního energetického metabolismu.

Spermie a neurony jsou si překvapivě podobné v mnoha fyziologických aspektech (Meizel, 2004). Kromě vysokých energetických nároků, sdílejí například řadu membránových receptorů a ačkoli spermie nemají synaptické mechanismy, jsou podobně jako neurony schopné excitability (Meizel and Son, 2005). Většina neuronálních receptorů vyskytujících se u spermií také přímo ovlivňuje jejich funkci. Např. akrosomální exocytóza je zprostředkována dopaminovými receptory, motilita je řízena purinergními, olfaktorickými případně kanabinoidními receptory (Lawlor et al., 2022).

Míra exprese Htt je ve spermiích i v *testes* srovnatelná s expresí Htt v mozku (Guo et al., 2003). Bylo prokázáno, že Htt hraje nezastupitelnou roli ve spermiogenezi a fertilitě jedince. Například transgenní myš exprimující pouze mHtt je sterilní, vykazuje testikulární atrofii, aspermii a masivní apoptózu testikulárních buněk (Leavitt et al., 2001). Výše popsáný jev potvrdil i vývoj myšního kondicionálního KO, kdy byl Htt odstraněn v zárodečné linii a jedinci byli infertilní, docházelo u nich k předčasnému zastavení spermiogeneze a byly detekovány signifikantní změny proteinového profilu v *testes* (Yan et al., 2016).

Spermie transgenního prasečího modelu pro Huntingtonovu nemoc mají v pre-symptomatickém období snížený mitochondriální metabolismus, který je zřejmě způsoben změnou funkce mutovaného huntingtinu a může být jednou z příčin zhoršené fertility TgHN kanců. Dříve byly ve spermiích námi používaného modelu pro HN detekovány fragmenty

mHtt a jejich přítomnost je pro správnou funkci spermií TgHN skupiny dalším zatěžujícím faktorem (Macakova et al., 2016).



Obr. 16.: Signifikantně ($p < 0,05$) snížené vybrané funkční parametry mitochondriálního energetického metabolismu, u TgHN samců se srovnání s kontrolní skupinou.

A, B, C - parametry kapacity mitochondriálního energetického metabolismu, D - parametr mitochondriální respirace. A) Oxidace substrátů s obsahem pyruvátu a ADP, B) oxidace substrátů s obsahem malátu, malonátu, pyruvátu a ADP, C) oxidace substrátů, inkubace 6 ([U1-4C] malát + pyruvát + malonát + ADP) normalizované na aktivitu citrátsyntázy (CS), A,B,C $n(\text{TgHN})=24$, $n(\text{kontrola})=27$, měřeno v 10 inkubacích s ¹⁴C značenými substráty metodou dle Janssen (Janssen et al., 2006) D) Spotřeba kyslíku po přidavku substrátu pro komplex I dýchacího řetězce. $n(\text{TgHN})=12$, $n(\text{kontrola})=16$, Měřeno pomocí oxygrafu OROBOROS (Krizova et al., 2017).

Hlavním přínosem studie mitochondriálního metabolismu ve spermiích u TgHN kanců byla optimalizace metody MEGS (včetně vhodného zpracování vzorků spermií miniprasečího modelu) a stanovení pěti signifikantních parametrů, díky nimž je možné sledovat progresi HN v neinvazivně získaném materiálu, který má významnou expresi Htt a navíc fyziologickou podobnost s neuronálními buňkami (např. vysoká energetická náročnost, dopaminové, purinergní nebo kanabinoidní receptory na cytoplasmatické membráně) (Meizel, 2004). Výsledky z modelových vzorků dávají slibnou perspektivu pro využití metody při testování u pacientů.

Autorčín podíl na studii: Spolupráce na proteinové analýze mitochondriálních podjednotek (Westernblot a imunodetekce), histochemické značení, spolupráce při přípravě publikace

3.3. Behaviorální a motorické změny u transgenních prasat ve věku 48 měsíců kopírují projevy Huntingtonovy nemoci u člověka

příloha P.3.3.:

Askeland G, **Rodinova M**, Štufková H, Dosoudilova Z, Baxa M, Smatlikova P, Bohuslavova B, Klempir J, Nguyen TD, Kuśnierczyk A, Bjørås M, Klungland A, Hansikova H, Ellederova Z, Eide L. A transgenic minipig model of Huntington's disease shows early signs of behavioral and molecular pathologies. *Dis Model Mech.* 2018 Oct 24;11(10). pii: dmm035949. doi: 10.1242/dmm.035949

Úspěšný vývoj stabilního transgenního prasečího modelu (Baxa et al., 2013) odstartoval dlouhodobou charakterizaci průběhu pre-klinického období, klinického počátku onemocnění u TgHN zvířat a korelace poznatků s vývojem HN u pacientů.

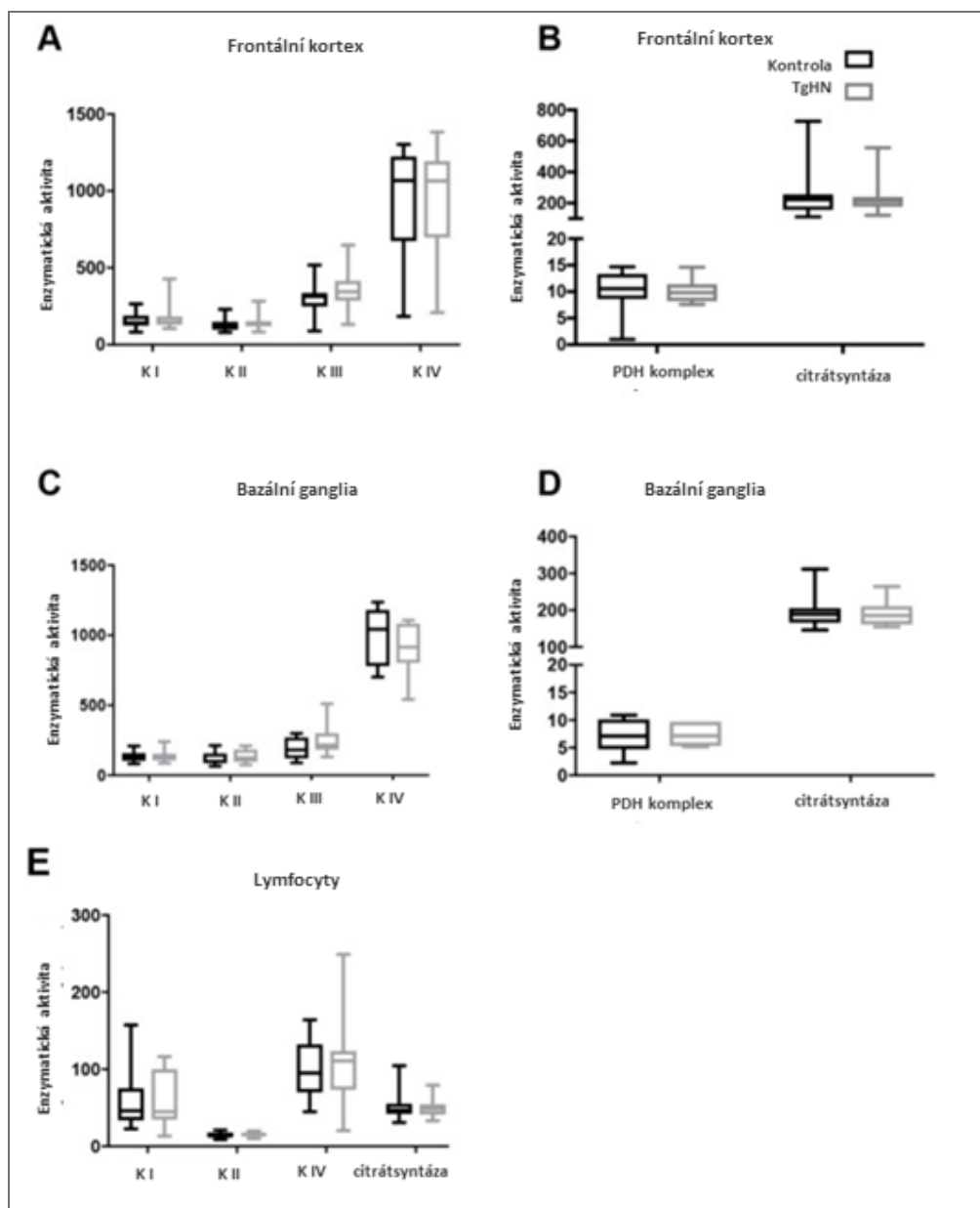
Díky dlouhodobým zkušenostem chovu prasat v Liběchově byl s předstihem připraven panel testů vhodných pro monitorování motorických a behaviorálních schopností u TgHN a kontrolních zvířat. Zařazeny byly například průchod tunelem, překonání překážky, překlápěcí houpačka nebo hledání pamlsku. V raném období vývoje jedinců byly rovněž vytipovány a optimalizovány metody pro testování vhodných biochemických a molekulárně genetických analýz včetně detekce mitochondriálních parametrů.

Představená studie obsahovala biochemickou a molekulárně genetickou část, která sledovala vybrané enzymy mitochondriálního metabolismu, počet kopií mtDNA, úroveň poškození nDNA a mtDNA nebo reparační parametry nukleových kyselin, podobně jako u analýzy lymfocytů od pacientů s HN (kapitola 2.2.). Další část studie se zabývala klinickými projevy HN u TgHN miniprasat a celkově bylo snahou porovnat výsledky humánní studie a studie transgenních zvířat. Výhodou animální studie byla možnost kromě lymfocytů testovat i vzorky frontální kůry nebo bazálních ganglií.

Do studie byli zahrnuti jedinci ve věku 24, 36 a 48 měsíců. Obě mladší věkové kategorie (24 a 36 měsíců) vykazovaly normální klinický obraz bez zjevných motorických obtíží.

Charakterizace mitochondriálního energetického metabolismu zahrnovala měření enzymatických aktivit komplexů systému OXPHOS, PDH komplexu a CS v mozku i lymfocytech TgHN a kontrolních vzorků. Konkrétně byly měřeny aktivity KI, KII, KIII a KIV, dále PDH komplexu a citrát syntázy v mozku a aktivity KI, KII, KIV a CS

v lymfocytech prasečího modelu. Analýza neprokázala významné rozdíly mezi TgHN a kontrolní skupinou ani v mozku ani v lymfocytech (Obr. 17).



Obr. 17.: Enzymatická aktivita mitochondriálních komplexů systému OXPHOS, pyruvátdehydrogenázy a citrátsyntázy ve frontálním kortexu, bazálních gangliích a lymfocytech TgHN miniprasat a kontrolních jedinců ve 48 měsících věku.

A) Enzymatická aktivita mitochondriálních komplexů I-IV OXPHOS ve frontálním kortexu u TgHN a kontrol. **B)** enzymatická aktivita pyruvátdehydrogenázového komplexu (PDH) a citrátsyntázy (CS) ve frontálním kortexu u TgHN a kontrol. **A, B:** KI: kontrola n=19, TgHN n=20; KII, KIII a KIV: kontrola n=19, TgHN n=21; PDH: kontrola n=16, TgHN n=17; CS: kontrola n=19, TgHN n=21; měřeno spektrofotometricky; **C)** Enzymatická aktivita mitochondriálních komplexů I-IV OXPHOS v bazálních gangliích u TgHN a kontrol; **D)** enzymatická aktivita PDH komplexu a CS v bazálních gangliích u TgHN a kontrol **C, D:** KI-IV: kontrola n=10, TgHN n=9; PDH: kontrola n=9; TgHN n=7; CS: kontrola n=10, TgHN n=9; měřeno spektrofotometricky **E)** Enzymatická aktivita komplexů I, II,

IV a CS v lymfocytech TgHN miniprasat a kontrol. TgHN a kontrolní vzorky nevykazují rozdíly. KI, KII and KIV a CS: kontrola n=18, TgHN n=19. Měřeno spektrofotometricky (Askeland et al., 2018b).

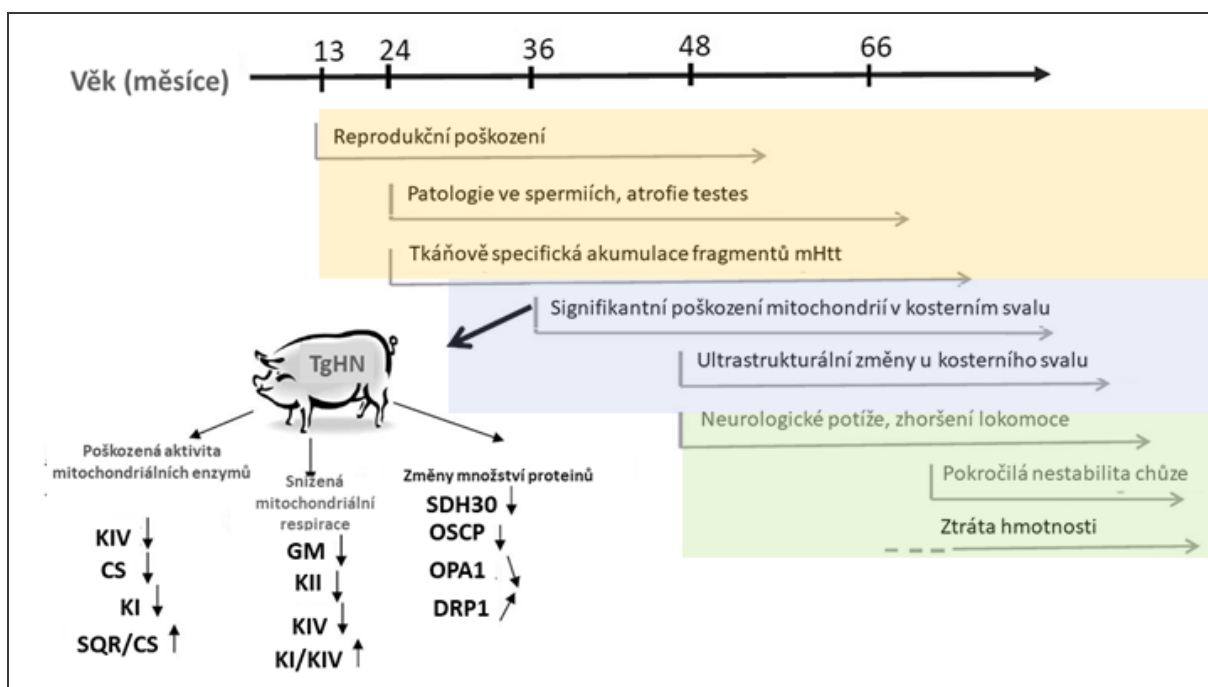
Molekulárně genetické analýzy byly provedené ve spolupráci s kolegy z Institutu klinické medicíny Univerzity v Oslo. Analýzy byly provedeny v lymfocytech, frontální kůře a bazálních gangliích miniprasat a vzhledem k malému množství materiálu od jednotlivých zvířat, byly provedeny vždy v tzv. smíšeném vzorku (z Angl. „pooled sample“). Testován byl tedy např. vzorek frontální kůry všech TgHN jedinců ve věku 24 měsíců vs. vzorek všech kontrolních jedinců ve věku 24 měsíců a podobně i v dalších věkových skupinách. Sledována byla úroveň poškození mitochondriální a jaderné DNA, počet kopií mtDNA (z Angl. „mtDNA copy number“), mutační rychlost mtDNA a reparační kapacita nDNA, tak aby bylo možné porovnat data se studií u člověka (kapitola 2.2.).

Počet kopií mtDNA byl ve frontálním kortexu snížen u TgHN vzorků ($p=0.004$). Naopak u bazálních ganglií u TgHN byl „mtDNA copy number“ zvýšený, což může být vysvětleno jako možný následek zhoršené mitofagie u bazálních ganglií (viz P.3.3, obr. 2). Kromě vyššího množství mtDNA byla u TgHN vzorků bazálních gangliích dále zaznamenána nižší četnost mutací mtDNA u TgHN skupiny. Předpokládali jsme, že za nižším množstvím mutací u mtDNA může být celkový pokles mitochondriálních funkcí a s tím spojený nižší oxidativní stres, ale testování markerů oxidativního stresu tuto domněnku nepotvrdilo. V lymfocytech modelových prasat nebyla u TgHN jedinců nalezena žádná změna v mitochondriálním počtu kopií mtDNA ve srovnání s kontrolou, což možná souvisí i s tím, že v lymfocytech měřených v tomto období rozvoje nemoci nebyly detekovány agregáty mHtt.

U pacientů s HN bylo v lymfocytech detekováno významně zvýšené poškození nDNA a proto byly u modelových zvířat sledovány sledovány 2 metylační značky nukleotidových bazí, které případné poškození nDNA signalizují. První je 5-methylcytosine a zajišťuje správnou genovou regulaci, druhou značkou je 5-hydroxymethylcytosin, která se mění v průběhu diferenciaci, během ontogeneze a při změnách aerobní aktivity. Ve frontální kůře byla míra 5-methylcytosinu mírně navýšena ($p = 0,047$), avšak ostatní sledované tkáně (bazální ganglia a lymfocyty) změny nevykazovaly. Úroveň 5-hydroxymethylcytosinu nebyla v žádné ze sledovaných vzorků změněna. V tomto parametru se tedy výsledky transgenního modelu a člověka lišily, nicméně, může to souviset teprve se rozvíjejícím onemocněním v případě TgHN jedinců na rozdíl od plně rozvinuté HN u sledovaných pacientů.

Vnější projevy HN u TgHN jedinců byly poprvé pozorovány v nejstarší sledované kategorii (48 měsíců), kdy TgHN jedinci zvládali významně hůře test průchodu tunelem než kontrolní zvířata a celkově byl u TgHN skupiny pozorován trend (nikoli signifikantní) k mírnému zhoršení motoriky, zvláště lokomoce. U 48 měsíců starých TgHN jedinců bylo možné pozorovat změny srovnatelné se klinickými projevy u pacientů s HN (Obr. 18).

Pozorované patologické změny byly navíc podpořeny nálezem agregovaného mHtt v mozku u 48 měsíců starých TgHN zvířat, který nebyl detekován u mladších věkových skupin. Agregáty mHtt nebyly nalezeny ani v lymfocytech 48 měsíců starých TgHN prasat, což je v souladu s mírnými nálezy biochemických analýz u TgHN skupiny.



Obr. 18.: Časové schéma nástupu fenotypových projevů spojených s Huntingtonovou nemocí v průběhu vývoje nemoci u TgHN prasat.

Schéma popisuje vnější fenotyp a změny vybraných mitochondriálních parametrů pozorovaných ve vybraných tkáních časně symptomatických TgHN jedinců s barevným odlišením odkazujícím na konkrétní kapitoly výsledků. Zelená odpovídá fenotypu popsanému v této kapitole (kap. 3.3.). Modrá zobrazuje změny v kosterním svalu (kap. 3.1.), žlutá popisuje reprodukční změny (kap. 3.2.) KI – mitochondriální komplex I, KII – komplex II, KIV – komplex IV, SQR/CS – komplex III/citrátsyntáza, CS – citrátsyntáza, GM – glutamát, malát, SDH30 – podjednotka komplexu II, OSCP – podjednotka komplexu V, Opa1, DRP1 – mitochondriální proteiny ovlivňující uspořádání mitochondriální sítě. Upraveno podle (Rodinova et al., 2019).

Významným zjištěním studie byl poznatek, že věk 48 měsíců je u sledovaných TgHN zvířat důležitým předělem, odkdy je možné sledovat jak vnější (motorické, kognitivní) projevy HN, tak změny na úrovni molekulárně genetické. Rozdílné výsledky z mozkové tkáně, kdy bylo množství mtDNA zvýšené v bazálních gangliích u TgHN vzorků a naopak snižené ve vzorcích frontálního kortexu TgHN skupiny naznačují, že intenzita dopadů poškození způsobené mHtt je v různých částech mozku různá a bude důležité, vše sledovat v širším kontextu.

Autorčin podíl práce na studii: Pomoc při odběru a zpracování materiálu, izolace lymfocytů z periferní krve, podíl na měření aktivit mitochondriálních komplexů.. Spolupráce při přípravě publikace

ZÁVĚREČNÝ SOUHRN

Huntingtonova nemoc je fatální neurodegenerativní onemocnění, které je způsobeno expanzí mutací CAG repetice v prvním exonu genu pro multifunkční protein huntingtin. Htt je exprimován napříč tkáněmi a ačkoli dosud nebyly popsány všechny jeho funkce, hraje nezastupitelnou roli při vývoji nervové soustavy a podílí se na axonálním transportu. Mutace Htt vede kromě poškození vlastních funkcí proteinu také k změnám interakce mHtt s původními vazebnými partnery, což patologii onemocnění dále prohlubuje. Nejvýznamnější dopady jsou pozorovány v oblasti *striata* koncového mozku, ale patologické změny s různou mírou omezení pro pacienta byly popsány i v periferních tkáních.

Při HN dochází ke změnám mitochondriálních funkcí a jejich poškození se v průběhu onemocnění stává důležitým faktorem při zhoršování biochemických, potažmo klinických příznaků. Podstata vzniku a rozvoje mitopatie u HN v různých tkáních nebyla dosud uspokojivě popsána. Podobně zatím nebyl charakterizován vhodný biomarker popisující mitochondriální patologii ve vztahu k vývoji onemocnění, který by byl snadno dostupný a jehož parametry by mohly sloužit k monitorování progresu nemoci nebo průběhu případné experimentální léčby.

Předložená disertační práce je souhrnem výsledků téměř desetiletého studia mitochondriálního poškození ve vybraných tkáních pacientů s HN a modelového transgenního miniprasete pro HN. Mitochondriální parametry byly analyzovány širokou škálou metod charakterizujících funkci mitochondrií, jejich proteinové složení, tvar mitochondriální sítě a ultrastrukturální změny na úrovni mitochondrií i celých buněk a tkání.

Jedním z cílů bylo zavedení metody MIA pro stanovení množství KI a KIV systému OXPHOS v buňkách bukalního stěru u pacientů s HN. Hlavní výhodou byl neinvazivní odběr minimálního množství materiálu potřebného pro testování. Metoda byla funkční pro vzorky pacientů, i pro transgenní model pro HN. Získané výsledky naznačují, že u pacientů s HN, kteří mají výživovou podporu je množství KI v bukalním stěru vyšší než u pacientů bez této podpory a metoda může sloužit jako doplňkový marker mitochondriálních změn na úrovni komplexů systému OXPHOS na rozsáhlejších souborech testovaných osob a HN.

Druhým cílem byla analýza mitochondriálních parametrů ve vybraných periferních tkáních symptomatických pacientů s HN. Jednalo se o lymfocyty izolované z periferní krve

a kultivované kožní fibroblasty, jejichž odběr je pro pacienta relativně málo zatěžující a mitochondriální aktivita relativně vysoká.

Studie **na lymfocytech** ukázala významné snížení enzymatické aktivity i proteinového zastoupení CS **u pacientů s HN**, avšak výsledek nekoreloval s klinickými projevy onemocnění. Naopak **bylo detekováno až čtyřnásobně zvýšené poškození nDNA v lymfocytech pacientů s HN**, jehož míra inverzně koreluje s délkou nemoci i klinickými projevy pacientů klasifikovaných dle mezinárodní TFC škály. Úroveň poškození nDNA v lymfocytech pacientů s HN je tedy nadějným kandidátem na vhodný biomarker pro posuzování progresu onemocnění.

Rozsáhlá studie souboru 10 linií kultivovaných kožních fibroblastů od pacientů s HN prokázala, že ve fibroblastech pacientů **dochází ke změnám uspořádání mitochondriální sítě** (nižší denzita mitochondrií, nižší faktor větvení sítě) i k ultrastrukturálním změnám mitochondrií. U pacientů s HN bylo ve fibroblastech pozorováno mitochondriální „bobtnání“, snížený počet krist, větší množství lysosomů a změny ve struktuře Golgiho komplexu v porovnání s kontrolami. Byly detekovány změny exprese proteinů mitochondriální dynamiky (Opa1, Drp1), které mohou souviset se změnami uspořádání sítě u pacientů s HN. Strukturní změny byly **ve fibroblastech pacientů s HN provázeny změnami mitochondriálních funkcí**, kdy byla naměřena snížená respirace závislá na KI a KII dýchacího řetězce a **snížená kapacita mitochondriálního energetického metabolismu** na rozdíl od kontrolních linií. Studie prokázala, že fibroblasty jsou materiálem využitelným pro studium mitopatie v extraneuronální tkáni u HN, avšak nejsou vhodné pro studium progresu mitochondriálních změn u HN, protože úroveň poškození nekorelovala ani s délkou CAG repeticí, ani klinickými projevy pacientů.

Třetí částí disertační práce byla charakterizace ultrastruktury a funkce mitochondrií ve vybraných tkáních transgenního modelu miniprasete pro HN v pre-symptomatickém a časně symptomatickém období. Studovány byly zejména kosterní sval, spermie TgHN samců a lymfocyty izolované z periferní krve. Molekulárně genetické analýzy mtDNA a nDNA byly provedeny ve frontální kůži a bazálních gangliích TgHN jedinců a kontrol.

V kosterním svaly TgHN prasat se od věku 36 měsíců začínají projevovat příznaky onemocnění HN a to na biochemické úrovni. Byla detekována snížená enzymatická aktivita COX a CS a nativní elektroforéza prokázala nižší množství plně uspořádaných komplexů systému OXPHOS u TgHN prasat ve srovnání s kontrolou. Podobně jako u fibroblastů od

pacientů s HN byla rovněž ve svalu TgHN prasat detekována změna exprese proteinů Opa1 a Drp1, která se s věkem zvířat stupňuje. U 48 měsíců starých TgHN zvířat dochází k hromadění glykogenu a změnám v uspořádání myofibril a postupně se rozvíjí problémy s pohybem TgHN jedinců.

Analýza spermií potvrdila u vzorků od TgHN sníženou schopnost penetrovat vajíčko, která je způsobena kombinací poklesu mitochondriálního metabolismu a strukturních změn spojených mimo jiné s hromaděním mtHtt. Dále byla detekována snížena KI dependentní respirace, která je závislá na délce onemocnění. Spermie byly vyhodnoceny jako vhodný neinvazivní materiál pro analýzu mitochondriálních změn u samců prasečího modelu pro HN s potenciálním využitím u pacientů s HN.

Testování mitochondriálních parametrů v mozku (bazální ganglia a frontální kortex) a v lymfocytech transgenního modelu neprokázalo významné změny aktivity PDHc, citrátsyntázy ani dalších sledovaných enzymů mitochondriálního metabolismu TgHN skupiny ve srovnání s kontrolními jedinci. Naopak **testování kognitivních a behaviorálních schopností u transgenního modelu s rostoucím věkem prokázalo, že u věkové kategorie 48 měsíců je u TgHN jedinců poprvé pozorovatelná zhoršená schopnost lokomoce a obtížnější zdolávání úkolů, např. průchod tunelem.** Stejně testy v mladších obdobích (24 a 36 měsíců) změny mezi TgHN a kontrolní skupinou neprokázaly.

Předložené výstupy disertační práce se staly podkladem pro další pokračování výzkumu mitochondriálního poškození u HN a to jak u pacientů, tak u transgenního modelu.

Veškerá snaha pokračujícího výzkumu směřuje k co nejlepší možné charakterizaci mitochondriálního poškození u transgenního modelu pro HN v čase, který by nám mohl významně pomoci jednak v interpretaci patologického fenotypu mitochondrií u pacientů s HN, ale také při testování experimentální léčby.

Spoluautorské publikace s tématem Huntingtonovy nemoci

Řazeno podle data vydání. Články označené * jsou součástí disertační práce.

1. ***Vanisova M**, Stufkova H, Kohoutova M, Rakosnikova T, Krizova J, Klempir J, Rysankova I, Roth J, Zeman J, Hansikova H. Mitochondrial organization and structure are compromised in fibroblasts from patients with Huntington's disease. *Ultrastruct Pathol.* 2022 Aug 10;1-14. doi: 10.1080/01913123.2022.2100951. **-Q4, IF: 1.385**
2. ***Rodinova M**, Krizova J, Stufkova H, Bohuslavova B, Askeland G, Dosoudilova Z, Juhas S, Juhasova J, Ellederova Z, Zeman J, Eide L, Motlik J, Hansikova H. Skeletal muscle in an early manifest transgenic minipig model of Huntington's disease revealed deterioration of mitochondrial bioenergetics and ultrastructure impairment. *Dis Model Mech.* 2019 Jul 5. pii: dmm.038737. doi: 10.1242/dmm.038737. **-Q1, IF:5,732**
3. Skalnikova HK, Bohuslavova B, Turnovcova K, Juhasova J, Juhas S, **Rodinova M**, Vodicka P. Isolation and Characterization of Small Extracellular Vesicles from Porcine Blood Plasma, Cerebrospinal Fluid, and Seminal Plasma. *Proteomes.* 2019 Apr 25;7(2). pii: E17. doi: 10.3390/proteomes7020017. **-Q2, IF:0,906**
4. ***Askeland G**, **Rodinova M**, Štufková H, Dosoudilova Z, Baxa M, Smatlikova P, Bohuslavova B, Klempir J, Nguyen TD, Kuśnierczyk A, Bjørås M, Klungland A, Hansikova H, Ellederova Z, Eide L. A transgenic minipig model of Huntington's disease shows early signs of behavioral and molecular pathologies. *Dis Model Mech.* 2018 Oct 24;11(10). pii: dmm035949. doi: 10.1242/dmm.035949. **-Q1, IF:5,732**
5. ***Askeland G**, Dosoudilova Z, **Rodinova M**, Klempir J, Liskova I, Kuśnierczyk A, Bjørås M, Nesse G, Klungland A, Hansikova H, Eide L. Increased nuclear DNA damage precedes mitochondrial dysfunction in peripheral blood mononuclear cells from Huntington's disease patients. *Sci Rep.* 2018 Jun 29;8(1):9817. doi: 10.1038/s41598-018-27985-y. **-Q1, IF: 4,997**
6. ***Krizova J**, Stufkova H, **Rodinova M**, Macakova M, Bohuslavova B, Vidinska D, Klima J, Ellederova Z, Pavlok A, Howland DS, Zeman J, Motlik J, Hansikova H. Mitochondrial Metabolism in a Large-Animal Model of Huntington Disease: The Hunt for Biomarkers in the Spermatozoa of Presymptomatic Minipigs. *Neurodegener Dis.* 2017;17(4-5):213-226. doi: 10.1159/000475467. Epub 2017 Jun 21, **-Q2, IF: 3,417**
7. ***Rodinova M.**, Trefilova E., Liskova I, Klempir J., Ellederova Z., Vidinska D., Motlik J., Zeman J., Hansikova H. Buccal epithelial Cells as Potential Non – invasive Materials for the Monitoring of Mitochondrial Disturbances to Track Huntington's Disease Progression – a Pilot Study. *Cesk Slov Neurol N*;78/111 (Supl 2):2S49-2S54, 2015, **IF: 0,411**

8. Kratochvilova H., **Rodinova M.**, Sladkova J., Klempir J., Liskova I., Motlik J., Zeman J., Hansikova H., Tesarova M. Acyl-CoA Binding Domain Containing 3 (ACBD3) Protein in Huntington's Disease Human Skin Fibroblasts. *Cesk Slov Neurol N*;78/111 (Supl 2):2S34-2S38, 2015, **IF: 0,411**
9. *Dušek P, **Rodinová M**, Lišková I, Klempíř J, Zeman J, Roth J, Hansíková H. Buccal Respiratory Chain Complexes I and IV Quantities in Huntington's Disease Patients. *Folia Biol (Praha)*. 2018;64(1):31-34. -**Q4, IF: 1,167**

REFERENCE:

- Almeida, S., Sarmiento-Ribeiro, A.B., Januário, C., Rego, A.C., Oliveira, C.R., 2008. Evidence of apoptosis and mitochondrial abnormalities in peripheral blood cells of Huntington's disease patients. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 374, 599–603. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.07.009>
- Arenas, J., Campos, Y., Ribacoba, R., Martín, M.A., Rubio, J.C., Ablanado, P., Cabello, A., 1998. Complex I defect in muscle from patients with Huntington's disease. *Ann. Neurol.* 43, 397–400. <https://doi.org/10.1002/ana.410430321>
- Askeland, G., Dosoudilova, Z., Rodinova, M., Klempir, J., Liskova, I., Kuśnierczyk, A., Bjørås, M., Nesse, G., Klungland, A., Hansikova, H., Eide, L., 2018a. Increased nuclear DNA damage precedes mitochondrial dysfunction in peripheral blood mononuclear cells from Huntington's disease patients. *Sci. Rep.* 8, 9817. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27985-y>
- Askeland, G., Rodinova, M., Štufková, H., Dosoudilova, Z., Baxa, M., Smatlikova, P., Bohuslavova, B., Klempir, J., Nguyen, T.D., Kuśnierczyk, A., Bjørås, M., Klungland, A., Hansikova, H., Ellederova, Z., Eide, L., 2018b. A transgenic minipig model of Huntington's disease shows early signs of behavioral and molecular pathologies. *Dis. Model. Mech.* 11. <https://doi.org/10.1242/dmm.035949>
- Barnes, G.T., Duyao, M.P., Ambrose, C.M., McNeil, S., Persichetti, F., Srinidhi, J., Gusella, J.F., MacDonald, M.E., 1994. Mouse Huntington's disease gene homolog (Hdh). *Somat. Cell Mol. Genet.* 20, 87–97. <https://doi.org/10.1007/BF02290678>
- Baxa, M., Hruska-Plochan, M., Juhas, S., Vodicka, P., Pavlok, A., Juhasova, J., Miyanochara, A., Nejime, T., Klima, J., Macakova, M., Marsala, S., Weiss, A., Kubickova, S., Musilova, P., Vrtel, R., Sontag, E.M., Thompson, L.M., Schier, J., Hansikova, H., Howland, D.S., Cattaneo, E., DiFiglia, M., Marsala, M., Motlik, J., 2013. A transgenic minipig model of Huntington's Disease. *J. Huntingt. Dis.* 2, 47–68. <https://doi.org/10.3233/JHD-130001>
- Benard, G., Bellance, N., James, D., Parrone, P., Fernandez, H., Letellier, T., Rossignol, R., 2007. Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. *J. Cell Sci.* 120, 838–848. <https://doi.org/10.1242/jcs.03381>
- Benn, C.L., Landles, C., Li, H., Strand, A.D., Woodman, B., Sathasivam, K., Li, S.-H., Ghazi-Noori, S., Hockly, E., Faruque, S.M.N.N., Cha, J.-H.J., Sharpe, P.T., Olson, J.M., Li, X.-J., Bates, G.P., 2005. Contribution of nuclear and extranuclear polyQ to neurological phenotypes in mouse models of Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.* 14, 3065–3078. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi340>
- Böhm, M., Papezova, H., Hansikova, H., Wenchich, L., Zeman, J., 2007. Activities of respiratory chain complexes in isolated platelets in females with anorexia nervosa. *Int. J. Eat. Disord.* 40, 659–663. <https://doi.org/10.1002/eat.20403>
- Braubach, P., Orynbayev, M., Andronache, Z., Hering, T., Landwehrmeyer, G.B., Lindenberg, K.S., Melzer, W., 2014. Altered Ca(2+) signaling in skeletal muscle fibers of the R6/2 mouse, a model of Huntington's disease. *J. Gen. Physiol.* 144, 393–413. <https://doi.org/10.1085/jgp.201411255>

- Browne, S.E., Bowling, A.C., MacGarvey, U., Baik, M.J., Berger, S.C., Muqit, M.M., Bird, E.D., Beal, M.F., 1997. Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia. *Ann. Neurol.* 41, 646–653. <https://doi.org/10.1002/ana.410410514>
- Cadenas, E., Davies, K.J., 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic. Biol. Med.* 29, 222–230. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(00\)00317-8](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(00)00317-8)
- Caviston, J.P., Zajac, A.L., Tokito, M., Holzbaur, E.L.F., 2011. Huntingtin coordinates the dynein-mediated dynamic positioning of endosomes and lysosomes. *Mol. Biol. Cell* 22, 478–492. <https://doi.org/10.1091/mbc.E10-03-0233>
- Chakraborty, J., Rajamma, U., Mohanakumar, K.P., 2014. A mitochondrial basis for Huntington's disease: therapeutic prospects. *Mol. Cell. Biochem.* 389, 277–291. <https://doi.org/10.1007/s11010-013-1951-9>
- Chen, X., Guo, C., Kong, J., 2012. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Neural Regen. Res.* 7, 376–385. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1673-5374.2012.05.009>
- Choo, Y.S., Johnson, G.V.W., MacDonald, M., Detloff, P.J., Lesort, M., 2004. Mutant huntingtin directly increases susceptibility of mitochondria to the calcium-induced permeability transition and cytochrome c release. *Hum. Mol. Genet.* 13, 1407–1420. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh162>
- Ciammola, A., Sassone, J., Alberti, L., Meola, G., Mancinelli, E., Russo, M.A., Squitieri, F., Silani, V., 2006. Increased apoptosis, Huntingtin inclusions and altered differentiation in muscle cell cultures from Huntington's disease subjects. *Cell Death Differ.* 13, 2068–2078. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401967>
- Ciammola, A., Sassone, J., Sciacco, M., Mencacci, N.E., Ripolone, M., Bizzi, C., Colciago, C., Moggio, M., Parati, G., Silani, V., Malfatto, G., 2011. Low anaerobic threshold and increased skeletal muscle lactate production in subjects with Huntington's disease. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 26, 130–137. <https://doi.org/10.1002/mds.23258>
- Costa, V., Scorrano, L., 2012. Shaping the role of mitochondria in the pathogenesis of Huntington's disease. *EMBO J.* 31, 1853–1864. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.65>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.015>
- Davidov, Y., Jurkevitch, E., 2009. Predation between prokaryotes and the origin of eukaryotes. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 31, 748–757. <https://doi.org/10.1002/bies.200900018>
- Dušek, P., Rodinová, M., Lišková, I., Klempíř, J., Zeman, J., Roth, J., Hansíková, H., 2018. Buccal Respiratory Chain Complexes I and IV Quantities in Huntington's Disease Patients. *Folia Biol. (Praha)* 64, 31–34.
- Faber, P.W., Voisine, C., King, D.C., Bates, E.A., Hart, A.C., 2002. Glutamine/proline-rich PQE-1 proteins protect *Caenorhabditis elegans* neurons from huntingtin polyglutamine neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 17131–17136. <https://doi.org/10.1073/pnas.262544899>

- Fernández-Vizarra, E., Ugalde, C., 2022. Cooperative assembly of the mitochondrial respiratory chain. *Trends Biochem. Sci.* 47, 999–1008. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2022.07.005>
- Gardiner, S.L., Milanese, C., Boogaard, M.W., Buijsen, R.A.M., Hogenboom, M., Roos, R.A.C., Mastroberardino, P.G., van Roon-Mom, W.M.C., Aziz, N.A., 2018. Bioenergetics in fibroblasts of patients with Huntington disease are associated with age at onset. *Neurol. Genet.* 4, e275. <https://doi.org/10.1212/NXG.0000000000000275>
- Godin, J.D., Colombo, K., Molina-Calavita, M., Keryer, G., Zala, D., Charrin, B.C., Dietrich, P., Volvert, M.-L., Guillemot, F., Dragatsis, I., Bellaïche, Y., Saudou, F., Nguyen, L., Humbert, S., 2010. Huntingtin is required for mitotic spindle orientation and mammalian neurogenesis. *Neuron* 67, 392–406. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.06.027>
- Gonzalez-Alegre, P., Afifi, A.K., 2006. Clinical characteristics of childhood-onset (juvenile) Huntington disease: report of 12 patients and review of the literature. *J. Child Neurol.* 21, 223–229. <https://doi.org/10.2310/7010.2006.00055>
- Gu, M., Gash, M.T., Mann, V.M., Javoy-Agid, F., Cooper, J.M., Schapira, A.H., 1996. Mitochondrial defect in Huntington's disease caudate nucleus. *Ann. Neurol.* 39, 385–389. <https://doi.org/10.1002/ana.410390317>
- Guo, J., Zhu, P., Wu, C., Yu, L., Zhao, S., Gu, X., 2003. In silico analysis indicates a similar gene expression pattern between human brain and testis. *Cytogenet. Genome Res.* 103, 58–62. <https://doi.org/10.1159/000076290>
- Holt, I.J., Harding, A.E., Morgan-Hughes, J.A., 1988. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* 331, 717–719. <https://doi.org/10.1038/331717a0>
- Howland, D., Ellederova, Z., Aronin, N., Fernau, D., Gallagher, J., Taylor, A., Hennebold, J., Weiss, A.R., Gray-Edwards, H., McBride, J., 2020. Large Animal Models of Huntington's Disease: What We Have Learned and Where We Need to Go Next. *J. Huntingt. Dis.* 9, 201–216. <https://doi.org/10.3233/JHD-200425>
- Jackson, G.R., Salecker, I., Dong, X., Yao, X., Arnheim, N., Faber, P.W., MacDonald, M.E., Zipursky, S.L., 1998. Polyglutamine-expanded human huntingtin transgenes induce degeneration of *Drosophila* photoreceptor neurons. *Neuron* 21, 633–642. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80573-5](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80573-5)
- Jacobsen, J.C., Bawden, C.S., Rudiger, S.R., McLaughlan, C.J., Reid, S.J., Waldvogel, H.J., MacDonald, M.E., Gusella, J.F., Walker, S.K., Kelly, J.M., Webb, G.C., Faull, R.L.M., Rees, M.I., Snell, R.G., 2010. An ovine transgenic Huntington's disease model. *Hum. Mol. Genet.* 19, 1873–1882. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq063>
- Janssen, A.J.M., Trijbels, F.J.M., Sengers, R.C.A., Wintjes, L.T.M., Ruitenbeek, W., Smeitink, J.A.M., Morava, E., van Engelen, B.G.M., van den Heuvel, L.P., Rodenburg, R.J.T., 2006. Measurement of the energy-generating capacity of human muscle mitochondria: diagnostic procedure and application to human pathology. *Clin. Chem.* 52, 860–871. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.062414>
- Jędrak, P., Mozolewski, P., Węgrzyn, G., Więckowski, M.R., 2018. Mitochondrial alterations accompanied by oxidative stress conditions in skin fibroblasts of Huntington's disease patients. *Metab. Brain Dis.* 33, 2005–2017. <https://doi.org/10.1007/s11011-018-0308-1>

- Jenkins, B.G., Koroshetz, W.J., Beal, M.F., Rosen, B.R., 1993. Evidence for impairment of energy metabolism in vivo in Huntington's disease using localized ¹H NMR spectroscopy. *Neurology* 43, 2689–2695. <https://doi.org/10.1212/wnl.43.12.2689>
- Jeong, H., Then, F., Melia, T.J.J., Mazzulli, J.R., Cui, L., Savas, J.N., Voisine, C., Paganetti, P., Tanese, N., Hart, A.C., Yamamoto, A., Krainc, D., 2009. Acetylation targets mutant huntingtin to autophagosomes for degradation. *Cell* 137, 60–72. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.018>
- Kawamoto, Y., Ayaki, T., Urushitani, M., Ito, H., Takahashi, R., 2016. Activated caspase-9 immunoreactivity in glial and neuronal cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy. *Neurosci. Lett.* 628, 207–212. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.06.036>
- Kim, A., Lalonde, K., Truesdell, A., Gomes Welter, P., Brocardo, P.S., Rosenstock, T.R., Gil-Mohapel, J., 2021. New Avenues for the Treatment of Huntington's Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 22. <https://doi.org/10.3390/ijms22168363>
- Kiraz, Y., Adan, A., Kartal Yandim, M., Baran, Y., 2016. Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* 37, 8471–8486. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5035-9>
- Kolobkova, Y.A., Vigont, V.A., Shalygin, A.V., Kaznacheyeva, E.V., 2017. Huntington's Disease: Calcium Dyshomeostasis and Pathology Models. *Acta Naturae* 9, 34–46.
- Kosinski, C.M., Schlangen, C., Gellerich, F.N., Gizatullina, Z., Deschauer, M., Schiefer, J., Young, A.B., Landwehrmeyer, G.B., Toyka, K.V., Sellhaus, B., Lindenberg, K.S., 2007. Myopathy as a first symptom of Huntington's disease in a Marathon runner. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 22, 1637–1640. <https://doi.org/10.1002/mds.21550>
- Kremer, B., Goldberg, P., Andrew, S.E., Theilmann, J., Telenius, H., Zeisler, J., Squitieri, F., Lin, B., Bassett, A., Almqvist, E., 1994. A worldwide study of the Huntington's disease mutation. The sensitivity and specificity of measuring CAG repeats. *N. Engl. J. Med.* 330, 1401–1406. <https://doi.org/10.1056/NEJM199405193302001>
- Krizova, J., Stufkova, H., Rodinova, M., Macakova, M., Bohuslavova, B., Vidinska, D., Klima, J., Ellederova, Z., Pavlok, A., Howland, D.S., Zeman, J., Motlik, J., Hansikova, H., 2017. Mitochondrial Metabolism in a Large-Animal Model of Huntington Disease: The Hunt for Biomarkers in the Spermatozoa of Presymptomatic Minipigs. *Neurodegener. Dis.* 17, 213–226. <https://doi.org/10.1159/000475467>
- Kuhl, D.E., Phelps, M.E., Markham, C.H., Metter, E.J., Riege, W.H., Winter, J., 1982. Cerebral metabolism and atrophy in Huntington's disease determined by ¹⁸FDG and computed tomographic scan. *Ann. Neurol.* 12, 425–434. <https://doi.org/10.1002/ana.410120504>
- Kuwert, T., Lange, H.W., Langen, K.J., Herzog, H., Aulich, A., Feinendegen, L.E., 1990. Cortical and subcortical glucose consumption measured by PET in patients with Huntington's disease. *Brain J. Neurol.* 113 (Pt 5), 1405–1423. <https://doi.org/10.1093/brain/113.5.1405>
- Larsen, S., Nielsen, J., Hansen, C.N., Nielsen, L.B., Wibrand, F., Stride, N., Schroder, H.D., Boushel, R., Helge, J.W., Dela, F., Hey-Mogensen, M., 2012. Biomarkers of mitochondrial content in skeletal muscle of healthy young human subjects. *J. Physiol.* 590, 3349–3360. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.230185>

- Lawlor, M., Zigo, M., Kerns, K., Cho, I.K., Easley Iv, C.A., Sutovsky, P., 2022. Spermatozoan Metabolism as a Non-Traditional Model for the Study of Huntington's Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 23. <https://doi.org/10.3390/ijms23137163>
- Leavitt, B.R., Guttman, J.A., Hodgson, J.G., Kimel, G.H., Singaraja, R., Vogl, A.W., Hayden, M.R., 2001. Wild-type huntingtin reduces the cellular toxicity of mutant huntingtin in vivo. *Am. J. Hum. Genet.* 68, 313–324. <https://doi.org/10.1086/318207>
- Lezi, E., Swerdlow, R.H., 2012. Mitochondria in neurodegeneration. *Adv. Exp. Med. Biol.* 942, 269–286. https://doi.org/10.1007/978-94-007-2869-1_12
- Li, S.H., Schilling, G., Young, W.S. 3rd, Li, X.J., Margolis, R.L., Stine, O.C., Wagster, M.V., Abbott, M.H., Franz, M.L., Ranen, N.G., 1993. Huntington's disease gene (IT15) is widely expressed in human and rat tissues. *Neuron* 11, 985–993. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(93\)90127-d](https://doi.org/10.1016/0896-6273(93)90127-d)
- Lightowlers, R.N., Chinnery, P.F., Turnbull, D.M., Howell, N., 1997. Mammalian mitochondrial genetics: heredity, heteroplasmy and disease. *Trends Genet. TIG* 13, 450–455. [https://doi.org/10.1016/s0168-9525\(97\)01266-3](https://doi.org/10.1016/s0168-9525(97)01266-3)
- Lin, B., Rommens, J.M., Graham, R.K., Kalchman, M., MacDonald, H., Nasir, J., Delaney, A., Goldberg, Y.P., Hayden, M.R., 1993. Differential 3' polyadenylation of the Huntington disease gene results in two mRNA species with variable tissue expression. *Hum. Mol. Genet.* 2, 1541–1545. <https://doi.org/10.1093/hmg/2.10.1541>
- Liou, G.-Y., Storz, P., 2010. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic. Res.* 44, 479–496. <https://doi.org/10.3109/10715761003667554>
- LUFT, R., IKKOS, D., PALMIERI, G., ERNSTER, L., AFZELIUS, B., 1962. A case of severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: a correlated clinical, biochemical, and morphological study. *J. Clin. Invest.* 41, 1776–1804. <https://doi.org/10.1172/JCI104637>
- Macakova, M., Bohuslavova, B., Vochozkova, P., Pavlok, A., Sedlackova, M., Vidinska, D., Vochyanova, K., Liskova, I., Valekova, I., Baxa, M., Ellederova, Z., Klima, J., Juhas, S., Juhasova, J., Klouckova, J., Haluzik, M., Klempir, J., Hansikova, H., Spacilova, J., Collins, R., Blumenthal, I., Talkowski, M., Gusella, J.F., Howland, D.S., DiFiglia, M., Motlik, J., 2016. Mutated Huntingtin Causes Testicular Pathology in Transgenic Minipig Boars. *Neurodegener. Dis.* 16, 245–259. <https://doi.org/10.1159/000443665>
- Mangiarini, L., Sathasivam, K., Seller, M., Cozens, B., Harper, A., Hetherington, C., Lawton, M., Trottier, Y., Lehrach, H., Davies, S.W., Bates, G.P., 1996. Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell* 87, 493–506. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81369-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81369-0)
- Mantovani, S., Gordon, R., Li, R., Christie, D.C., Kumar, V., Woodruff, T.M., 2016. Motor deficits associated with Huntington's disease occur in the absence of striatal degeneration in BACHD transgenic mice. *Hum. Mol. Genet.* 25, 1780–1791. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw050>
- Marques Sousa, C., Humbert, S., 2013. Huntingtin: here, there, everywhere! *J. Huntingt. Dis.* 2, 395–403. <https://doi.org/10.3233/JHD-130082>
- Martin, W., Herrmann, R.G., 1998. Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens, and Why? *Plant Physiol.* 118, 9–17. <https://doi.org/10.1104/pp.118.1.9>

- Mashima, R., Witting, P.K., Stocker, R., 2001. Oxidants and antioxidants in atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* 12, 411–418. <https://doi.org/10.1097/00041433-200108000-00007>
- McColgan, P., Tabrizi, S.J., 2018. Huntington's disease: a clinical review. *Eur. J. Neurol.* 25, 24–34. <https://doi.org/10.1111/ene.13413>
- Meizel, S., 2004. The sperm, a neuron with a tail: 'neuronal' receptors in mammalian sperm. *Biol. Rev.* 79, 713–732. <https://doi.org/10.1017/S1464793103006407>
- Meizel, S., Son, J.-H., 2005. Studies of sperm from mutant mice suggesting that two neurotransmitter receptors are important to the zona pellucida-initiated acrosome reaction. *Mol. Reprod. Dev.* 72, 250–258. <https://doi.org/10.1002/mrd.20336>
- Morton, A.J., Howland, D.S., 2013. Large genetic animal models of Huntington's Disease. *J. Huntingt. Dis.* 2, 3–19. <https://doi.org/10.3233/JHD-130050>
- 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. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90542-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90542-1)
- Neylan, T.C., 2003. Neurodegenerative disorders: George Huntington's description of hereditary chorea. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* 15, 108. <https://doi.org/10.1176/jnp.15.1.108>
- Nopoulos, P.C., 2016. Huntington disease: a single-gene degenerative disorder of the striatum. *Dialogues Clin. Neurosci.* 18, 91–98. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2016.18.1/pnopoulos>
- Ochaba, J., Lukacsovich, T., Csikos, G., Zheng, S., Margulis, J., Salazar, L., Mao, K., Lau, A.L., Yeung, S.Y., Humbert, S., Saudou, F., Klionsky, D.J., Finkbeiner, S., Zeitlin, S.O., Marsh, J.L., Housman, D.E., Thompson, L.M., Steffan, J.S., 2014. Potential function for the Huntingtin protein as a scaffold for selective autophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 16889–16894. <https://doi.org/10.1073/pnas.1420103111>
- Orr, H.T., 2012. Polyglutamine neurodegeneration: expanded glutamines enhance native functions. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 22, 251–255. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2012.01.001>
- Palidwor, G.A., Shcherbinin, S., Huska, M.R., Rasko, T., Stelzl, U., Arumughan, A., Foulle, R., Porras, P., Sanchez-Pulido, L., Wanker, E.E., Andrade-Navarro, M.A., 2009. Detection of alpha-rod protein repeats using a neural network and application to huntingtin. *PLoS Comput. Biol.* 5, e1000304. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000304>
- Panov, A.V., Gutekunst, C.-A., Leavitt, B.R., Hayden, M.R., Burke, J.R., Strittmatter, W.J., Greenamyre, J.T., 2002. Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines. *Nat. Neurosci.* 5, 731–736. <https://doi.org/10.1038/nn884>
- Parker, W.D.J., Boyson, S.J., Luder, A.S., Parks, J.K., 1990. Evidence for a defect in NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) in Huntington's disease. *Neurology* 40, 1231–1234. <https://doi.org/10.1212/wnl.40.8.1231>
- Patten, B.M., Carlson, B.M., 1996. Patten's Foundations of Embryology. McGraw-Hill.

- Pickrell, A.M., Fukui, H., Wang, X., Pinto, M., Moraes, C.T., 2011. The striatum is highly susceptible to mitochondrial oxidative phosphorylation dysfunctions. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 9895–9904. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6223-10.2011>
- Procaccio, V., Wallace, D.C., 2004. Late-onset Leigh syndrome in a patient with mitochondrial complex I NDUFS8 mutations. *Neurology* 62, 1899–1901. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000125251.56131.65>
- Purdon, S.E., Mohr, E., Ilivitsky, V., Jones, B.D., 1994. Huntington's disease: pathogenesis, diagnosis and treatment. *J. Psychiatry Neurosci. JPN* 19, 359–367.
- Ranftler, C., Meisslitzer-Ruppitsch, C., Neumüller, J., Ellinger, A., Pavelka, M., 2017. Golgi apparatus dis- and reorganizations studied with the aid of 2-deoxy-D-glucose and visualized by 3D-electron tomography. *Histochem. Cell Biol.* 147, 415–438. <https://doi.org/10.1007/s00418-016-1515-7>
- Raymond, L.A., 2017. Striatal synaptic dysfunction and altered calcium regulation in Huntington disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 483, 1051–1062. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.07.058>
- Reddy, P.H., Shirendeb, U.P., 2012. Mutant huntingtin, abnormal mitochondrial dynamics, defective axonal transport of mitochondria, and selective synaptic degeneration in Huntington's disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1822, 101–110. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.10.016>
- Rego, A.C., Pereira de Almeida, L., 2005. Molecular Targets and Therapeutic Strategies in Huntingtons Disease. *Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.* 4, 361–81. <https://doi.org/10.2174/1568007054546081>
- Rikani, A.A., Choudhry, Z., Choudhry, A.M., Rizvi, N., Ikram, H., Mobassarrah, N.J., Tulli, S., 2014. The mechanism of degeneration of striatal neuronal subtypes in Huntington disease. *Ann. Neurosci.* 21, 112–114. <https://doi.org/10.5214/ans.0972.7531.210308>
- Rizzuto, R., De Stefani, D., Raffaello, A., Mammucari, C., 2012. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 566–578. <https://doi.org/10.1038/nrm3412>
- Rodinova, M., Krizova, J., Stufkova, H., Bohuslavova, B., Askeland, G., Dosoudilova, Z., Juhas, S., Juhasova, J., Ellederova, Z., Zeman, J., Eide, L., Motlik, J., Hansikova, H., 2019. Deterioration of mitochondrial bioenergetics and ultrastructure impairment in skeletal muscle of a transgenic minipig model in the early stages of Huntington's disease. *Dis. Model. Mech.* 12. <https://doi.org/10.1242/dmm.038737>
- Rodinová, M., Trefilová, E., Honzík, T., Tesařová, M., Zeman, J., Hansíková, H., 2014. Non-invasive screening of cytochrome c oxidase deficiency in children using a dipstick immunocapture assay. *Folia Biol. (Praha)* 60, 268–274.
- Rodinova, M., Trefilová, E., Liskova, I., Klempir, J., Ellederová, Z., Vidinska, D., Motlik, J., Zeman, J., Hansikova, H., 2015. Buccal Epithelial Cells as Potential Non- invasive Materials for the Monitoring of Mitochondrial Disturbances to Track Huntington's Disease Progression – a Pilot Study. *Čes. Slov. Neurol. Neurochir.* 78/111, 49–54. <https://doi.org/10.14735/amcsnn2012S49>
- Roos, R.A.C., 2010. Huntington's disease: a clinical review. *Orphanet J. Rare Dis.* 5, 40. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-5-40>

- Ross, C.A., Tabrizi, S.J., 2011. Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment. *Lancet Neurol.* 10, 83–98. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70245-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70245-3)
- Rossignol, R., Faustin, B., Rocher, C., Malgat, M., Mazat, J.-P., Letellier, T., 2003. Mitochondrial threshold effects. *Biochem. J.* 370, 751–762. <https://doi.org/10.1042/BJ20021594>
- Russell, O.M., Gorman, G.S., Lightowlers, R.N., Turnbull, D.M., 2020. Mitochondrial Diseases: Hope for the Future. *Cell* 181, 168–188. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.051>
- Sanberg, P.R., Fibiger, H.C., Mark, R.F., 1981. Body weight and dietary factors in Huntington's disease patients compared with matched controls. *Med. J. Aust.* 1, 407–409. <https://doi.org/10.5694/j.1326-5377.1981.tb135681.x>
- Saudou, F., Humbert, S., 2016. The Biology of Huntingtin. *Neuron* 89, 910–926. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.02.003>
- Schaefer, A., Lim, A., Gorman, G., 2019. Epidemiology of Mitochondrial Disease, in: Mancuso, M., Klopstock, T. (Eds.), *Diagnosis and Management of Mitochondrial Disorders*. Springer International Publishing, Cham, pp. 63–79. https://doi.org/10.1007/978-3-030-05517-2_4
- Sharp, A.H., Loev, S.J., Schilling, G., Li, S.H., Li, X.J., Bao, J., Wagster, M.V., Kotzok, J.A., Steiner, J.P., Lo, A., 1995. Widespread expression of Huntington's disease gene (IT15) protein product. *Neuron* 14, 1065–1074. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90345-3](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90345-3)
- Shoffner, J.M., 1996. Maternal inheritance and the evaluation of oxidative phosphorylation diseases. *Lancet Lond. Engl.* 348, 1283–1288. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(96\)09138-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(96)09138-6)
- Solignac, M., Monnerot, M., Mounolou, J.C., 1983. Mitochondrial DNA heteroplasmy in *Drosophila mauritiana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80, 6942–6946. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.22.6942>
- Sorby-Adams, A.J., Vink, R., Turner, R.J., 2018. Large animal models of stroke and traumatic brain injury as translational tools. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 315, R165–R190. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00163.2017>
- Squitieri, F., Cannella, M., Sgarbi, G., Maglione, V., Falleni, A., Lenzi, P., Baracca, A., Cislighi, G., Saft, C., Ragona, G., Russo, M.A., Thompson, L.M., Solaini, G., Fornai, F., 2006. Severe ultrastructural mitochondrial changes in lymphoblasts homozygous for Huntington disease mutation. *Mech. Ageing Dev.* 127, 217–220. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2005.09.010>
- Squitieri, F., Falleni, A., Cannella, M., Orobello, S., Fulceri, F., Lenzi, P., Fornai, F., 2010. Abnormal morphology of peripheral cell tissues from patients with Huntington disease. *J. Neural Transm. Vienna Austria* 117, 77–83. <https://doi.org/10.1007/s00702-009-0328-4>
- Stahl, W.L., Swanson, P.D., 1974. Biochemical abnormalities in Huntington's chorea brains. *Neurology* 24, 813–819. <https://doi.org/10.1212/wnl.24.9.813>
- Tartari, M., Gissi, C., Lo Sardo, V., Zuccato, C., Picardi, E., Pesole, G., Cattaneo, E., 2008. Phylogenetic comparison of huntingtin homologues reveals the appearance of a primitive polyQ in sea urchin. *Mol. Biol. Evol.* 25, 330–338. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm258>

- Trushina, E., Dyer, R.B., Badger, J.D. 2nd, Ure, D., Eide, L., Tran, D.D., Vrieze, B.T., Legendre-Guillemain, V., McPherson, P.S., Mandavilli, B.S., Van Houten, B., Zeitlin, S., McNiven, M., Aebersold, R., Hayden, M., Parisi, J.E., Seeberg, E., Dragatsis, I., Doyle, K., Bender, A., Chacko, C., McMurray, C.T., 2004. Mutant huntingtin impairs axonal trafficking in mammalian neurons in vivo and in vitro. *Mol. Cell. Biol.* 24, 8195–8209. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.18.8195-8209.2004>
- van der Burg, J.M.M., Björkqvist, M., Brundin, P., 2009. Beyond the brain: widespread pathology in Huntington's disease. *Lancet Neurol.* 8, 765–774. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70178-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70178-4)
- Van Raamsdonk, J.M., Pearson, J., Rogers, D.A., Bissada, N., Vogl, A.W., Hayden, M.R., Leavitt, B.R., 2005. Loss of wild-type huntingtin influences motor dysfunction and survival in the YAC128 mouse model of Huntington disease. *Hum. Mol. Genet.* 14, 1379–1392. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi147>
- Vanisova, M., Stufkova, H., Kohoutova, M., Rakosnikova, T., Krizova, J., Klempir, J., Rysankova, I., Roth, J., Zeman, J., Hansikova, H., 2022. Mitochondrial organization and structure are compromised in fibroblasts from patients with Huntington's disease. *Ultrastruct. Pathol.* 46, 462–475. <https://doi.org/10.1080/01913123.2022.2100951>
- Vidinská, D., Vochozková, P., Šmatlíková, P., Ardan, T., Klíma, J., Juhás, Š., Juhásová, J., Bohuslavová, B., Baxa, M., Valeková, I., Motlík, J., Ellederová, Z., 2018. Gradual Phenotype Development in Huntington Disease Transgenic Minipig Model at 24 Months of Age. *Neurodegener. Dis.* 18, 107–119. <https://doi.org/10.1159/000488592>
- Vonsattel, J.P.G., 2008. Huntington disease models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 115, 55–69. <https://doi.org/10.1007/s00401-007-0306-6>
- Wallace, D.C., 1999. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283, 1482–1488. <https://doi.org/10.1126/science.283.5407.1482>
- Wang, L., Qin, Z., 2006. Animal models of Huntington's disease: implications in uncovering pathogenic mechanisms and developing therapies. *Acta Pharmacol. Sin.* 27, 1287–1302. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2006.00410.x>
- Wong, Y.C., Holzbaur, E.L.F., 2014. The regulation of autophagosome dynamics by huntingtin and HAP1 is disrupted by expression of mutant huntingtin, leading to defective cargo degradation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 34, 1293–1305. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1870-13.2014>
- Yan, J., Zhang, H., Liu, Y., Zhao, F., Zhu, S., Xie, C., Tang, T.-S., Guo, C., 2016. Germline deletion of huntingtin causes male infertility and arrested spermiogenesis in mice. *J. Cell Sci.* 129, 492–501. <https://doi.org/10.1242/jcs.173666>
- Yan, S., Tu, Z., Liu, Z., Fan, N., Yang, Huiming, Yang, S., Yang, W., Zhao, Y., Ouyang, Z., Lai, C., Yang, Huaqiang, Li, L., Liu, Q., Shi, H., Xu, G., Zhao, H., Wei, H., Pei, Z., Li, S., Lai, L., Li, X.-J., 2018. A Huntingtin Knockin Pig Model Recapitulates Features of Selective Neurodegeneration in Huntington's Disease. *Cell* 173, 989–1002.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.005>
- Yang, S.-H., Cheng, P.-H., Banta, H., Piotrowska-Nitsche, K., Yang, J.-J., Cheng, E.C.H., Snyder, B., Larkin, K., Liu, J., Orkin, J., Fang, Z.-H., Smith, Y., Bachevalier, J., Zola, S.M., Li, S.-H., Li, X.-J., Chan, A.W.S., 2008. Towards a transgenic model of

- Huntington's disease in a non-human primate. *Nature* 453, 921–924.
<https://doi.org/10.1038/nature06975>
- Zuccato, C., Cattaneo, E., 2007. Role of brain-derived neurotrophic factor in Huntington's disease. *Prog. Neurobiol.* 81, 294–330. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2007.01.003>
- Pollard, T.D., Earnshaw, W.C., and Lippincott-Schwartz, J. (2008). *Cell biology* (Saunders/Elsevier), 905
- Scheffler, I.E. (2007). Structure and Morphology. Integration into the Cell. In *Mitochondria*, (John Wiley & Sons, Inc.), pp. 18–59.
- RŮNA VOCHOZKOVÁ, Petra. *Porcine models for Huntington disease*. Praha, 2019. Dizertační práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra buněčné biologie. Vedoucí práce Motlík, Jan.
- Wood, E. J. *Cellular and Molecular Immunology* (5th Ed.): Abbas A. K., and Lichtman, A. H. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* 2004, 32 (1), 65–66.
<https://doi.org/10.1002/bmb.2004.494032019997>.

Seznam příloh:

P.1.1.

Rodinova M., Trefilova E., Liskova I., Klempir J., Ellederova Z., Vidinska D., Motlik J., Zeman J., Hansikova H. Buccal epithelial Cells as Potential Non – invasive Materials for the Monitoring of Mitochondrial Disturbances to Track Huntington's Disease Progression – a Pilot Study. *Cesk Slov Neurol N*;78/111 (Supl 2):2S49-2S54, 2015

P.1.2.

Dušek P, **Rodinová M**, Lišková I, Klempíř J, Zeman J, Roth J, Hansíková H. Buccal Respiratory Chain Complexes I and IV Quantities in Huntington's Disease Patients. *Folia Biol (Praha)*. 2018;64(1):31-34

P.2.1.

Vanisova M, Stufkova H, Kohoutova M, Rakosnikova T, Krizova J, Klempir J, Rysankova I, Roth J, Zeman J, Hansikova H. Mitochondrial organization and structure are compromised in fibroblasts from patients with Huntington's disease. *Ultrastruct Pathol*. 2022 Aug 10:1-14. doi: 10.1080/01913123.2022.2100951.

P.2.2.

Askeland G, Dosoudilova Z, **Rodinova M**, Klempir J, Liskova I, Kuśnierczyk A, Bjørås M, Nesse G, Klungland A, Hansikova H, Eide L. Increased nuclear DNA damage precedes mitochondrial dysfunction in peripheral blood mononuclear cells from Huntington's disease patients. *Sci Rep*. 2018 Jun 29;8(1):9817. doi: 10.1038/s41598-018-27985-y

P.3.1.

Rodinova M, Krizova J, Stufkova H, Bohuslavova B, Askeland G, Dosoudilova Z, Juhas S, Juhasova J, Ellederova Z, Zeman J, Eide L, Motlik J, Hansikova H. Deterioration of mitochondrial bioenergetics and ultrastructure impairment in skeletal muscle of a transgenic minipig model in the early stages of Huntington's disease. *Dis Model Mech*. 2019 Jul 5. pii: dmm.038737. doi: 10.1242/dmm.038737

P.3.2.

Krizova J, Stufkova H, **Rodinova M**, Macakova M, Bohuslavova B, Vidinska D, Klima J, Ellederova Z, Pavlok A, Howland DS, Zeman J, Motlik J, Hansikova H. Mitochondrial Metabolism in a Large-Animal Model of Huntington Disease: The Hunt for Biomarkers in the Spermatozoa of Presymptomatic Minipigs. *Neurodegener Dis*. 2017;17(4-5):213-226. doi: 10.1159/000475467. Epub 2017 Jun 21

P.3.3.

Askeland G, **Rodinova M**, Štufková H, Dosoudilova Z, Baxa M, Smatlikova P, Bohuslavova B, Klempir J, Nguyen TD, Kuśnierczyk A, Bjørås M, Klungland A, Hansikova H, Ellederova Z, Eide L. A transgenic minipig model of Huntington's disease shows early signs of behavioral and molecular pathologies. *Dis Model Mech*. 2018 Oct 24;11(10). pii: dmm035949. doi: 10.1242/dmm.035949

**Rodinova M., Trefilova E., Liskova I., Klempir J., Ellederova Z., Vidinska D.,
Motlik J., Zeman J., Hansikova H.**

**Buccal epithelial Cells as Potential Non – invasive Materials for the
Monitoring of Mitochondrial Disturbances to Track Huntington´s Disease
Progression – a Pilot Study.**

Česká a Slovenská neurologie a neurochirurgie, 2015

Dušek P, **Rodinová M**, Lišková I, Klempíř J, Zeman J, Roth J, Hansíková H.

Buccal Respiratory Chain Complexes I and IV Quantities in Huntington's Disease Patients.

Folia Biologica, 2018

Vanisova M, Stufkova H, Kohoutova M, Rakosnikova T, Krizova J, Klempir J, Rysankova I, Roth J, Zeman J, Hansikova H.

Mitochondrial organization and structure are compromised in fibroblasts from patients with Huntington's disease.

Ultrastructural Pathology, 2022

Askeland G, Dosoudilova Z, **Rodinova M**, Klempir J, Liskova I, Kuśnierczyk A, Bjørås M, Nesse G, Klungland A, Hansikova H, Eide L.

Increased nuclear DNA damage precedes mitochondrial dysfunction in peripheral blood mononuclear cells from Huntington's disease patients.

Scientific Reports, 2018

Rodinova M, Krizova J, Stufkova H, Bohuslavova B, Askeland G, Dosoudilova Z, Juhas S, Juhasova J, Ellederova Z, Zeman J, Eide L, Motlik J, Hansikova H.

**Deterioration of mitochondrial bioenergetics and ultrastructure
impairment in skeletal muscle of a transgenic minipig model in the early
stages of Huntington's disease.**

Disease Models and Mechanisms, 2019

Krizova J, Stufkova H, **Rodinova M**, Macakova M, Bohuslavova B, Vidinska D, Klima J, Ellederova Z, Pavlok A, Howland DS, Zeman J, Motlik J, Hansikova H.

Mitochondrial Metabolism in a Large-Animal Model of Huntington Disease: The Hunt for Biomarkers in the Spermatozoa of Presymptomatic Minipigs.

Neurodegenerative Diseases. 2017

Askeland G, **Rodinova M**, Štufková H, Dosoudilova Z, Baxa M, Smatlikova P, Bohuslavova B, Klempir J, Nguyen TD, Kuśnierczyk A, Bjørås M, Klungland A, Hansikova H, Ellederova Z, Eide L.

A transgenic minipig model of Huntington's disease shows early signs of behavioral and molecular pathologies.

Disease Models and Mechanisms, 2018