

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Vývojová a buněčná biologie



Autoreferát disertační práce

Summary of the PhD. Thesis

Fenotypová štúdia Huntingtonovej choroby TgHD miniprasiat: Nástup a priebeh  
reprodukčných zmien

Phenotypic study of Huntington's disease TgHD minipigs: Appearance and  
progress of reproductive and biochemical changes

**MVDr. Božena Bohuslavová**

Školitel: prof. MVDr. Jan Motlík, DrSc.

Školitel-konzultant: doc. MUDr. Igor Kozák, Ph.D

Praha 2018

*Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky*

- Program:** Vývojová a buněčná biologie
- Předseda oborové rady:** doc. RNDr. Petr Folk, CSc
- Školící pracoviště:** Laboratoř buněčné regenerace a plasticity  
Ústav živočišné fyziologie a genetiky  
AV ČR, v. v. i., Liběchov
- Autor:** MVDr. Božena Bohuslavová
- Školitel:** prof. MVDr. Jan Motlík, DrSc.
- Školitel-konzultant:** doc. MUDr. Igor Kozák, Ph.D

S disertací je možno se seznámit v příslušných knihovnách Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

## ABSTRAKT

Na našom ústave v Liběchove sme v roku 2009 vytvorili model transgénneho miniprasaťa (TgHD) nesúceho N - terminálnu časť ľudského mutovaného huntingtínu (mtHtt). Ako prvé zmeny fenotypu sme pozorovali reprodukčné problémy TgHD kancov. Preto sa moja práca v zamerala na komplexné preštudovanie reprodukčných parametrov TgHD kancov. V tejto práci som detailne popísala reprodukčné defekty u TgHD kancov F1 a F2 generácie. Všetky získané výsledky boli vždy porovnávané medzi netransgénnymi (WT) a transgénnymi kancami (TgHD) rovnakého vrhu. U obidvoch generácii TgHD kancov bol zistený nástup reprodukčných zmien vo veku 13tich mesiacov. Zmeny v počte spermíí, v ich pohybe a v progresívnom pohybu dopredu za hlavičkou vykazovali signifikantné rozdiely vo veku 24 až 36 mesiacov. Transmisná elektrónová mikroskopia preukázala početné morfológické abnormality predovšetkým v oblasti bičiku spermíí a taktiež v testikulárnom epiteli vo veku 24 a 36 mesiacov. Tieto morfológické pozorovania boli podopreté imunocytochemickým sledovaním, ktoré preukázalo signifikantne nižšiu proliferáciu spermatogónií TgHD kancov. Zásadné zistenie predstavuje vysoká expresia mutovaného huntingtínu (mtHtt) vo všetkých bunkách semenotvorných kanálikoch semenníkov TgHD kancov a taktiež vo všetkých častiach bičika ejakulovaných spermíí, predovšetkým v ich spojovacích častiach. Tieto zmeny boli taktiež potvrdené neinvazívnym prístupom, vyšetrením testikulárneho tkaniva pomocou  $^{31}\text{P}$  magnetické spektroskopie (MRS). I tento prístup preukázal signifikantný pokles v pomere fosfodiesterov (PDE/ $\gamma$ -ATP) v parenchýme semenníkov TgHD kancov.

Vyššie popísané zmeny v spermíách na úrovni morfológie a funkcie boli zásadným spôsobom potvrdené pomocou detailného štúdia metabolizmu mitochondrií u spermíí WT a TgHD kancov. Funkcie dýchacieho reťazca boli študované pomocou polarografie a potom bol metabolizmus mitochondrií stanovený pomocou detekcie oxidácie rádioaktívnych substrátov. Tento metodický prístup preukázal signifikantný pokles v dýchacom komplexe I a taktiež v štyroch parametroch, ktoré indikujú významné zníženie úrovne glykolytickej dráhy v spermíách TgHD kancov. Tieto experimenty detailne charakterizovali biomarkery pre monitorovanie rozvoja HCH. Predložené výsledky jednoznačne potvrdili negatívni vplyv mutovaného huntingtínu na mitochondriálny metabolizmus, ktorý vedie k degenerácii parenchýmu semenníkov a k zásadným zmenám vo funkcii spermíí.

## ABSTRACT

In 2009, we created a model of the transgenic minipigs (TgHD) carrying the N - terminal part of the human mutant huntingtin (mHtt) at our Institute in Liběchov. The reproductive problems of TgHD boars were observed as the first phenotypic changes. Therefore, my work focuses at first on a study of the reproduction parameters of TgHD boars as well as ultrastructural, immunocytochemical and biochemical changes in testes and spermatozoa. In PhD thesis, I described in details the reproductive defects in TgHD boars of F1 and F2 generations. All gained data were always compared between the wild-type (WT) and TgHD boars from the same litter. The reproductive changes started at the age of 13 months in both generations of TgHD boars. Significant changes in number of spermatozoa per ejaculate, in their movement and in their progressive movement were confirmed at the age of 24 and 36 months, too. Transmission electron microscopy (TEM) revealed numerous morphological abnormalities, first of all at sperm tails and testicular epithelium at the age of 24 and 36 months. These morphological observations were supported by immunocytochemical approaches that confirmed the significantly lower proliferation activity in spermatogonia of TgHD boars. The key result is that the high expression of mHtt occurs in all cells of the seminiferous tubules and also in all parts of sperm tail, in the midpiece especially. The described changes were also confirmed by the noninvasive approach, using  $^{31}\text{P}$  magnetic spectroscopy (MRS) for examination of testicular tissue of siblings (WT and TgHD boars). The significant decrease in ratio of phosphodiesterases (PDE/ $\gamma$ -ATP) in the testicular parenchyma of TgHD boars was documented.

All morphological and functional changes described above were confirmed in the detailed study of mitochondrial metabolism in spermatozoa of WT and TgHD boars. The oxidative function was measured by polarography and metabolism of mitochondria was also measured after oxidation of radioactive substrates. These methodological approaches proved the significant decrease in the activity of respiratory complex I and they also revealed four parameters indicating the serious impairment of glycolytic activity in spermatozoa of TgHD boars. These experiments described in details biomarkers monitoring progress of HD and fully confirmed the negative effect of mHtt on mitochondrial metabolism leading to testicular degeneration and to substantial functional changes of spermatozoa. .

## OBSAH / CONTENT

1. ÚVOD .....	6
2. CIELE .....	7
3. MATERIÁL A METÓDY .....	8
4. VÝSLEDKY .....	9
4.1. Mutovaný huntingtín spôsobuje testikulárnu patológiu u kancov transgéného miniprasaťa .....	9
4.2. <sup>31</sup> P MR spektroskopia semenníkov a imunohistochemická analýza spermíí transgénnych kancov realizovaná pre N koncovú časť ľudského mutovaného huntingtinu 10	
4.3. Mitochondriálny metabolizmus na veľkom zvieracom modeli pre Huntingtonovu chorobu: hľadanie biomarkerov v spermíách presymptomatických miniprasiat Biomarkery mitochondriálneho metabolizmu v spermíách TgHD kancov ... ..	12
5. DISKUSIA .....	14
6. ZÁVER .....	18
1. INTRODUCTION .....	19
2. AIMS .....	20
3. MATERIAL AND METHODS .....	21
4. RESULTS .....	22
4.1. Mutated huntingtin causes testicular pathology in transgenic minipig boars .....	22
4.2. <sup>31</sup> P MR Spectroscopy of the Testes and Immunohistochemical Analysis of Sperm of Transgenic Boars Carried N terminal Part of Human Mutated Huntingtin .....	23
4.3. Mitochondrial Metabolism in Large-Animal Model of Huntington's Disease: The Hunt for Biomarkers in the Spermatozoa of Presymptomatic Minipigs .....	24
5. DISCUSSION .....	27
6. CONCLUSIONS .....	31
7. CITOVANÁ LITERATÚRA / REFERENCES .....	32
8. PREHĽAD PUBLIKÁCIÍ / LIST OF PUBLICATIONS .....	36
8.1. Publikácie v impaktovaných časopisoch/ Publications in Impacted Magazines .....	36
8.2. Publikácie v knižných zborníkoch/Publications in book collections .....	37
8.3. Publikácie v neimpaktovaných časopisoch/Publications in unimpacted Magazines .....	37
9. CURRICULUM VITAE .....	38

## 1. ÚVOD

Predtým, než Huntingtonova choroba dostala svoj názov po Georgovi Huntingtonovi (Huntington, 2003; Neylan, 2003), sa pre toto ochorenie od 14. storočia používal názov „tanečná mánia“. Ide autozomálne dominantne dedičné ochorenie, s neurodegeneratívnymi príznakmi a progresívnym priebehom. Vo väčšine prípadov sa prejaví v dospelosti, len asi 5% prípadov v detskom veku (Roth, 2010). Typické príznaky sú choreatické pohyby, zníženie mentálnych schopností. Priebeh je progresívny s fatálnym koncom. V roku 1983 bol identifikovaný polymorfný DNA marker, lokalizovaný na ľudskom chromozóme 4, signalizujúci HCH (James F. Gusella et al., 1983). V roku 1993 bol objavený jediný kauzálny gén, ktorého mutácia je zodpovedná za HCH (J F Gusella, Persichetti, & MacDonald, 1997).

Najväčšia expresia proteínu HTT prebieha v mozgu a semenníkoch (Li et al., 1993). Rozsah expresie v semenníkoch je porovnateľný s expresiou v mozgu (Guo et al., 2003). Na myších modeloch HCH je pozorovaná atfia semenníkov, poškodenie semenotvorného epitelu a znížený počet zárodočných buniek (Papalexí et al., 2005; Van Raamsdonk et al., 2005, 2007). Markianos vo svojej štúdií taktiež zistil zníženú koncentráciu hormónu testosterón (Markianos, Panas, Kalfakis, & Vassilopoulos, 2005). Naproti tomu štúdie Saleha nepreukázali signifikantné zmeny v koncentrácii testosterónu medzi pacientami s HCH a zdravými kontrolami (Saleh et al., 2009).

V dnešnej dobe zatiaľ nie je k dispozícii žiadna liečba, ktorá by spomalila a zastavila progresiu ochorenia. Používajú sa len farmaká na dočasné zmiernenie klinických príznakov (Ross & Tabrizi, 2011). Na vyvinutie správnej liečby pre ľudí trpiacich HCH je potrebné porozumieť nielen prejavom choroby, ale aj mechanizmom, ktoré túto chorobu spôsobili. Aby sme tieto mechanizmy mohli študovať, je potrebné vytvoriť zvieracie modely, ktoré budú mať fenotyp odpovedajúci HCH. Na našom ústave AV ČR v Liběchove sme vytvorili v r.2009 model transgénneho miniprasaťa pre Huntingtonovu chorobu (Baxa et al., 2013). Pretože prasa má podobnú veľkosť a fyziológiu orgánov ako človek, tento model je vhodný na skúšanie nových terapeutických prístupov v podobe génovej terapie. Génovou terapiou nazývame liečebný postup, pri ktorom je do genómu pacienta vložená sekvencia DNA, pričom táto sekvencia kóduje chýbajúci alebo nefungujúci proteín, poprípade môže potlačiť mutovaný proteín. Ako terapeutické princípy génovej terapie sa najčastejšie využívajú ASOs- antisense oligonucleotides a RNA interferencia.

## 2. CIELE

Cieľom dizertačnej práce bolo popísať fenotyp transgénneho miniprasaťa s HCH.

1. Prvým cieľom dizertačnej práce bolo popísať funkčné a štrukturálne zmeny spermii kancov miniprasiat transgénnych pre HCH a ich kontrolných súrodencov.
2. Druhým cieľom dizertačnej práce bolo štúdium metabolických zmien v semenníkoch u F2 generácie kancov miniprasiat transgénnych pre HCH použitím <sup>31</sup>P MRI spektroskopie.
3. Tretím cieľom bolo štúdium mitochondriálnej dysfunkcie spermii kancov miniprasiat transgénnych pre HCH.

### **3. MATERIÁL A METÓDY**

#### **Použitý model: transgénne miniprasa pre Huntingtonovu chorobu**

Na štúdium fenotypu Huntingtonovej choroby sme využili model transgénneho miniprasťa pre Huntingtonovu chorobu, ktorý bol v roku 2009 vytvorený v našom laboratóriu (Baxa et al., 2013), a ako veľký zvierací model je vhodný na štúdium choroby. Naše miniprasa nesie N-terminálny fragment ľudského mutovaného huntingtínu so 124 CAG/CAA repetíciami.

Všetky experimenty boli vykonané so súladom ustanovenia pre zachovanie welfare zvierat so súhlasom Štátnej veterinárnej správy Českej republiky.

#### **Štúdium štruktúrnych a reprodukčných zmien spermií TgHD kancov a ich súrodencov**

Stanovenie počtu spermií, motility, progresivity, test prežívateľnosti spermií, penetračný test, imunocytochemické pokusy, Western blot (Macakova et al., 2016)

#### **Štúdium pomocou <sup>31</sup>P MRI spektroskopie**

<sup>31</sup>P MRI spektroskopie (Jozefovicova et al., 2016)

#### **Štúdium mitochondriálnej dysfunkcie spermií TgHD kancov**

Imunocytochemické pokusy, meranie MEGS aktivity, SDS-PAGE, respirometria (Krizova et al., 2017)



## 4. VÝSLEDKY

### 4.1. Mutovaný huntingtín spôsobuje testikulárnu patológiu u kancov transgéného miniprasaťa

*Mutated huntingtin causes testicular pathology in transgenic minipig boars*

Monika Macakova, **Božena Bohuslavova**, Petra Vochozkova, Antonin Pavlok, Miroslava Sedlackova, Daniela Vidinska, Klara Vochyanova, Irena Liskova, Ivona Valekova, Monika Baxa, Zdenka Ellederova, Jiri Klima, Stefan Juhas, Jana Juhasova, Jana Klouckova, Martin Haluzik, Jiri Klempir, Hana Hansikova, Jana Spacilova, Ryan Collins, Ian Blumenthal, Michael Talkowski, James F. Gusella, David S. Howland, Marian DiFiglia, Jan Motlik (2016)

*Neurodegenerative Diseases*, 16(3–4), 245–259. <https://doi.org/10.1159/000443665>

IF (2016) 2,842

V tejto publikácii poukazujeme na patológiu TgHD semenníkov kancov v dôsledku prítomnosti mutovaného proteínu huntingtínu. Aj keď mtHtt spôsobuje predovšetkým degeneráciu neurónov, môže ovplyvňovať aj periférne tkanivá. U F1 generácie našich TgHD kancov sa ako prvý fenotyp prejavil práve rozvoj testikulárnej degenerácie – a to hlavne ako poruchy v reprodukcii. Prvýkrát bol pozorovaný vo veku 13 mesiacov kancov (Baxa et al., 2013). Môže to byť spôsobené práve tým, že semenníky majú najviac podobnú génovú expresiu ako mozog a táto podobná expresia môže spôsobiť atrofiu semenníkov, ktorá bola taktiež pozorovaná u transgénnych modeloch HCH myší.

Cieľom publikácie bolo sledovanie reprodukčných parametrov TgHD kancov v porovnaní s ich WT súrodencami. Na testovanie sme použili najstarších kancov z F1 a F2 generácie (rok narodenia 2009-2011). Zamerali sme sa na patológiu spermií a semenníkov. Prvotnou úlohou bolo zistiť, či inzert lentivírusového konštruktu neporušil žiadne kódujúce sekvencie v genóme prasaťa. Potom sme sa zamerali na poruchu reprodukcie. Počet spermií v ejakuláte, progresivitu a motilitu spermií sme detegovali pomocou SCA analyzátora (Sperm Cell Analyzer). Tam sme dokázali, že TgHD kanci majú znížený počet spermií, zníženú progresivitu a motilitu. Pri penetračných testoch sme zistili zníženú schopnosť penetrovat' do oocyty *in vitro* u spermií TgHD kancov. Všetky parametre sa s pribúdajúcim vekom zhoršovali. Pomocou elektrónovej mikroskopie boli detegované mnohé patologické zmeny bičíkov (deformácia mitochondriálneho plášťa bičíka a krčka spermie, zvinuté bičíky, dvojité axonéma) a tiež epitelu semenníkov (Sertoliho bunky boli apoptotické, čo sa prejavilo

zvýšenou denzitou cytoplazmy, jej vakualizáciou). Okrem toho imunohistochemické vyšetrenie potvrdilo signifikantne nižšiu proliferáciu spermatogónií v semenníkoch TgHD kancov. V štúdií sme poskytli dôkaz degenerácie spermií a testikulárnej dysfunkcie na modeli transgénneho miniprasaťa pre HCH. Boli detegované fragmenty mtHtt, ktoré indukujú cytotoxicitu. V spermiách bol exprimovaný endogénny aj mutovaný huntingtín.

Touto štúdiou sme preukázali poškodenie spermií TgHD kancov a rozsiahlu testikulárnu degeneráciu na modeli TgHD miniprasaťa. Dokázali sme, že inzercia lentivírusového konštruktu neporušila žiadnu kódujúcu sekvenciu v genóme prasaťa. Štúdia naznačila, že testikulárny defekt bol spôsobený prítomnosťou mtHtt a jeho fragmentovanej cytotoxickéj formy v testikulárnom tkanive, pretože sme nezaznamenali hormonálne zmeny, ktoré sme merali u TgHD zvierat aj u ich zdravých súrodencov.

#### **4.2. <sup>31</sup>P MR spektroskopia semenníkov a imunohistochemická analýza spermií transgénnych kancov realizovaná pre N koncovú časť ľudského mutovaného huntingtínu**

*<sup>31</sup>P MR Spectroscopy of the Testes and Immunohistochemical Analysis of Sperm of Transgenic Boars Carried N terminal Part of Human Mutated Huntingtin*

M. Jozefovicova, V. Herynek, F. Jiru, M. Dezortova, J. Juhásová, S. Juhas, J. Klíma, **B. Bohuslavova**, J. Motlik, M. Hájek

Článok: *Cesk Slov Neurol N* 2015; 78/111(Supplementum 2): 28-33 DOI: 10.14735/amcsnn20152S28

IF (2015) 0,209

Cieľom tejto štúdie bolo preukázať zmeny v semenníkoch 24 mesačných TgHD kancov F2 generácie pomocou <sup>31</sup>P magnetickej rezonančnej spektroskopie a pomocou imunohistochemickej analýzy TgHD spermií odobraných z F1 a F3 generácie pred prejavom sa klinických príznakov HCH.

<sup>31</sup>P MR spektroskopia je neinvazívna metóda, ktorú možno použiť na monitorovanie metabolických zmien v rôznych typoch tkanív (mozog, pečeň, sval, semenníky). *In vivo* <sup>31</sup>P MR spektrum zo semenníkov obsahuje sedem charakteristických píkoch pochádzajúcich

z fosfomonoesterov (PME), fosfodiesterov (PDE), adenosíntriphosfátov ( tri píky predstavujú tri fosfáty – ATP -  $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ ), anorganického fosfátu (Pi) a fosfokreatínu (PCr). Fosfokreatín nie je prítomný v semenníku, ale je ako zvyšok po kontaminácii zo svalu.

Na  $^{31}\text{P}$  MR spektroskopiu bolo použitých 5 TgHD kancov a 5 WT súrodencov z F2 generácie vo veku 2 rokov. Na študovanie spermií pomocou imunohistochemickej analýzy boli použité spermie z 1TgHD a 1WT zvierat'a z F1 generácie vo veku 4 -5 rokov, a z 1 TgHD a 1 WT kanca z F3 generácie vo veku 2 rokov.

Pomocou  $^{31}\text{P}$  MR spektroskopie sme zistili výrazné zníženie pomeru PDE /  $\gamma$ -ATP ( $p = 0,022$ ) u TgHD kancov v porovnaní s WT súrodencami a žiaden rozdiel v koncentrácii PME a Pi.

#### Imunohistochemické pokusy

Ejakulované spermie kancov boli farbené anti –polyQ protilátkou 3B5H10. U transgénnych spermií z F1 a F3 generácie bol detegovaný fluorescenčný signál pozdĺž celého bičika spermie, zatiaľ čo u WT súrodencov tento signál nebol pozorovaný. Protilátka EPR5526 proti N-koncovej časti proteínu huntingtínu vykazovala bodkované farbenie v bičíkoch oboch genotypov, avšak fluorescenčný signál bol silnejší u spermií TgHD kancov a vykazoval štatistickú významnosť.

Aj keď náš model miniprasat'a pre Huntingtonovu chorobu zatiaľ neprejavuje typické klinické príznaky ako nekontrolované pohyby svalov alebo stratu hmotnosti, tak sa prejavil u tohto modelu výrazný problém s plodnosťou TgHD kancov. Prvotné zmeny v počte spermií, motilite a progresivite sme opísali v publikácii *Mutated huntingtin causes testicular pathology in transgenic minipig boars*. Publikáciou  *$^{31}\text{P}$  MR Spectroscopy of the Testes and Immunohistochemical Analysis of Sperm of Transgenic Boars Carried N terminal Part of Human Mutated Huntingtin* sme potvrdili ďalšie zmeny na reprodukčnom aparáte TgHD miniprasat'a.  $^{31}\text{P}$  MR spektrometria je neinvazívna technika, ktorá môže byť použitá na monitorovanie funkcie semenníkov a dôležité je, že tento článok predstavuje prvú  $^{31}\text{P}$  MR spektroskopiu použitú na modely veľkého zvierat'a pre HCH. Na základe vyšetrenia magnetickou rezonanciou bolo zistené signifikantné zníženie relatívnej koncentrácie fosfodiesterov v testikulárnom parenchýme TgHD kancov v porovnaní s netransgénymi jedincami rovnakej vekovej kategórie. Taktiež imunohistochemická analýza spermií odhalila výrazné anti-polyQ špecifické (3B5H10) farbenie, ako aj signifikantné zvýšenie anti-huntingín farbenie (EPR5526) v bičíkoch TgHD spermií v porovnaní s netransgénymi spermiami. Na základe týchto výsledkov môžeme usudzovať, že ľudský mutovaný huntingtín

má negatívny vplyv na metabolizmus semenníkov a spôsobuje zvýšený výskyt abnormálnych spermíí.

#### **4.3. Mitochondriálny metabolizmus na veľkom zvieracom modeli pre Huntingtonovu chorobu: hľadanie biomarkerov v spermíách presymptomatických miniprasiat** **Biomarkery mitochondriálneho metabolizmu v spermíách TgHD kancov** ...

*Mitochondrial Metabolism in Large-Animal Model of Huntington's Disease: The Hunt for Biomarkers in the Spermatozoa of Presymptomatic Minipigs*

*Running title: Mitochondrial metabolism biomarkers in TgHD boar spermatozoa...*

Jana Krizova, Hana Stufkova, Marie Rodinova, Monika Macakova, **Bozena Bohuslavova**,

Daniela Vidinska, Jiri Klima, Zdenka Ellederova, Antonin Pavlok, David S. Howland, Jiri Zeman, Jan Motlik and Hana Hansikova

*Neuro-Degenerative Diseases*, 17(4–5), 213–226. <https://doi.org/10.1159/000475467>

IF (2017) 2,842

Cieľom štúdie bolo optimalizovať metódy merania mitochondriálneho metabolizmu v spermíách a stanoviť možné biomarkery HCH v spermíách TgHD kancov, ktoré exprimujú N-terminálnu časť mutovaného ľudského huntingtínu. V priebehu štúdie sa opakovane odoberali vzorky 12 TgHD a 12 WT kancov vo veku 12-65 mesiacov. Respiračné parametre mitochondrií boli merané polarografiou, mitochondriálny metabolizmus bol hodnotený detekciou oxidácie rádioaktívne značených substrátov (MEGS) a obsah oxidačných fosforylačných systémových podjednotiek bol detegovaný Western blotom. Štatisticky boli vyhodnotené tri možné faktory, ovplyvňujúce výsledky a to účinok HCH, filiálna generácia a starnutie.

Keďže existuje prebiehajúca diskusia o tom či sa metabolizmus spermíí spolieha na energiu s OXPHOS alebo z glykolýzy, eventuálne oboje v štúdií sme sa zamerali na vybrané parametre mitochondriálneho metabolizmu. Glykolýza sa javí ako kľúčová pre motilitu spermíí (Mukai & Okuno, 2004). Avšak kapacitácia, ktorá je dôležitá pre penetráciu cez zónu pellucidu je charakterizovaná hyperaktívnou pohyblivosťou spôsobenou zvýšenou amplitúdou flagelárnych úderov a vyššou produkciou ATP, ktorú vedie oxidatívna fosforylácia

(OXPHOS) v mitochondriách (Stendardi et al., 2011). V prvom rade sme zistili, že polyQ signál mtHtt je lokalizovaný pozdĺž celého bičíka (Macakova et al., 2016). Keďže signál bol viditeľný aj v strednom oddieli bičíka, ktorý je bohatý na mitochondrie, to naznačilo že by mohla nastať priama interakcia mtHtt s mitochondriou. Po optimalizácii meraní mitochondriálneho metabolizmu sa štúdia zamerala na identifikáciu biomarkerov MM Huntingtonovej choroby v spermiiach TgHD kancov. Pri meraní MEGS (mitochondriálny systém generujúci energiu) sme sa zamerali na štatistickú analýzu 3 možných rušivých faktorov a to účinkov samotnej HCH, filiálnu generáciu a starnutie. Analýza odhalila rozdiely medzi TgHD a WT. Z celkového počtu 36 meraných parametrov 8 súviselo s odlišnou filiálnou generáciou. Tieto parametre boli taktiež ovplyvnené starnutím. Inkubácia 2 ([1-14C] pyruvát + karnitín + ADP) bola znížená u zvierat TgHD a tiež bola významne ovplyvnená vekom a filiálnou generáciou zvierat. Inkubácie 4 ([1-14C] pyruvát + ADP) a 6 ([U14C] malát + pyruvát + malonát + ADP), pomer 6 / CS a dýchanie závislé od komplexu I po GMDc-rot (glutamát + malát + ADP + cytochróm c) boli významne znížené u zvierat TgHD. SDS-PAGE imunoblotty vybraných podjednotiek OXPHOS a PDHc (pyruvát dehydrogenázový komplex) v spermiiach získaných vo veku 47 mesiacov nepreukázali významné poruchy obsahu podjednotky PDHc. V spermiiach oboch jedincov TgHD sa zistil len mierne znížený obsah podjednotky SDHA (sukcinát dehydrogenáza A) (SDH70 komplexu II) a akonitázy 2. V prípade SDHA sme pozorovali zníženie množstva podjednotky s vekom u TgHD. Pri porovnaní spermii od tých istých kancov vo veku 14 a 47 mesiacov dosiahlo toto množstvo približne 50% vekovej kontroly. Hoci iba podiely SDHA podjednotky boli nižšie pri Western blotoch, histochemický test odhalil mierny nepomer v aktivitách komplexov OXPHOS medzi vzorkami. Už vo veku 14 mesiacov boli aktivity komplexov II a IV nižšie, zatiaľ čo aktivity komplexov I a V boli vyššie u TgHD v porovnaní s spermiami WT.

V tejto štúdii sme analyzovali mitochondriálny metabolizmus (MM) spermii od TgHD kancov miniprasiat nesúcich N-terminálnu časť ľudského mtHtt génu na chromozóme 1. Zmeny v MM môžu byť dôležitým biomarkerom HCH. Na štúdium boli použité metódy, ktoré sa široko uplatňujú v molekulárnej diagnostike mitochondriálnych porúch. To môže pomôcť objasniť etiopatogézu HCH u TgHD miniprasiat a prehĺbiť vedomosti potrebné pre testovanie nových liekov. V priebehu longitudinálnej štúdie sme identifikovali štyri biomarkery, ktoré naznačujú nešpecifickú patológiu v komplexe I oxidačného fosforylačného systému a v glykolytickom metabolizme, ktorá môže byť prepojená s toxickou funkciou malých fragmentov mtHtt, ktoré sú prítomné v mozgu a semenníkoch u TgHD.

## 5. DISKUSIA

Mnoho vedeckých tímov na celom svete sa zaoberá vynájdением účinnej liečby na zatiaľ nevyliciteľné choroby. Na tieto výskumy sa vynakladajú veľké finančné prostriedky. Pre vynájdение účinnej terapie je potrebné poznať príčinu choroby, ale taktiež poznať fenotyp choroby. Na dôkladné preštudovanie fenotypu sú vytvorené animálne modely chorôb. Tieto modely môžu byť genetické, pri ktorých je vnesený mutovaný gén ochorenia do zvierat'a, alebo negenetické, pri ktorých sa podávajú chemické látky na vyvolanie príznakov ochorenia.

Vo svojej práci sa venujem preštudovaniu fenotypu Huntingtonovej choroby zameraného na testikulárnu degeneráciu. Na štúdium bol použitý model transgénneho miniprasat'a pre HCH (TgHD), ktorý bol vytvorený v roku 2009 pod vedením prof. Motlíka na AV ČR v Liběchove.

Prvým špecifickým cieľom bolo popísať funkčné a štrukturálne zmeny spermií u TgHD kancov. Potvrdili sme expresiu mtHtt v bičíku spermie a v semenníkoch, čo by poukazovalo aj na poznatok že najväčšia expresia proteínu Htt prebieha v mozgu a semenníkoch (Li et al., 1993), a že rozsah expresie v semenníkoch je porovnateľný s expresiou v mozgu (Guo et al., 2003). Sledujeme znížený počet spermií, zníženu progresivitu a motilitu spermií a nedostatočnú penetračnú schopnosť TgHD spermií oproti WT súrodencov. Rozdielne hodnoty týchto parametrov sa začali prejavovať vo veku 13 mesiacov a postupom času sa rozdiely prehľbovali. Tieto zmeny taktiež pozoroval Van Raamsdonk u ľudských pacientov, u ktorých bolo robené vyšetrenie reprodukčného aparátu (Van Raamsdonk et al., 2007). Navyše analýza EM odhalila deformáciu mitochondriálneho plášťa v chvostovej časti tkaniva spermií TgHD. Zaznamenali sa tiež zvinuté chvosty a dvojité alebo trojité axonémy. To môže byť spôsobené poruchou rozdelenia prebytku cytoplazmy, čo vedie k prítomnosti cytoplazmatických kvapôčok. Tento jav, spolu s dysfunkciou motility spermií, môže súvisieť so znížením mitochondriálneho energetického metabolizmu a funkčného poškodenia komplexu II respiračného reťazca. Občas sa deformácia jadra spája s neúplnou kondenzáciou chromatinu a abnormálny akrozóm sa vyskytol u TgHD spermií, ale nie u WT kontrol. Tieto abnormality boli výraznejšie u F2 generácie. Navyše takmer všetky spermie od TgHD zvierat z F2 generácie obsahovali cytoplazmatické kvapôčky. Zaznamenaná testikulárna degenerácia je v súlade s pozorovaním u myší (R6 / 2 a Yac72) (Leavitt et al., 2001; Sathasivam et al., 1999). U niektorých TgHD kancov je pozorovaná atrofia semenníkov, čo pozorovala Papalexí na

myších modeloch HCH (Papalexí et al., 2005; Van Raamsdonk et al., 2005, 2007). Predchádzajúce štúdie na modeloch HCH hlodavcov ukázali samčiu sterilitu, o ktorej sa predpokladalo, že je dôsledkom zníženia počtu spermíí (Sathasivam et al., 1999). Tento fenotyp sme potvrdili vo veľkom zvieracom TgHD miniprasaťa. V histologických vzorkách semenníkov pozorujeme zmenšenie spermatogónii a rozšírenie endoplazmatického retikula. Zníženie počtu vyvíjajúcich sa spermiocytov a spermatíd bolo tiež pozorované u pacientov s HCH (Van Raamsdonk et al., 2007) a YAC128 myší (Van Raamsdonk et al., 2005). Taktiež sme skontrolovali, či vloženie lentivírusového konštruktu neprerušilo žiadnu kódujúcu sekvenciu v genóme ošípaných. Pretože výsledok bol negatívny, otázka bola, či patológia v semenníkoch bola spôsobená mtHtt alebo v dôsledku zmenených hladín hormónov súvisiacich s plodnosťou. Hoci je testikulárna degenerácia v HCH dobre opísaná v modeloch myší (R6 / 2 a YAC128), nie je jasné, či je tento fenotyp nezávislý alebo je dôsledkom zmien hypotalamo-hypofyzárne-gonádovej osi (GnRH). Papalexí opísala významnú stratu neurónov s výrazným znížením GnRH R6/2 myší počnúc vekom 5 týždňov. Po tomto znížení GnRH nasledovalo zníženie hladín testosterónu v plazme vo veku 12 týždňov (Papalexí et al., 2005). Zatiaľ čo atrofia semenníkov bez súbežnej straty GnRH neurónov bola opísaná v modeli myší YAC128 (Van Raamsdonk et al., 2007). Analýza hladín testosterónu u myší YAC128 neodhalila žiadny významný rozdiel v porovnaní s kontrolami, dokonca aj keď už bola prítomná testikulárna atrofia (Van Raamsdonk et al., 2007). Okrem toho Papalexí pri podávaní testosterónu nepozorovala žiadny vplyv na zlepšenie fenotypu HCH pozorovaného u myší R6 / 2, ktoré mali znížený GnRH (Papalexí et al., 2005). Analýza úplného neuroendokrinného statusu u pacientov s HCH meraná Saleh a koloktívom nemala žiadny významný rozdiel v hladinách LH, FSH a testosterónu v plazme medzi všetkými mužskými HCH pacientmi a kontrolami (Saleh et al., 2009). Avšak Markianos pozoroval signifikantne nižšie hladiny testosterónu a LH u pacientov s HCH v porovnaní so zdravými kontrolami (Markianos et al., 2005). Tieto protichodné výsledky sú podobné výsledkom hormonálnej analýzy u nášeho modelu TgHD prasaťa. Nepozorovali sme žiadne významné rozdiely v hladinách hormónov súvisiacich s plodnosťou medzi TgHD a kontrolnými kancami a počas pravidelného odberu spermy neboli pozorované žiadne zmeny libida. Existuje dôkaz, že expresia mutantného Htt vedie k selektívnej bunkovej dysfunkcii a degenerácii (Bhide et al., 1996). Najviac ovplyvnené bunky sú neuróny. Poskytli sme však aj údaje o degenerácii spermíí a testikulárnej dysfunkcii v TgHD modely.

Druhým špecifickým cieľom bolo preštudovanie metabolických porúch v semenníkoch TgHD kancov u F2generácie pomocou  $^{31}\text{P}$  MR spektroskopie. Pretože biopsia je invazívna a môže spôsobiť ďalšie poškodenie spermatogenézy (van der Grond, Laven, Lock, te Velde, & Mali, 1991) tak sme použili  $^{31}\text{P}$  MR spektrometriu. Ide o neinvazívnu techniku, ktorá sa môže použiť na monitorovanie funkcie semenníkov, ako je popísané v niekoľkých štúdiách (Srinivas et al., 2002; van der Grond et al., 1992; van der Grond, Van Pelt, et al., 1991; van der Grond, Laven, te Velde, & Mali, 1991). Predchádzajúce  $^{31}\text{P}$  MR spektrometrické štúdie na ľudských semenníkoch preukázali, že pomer PME / ATP je citlivejší parameter na monitorovanie funkcie semenníkov, t.j. rozlišovanie medzi normálnymi semenníkmi, oligozoospermou a azoospermou ako pomer PDE / ATP alebo Pi / ATP (van der Grond, 1995; van der Grond, Laven, te Velde, et al., 1991). U našich TgHD kancov sme však nezistili významnú zmenu pomeru PME / ATP. Ukázalo sa, že hlavne PDE vrchol pozostáva z glycerofosfocholínu (GPC) a menšieho množstva glycerofosfoetanolamín (GPE) (van der Grond et al., 1992). GPC je prítomný vo veľmi vysokých koncentráciách v semennej plazme a bola zistená pozitívna korelácia medzi koncentráciou GPC a motilitou spermií (Hinton & Setchell, 1980; van der Grond et al., 1992). Preto si myslíme, že znížená hladina pomeru PDE /  $\gamma$ -ATP u TgHD kancov by mohla súvisieť so zníženým množstvom semennej plazmy alebo so zmenami v motilite spermií. Podobné zníženie pomeru PDE / ATP testikulárnych fosfodiesterov (PDE) ( $p < 0,05$ ), ako sme pozorovali u našich TgHD kancov bolo pozorované v štúdiu potkanov, ktoré mali počas 10 týždňov podávaný etanol v kvapalnej diéte (Farghali, Williams, Gavalier, & Van Thiel, 1991)

Tretím cieľom bolo preštudovanie mitochondriálnej dysfunkcie spermií kancov miniprasiat transgénnych pre HCH. Keďže v predchádzajúcich štúdiách sme preukázali, že TgHD spermie sú síce schopné naviazať sa na zonu pellucidu, ale majú zníženú schopnosť penetrovať oocyt, čo potom vedie k poklesu plodnosti. Rozhodli sme sa pokúsiť objasniť či je táto patológia spojená s akoukoľvek metabolickou poruchou. Zamerali sme sa na podrobnú analýzu mitochondriálneho metabolizmu (MM) TgHD spermií. Zmeny v MM môžu byť dôležitým biomarkerom HCH (Oliveira et al., 2007). Použili sme metódy, ktoré sa široko uplatňujú v molekulárnej diagnostike mitochondriálnych porúch. Najprv sme dokázali, že mtHtt je prítomný v spermiách a že môže byť v priamom vzájomnom pôsobení so svojimi mitochondriami. Pri zameraní sa na vplyv generačného štádia bolo iba 8 z 36 parametrov v analýze ovplyvnených generáciou, ku ktorej patrili zvieratá. Účinok HCH bol preukázaný významným znížením niektorých parametrov kapacity MEGS a dýchania u TgHD kancov.



Taktiež vplyv HCH poukázal na päť parametrov užitočných pri monitorovaní progresie HCH a potenciálnych biomarkerov MM HCH u transgénnych kancov (MEGS inkubácie ([ 1-14C] pyruvát + karnitín + ADP), ([14C] pyruvát + ADP), 6 (U14C) malát + pyruvát + malonát + ADP), pomer 6 / CS a dýchanie závislé od komplexu I. Inkubácie, ktoré obsahovali pyruvát, boli znížené, čo vedie k podozreniu, že defekt je spojený s nedostatkom pyruvát dehydrogenázy alebo komplexu I. Na druhej strane zvýšená citlivosť na inhibíciu dýchania závislej od komplexu I bola preukázaná v kostrovom svale myši R6 / 2 (Gizatullina et al., 2006). Pretože inkubácie obsahujúce pyruvát sú významne znížené bez ohľadu na prítomnosť L karnitínu v reakcii, môžeme predpokladať, že metabolický defekt je skôr nezávislý od rýchlosti  $\beta$ -oxidácie mastných kyselín (Brass & Hoppel, 1980). Zistili sme len mierny pokles SDH prostredníctvom histochemického farbenia. Predpokladáme, že pozorovaný úbytok obsahu podjednotky SDH a akonitázy je skorá odozva na oxidačný stres pravdepodobne ešte kompenzovaná neznámym mechanizmom počas predsypomatického štádia HCH. Náš komplexný biochemický prístup k štúdiu spermii TgHD kancov naznačuje možnosť, že malé toxické fragmenty mtHtt môžu interagovať s bunkovým metabolizmom, aby významne zmenili MM spermii a že mitochondriálna dysfunkcia môže spôsobiť narušenú penetračnú aktivitu spermii, prvý predklinický marker HCH u kancov TgHD.

Touto štúdiou sme dokázali, že model TgHD miniprasaťa je vhodným modelom pre štúdium fenotypu HCH.

## 6. ZÁVER

Študovanie fenotypu u modelov transgénnych zvierat je veľmi dôležité na pochopenie princípov progresie ochorenia a skúšania nových terapeutických princípov na zabránenie ďalšej progresie ochorenia a dáva nádej na vynájdenie liečby vedúcej k úplnému vyliečeniu. Tieto štúdie sú hlavne potrebné u tých ochorení, u ktorých doteraz nie je dostupná žiadna liečba .

Dizertačná práca bola zameraná na štúdium fenotypu pohlavného aparátu TgHD kanca s N-terminálnym koncom pre ľudský mutovaný huntingtín. U nášho modelu doteraz neboli pozorované typické prejavy fenotypu ako mimovoľné pohyby, nekoordinovaná chôdza, ale boli pozorované problémy v reprodukcii. Pri pravidelnom pripúšťaní TgHD kancami sme začali pozorovať, že prasnice nezostávali gravidné. Okrem toho sme začali pozorovať aj iné reprodukčné problémy kancov už vo veku 13 mesiacov (Baxa et al., 2013). Preto sme sa rozhodli dôkladne preštudovať fenotyp reprodukčného aparátu TgHD kancov. Nevedeli sme či to má súvis s HCH, tak sme sa to snažili dokázať.

Aj keď väčšina ľudských pacientov s HCH má potomkov, neznamená to, že by nemali problémy s reprodukciou. Väčšina z nich splodí potomkov pred vypuknutím prvých príznakov bez toho, aby vedeli že túto chorobu majú. Problémy s reprodukciou sa prejavujú až v neskorších štádiách choroby, keď už väčšina mužov nežije aktívnym sexuálnym životom. Náš model miniprasaťa pre HCH vykazuje značné reprodukčné problémy. Je výrazne znížený počet spermií TgHD kancov oproti WT súrodencov, ale okrem zníženia celkového počtu spermií je taktiež výrazne znížená progresivita a motilita. Znížená schopnosť penetrovať oocyt spermiovou je najskôr spôsobená poškodením metabolizmom mitochondrií (MM), čím spermie majú nedostatok energie. Poškodenie MM má najskôr súvisí s mtHtt, ktorý bol dokázaný, že sa vyskytuje aj v strednom oddieli bičíka, ktorý je bohatý na mitochondrie. Predpokladá sa vzájomné pôsobenie.

Keďže HCH stále patrí k nevyliečiteľným chorobám, a príznaky choroby sa len utlmujú, ale nelieči sa príčina choroby, ktorá je v dnešnej dobe už známa, vedci na celom svete sa snažia prísť na účinnú liečbu, ktorá by sa mohla použiť na klinickú liečbu. K vynájdeniu liečby, je potrebné dokonalé preštudovanie fenotypu HCH. Touto prácou sme popísali biomarkery HCH, pomocou ktorých by sa dala určiť efektívnosť liečby.

## 1. INTRODUCTION

Before Huntington's disease (HD) was named after George Huntington (Huntington, 2003; Neylan, 2003), the name "dance mania" had been used for this disease since the 14th century. It is an autosomal dominant heritable disease, with neurodegenerative signs and progressive course. In most cases, it occurs in adulthood. There are only about 5% of childhood cases (Roth, 2010). Typical symptoms are choreatic movements and decreased mental abilities. The course is progressive with a fatal end. In 1983, a polymorphic DNA marker, located on human chromosome 4, signaling HD, was identified (James F. Gusella et al., 1983). In 1993, a single causal gene mutation is responsible for HD, was discovered (J F Gusella et al., 1997).

The highest expression of Htt protein is in the brain and the testis (Li et al., 1993). The extent of expression in testis is comparable to expression in the brain (Guo et al., 2003). In mouse models of HD, testis atrophy, seed formation damage, and reduced germ cell counts are observed (Papalexi et al., 2005; Van Raamsdonk et al., 2005, 2007). Markianos in his study also found a decreased concentration of testosterone hormone (Markianos et al., 2005). On the other hand, Saleh did not show significant changes in testosterone concentrations between HD patients and healthy controls (Saleh et al., 2009).

Nowadays, there is no treatment available to slow down and stop disease progression. Only drugs are used to temporarily relieving clinical signs (Ross & Tabrizi, 2011). To develop the right treatment for people with HD, it is necessary to understand not only the manifestation of the disease but also the mechanisms that cause it. In order to study these mechanisms, it is necessary to create animal models that will have a phenotype corresponding to HD. We created a model of transgenic minipigs for Huntington's disease at our Institute of animal physiology and genetics (IAPG) in Liběchov in 2009 (Baxa et al., 2013). The pig has similar size of organs and physiology as human, therefore this model could be suitable for testing new therapeutic approaches – such as gene therapy.

By gene therapy, we call the treatment procedure whereby a DNA sequence is inserted into the genome of a patient, which encodes a missing or non-functioning protein, or it can suppress a mutant protein. Antisense oligonucleotides (ASOs), and RNA interference are most commonly used for gene therapy at the moment.

## **2. AIMS**

The aim of the dissertation thesis was to describe the phenotype of the transgenic minipigs with HD.

1. The first aim of the dissertation was to describe the functional and structural changes of sperm of TgHD minipigs and their WT siblings.
2. The second aim of the dissertation was to study the metabolic changes in the testes in the F2 generation of TgHD minipigs using  $^{31}\text{P}$  MRI spectroscopy.
3. A third aim was to study the mitochondrial dysfunction of the TgHD minipigs sperm.

### **3. MATERIAL AND METHODS**

Used model: TgHD minipigs

To study the phenotype Huntington's disease, we used the Huntington transgenic minipig model that was developed in our laboratory in 2009. (Baxa et al., 2013) This large animal model is suitable for a disease study. Our minipigs carry the N-terminal fragment of the human mutant huntingtin with 124 CAG / CAA repeats.

All experiments were performed with the compliance of the welfare provisions with the consent of the State Veterinary Administration of the Czech Republic.

#### **Study of structural and reproductive changes in TgHD sperms and their siblings**

Sperm count, motility, progression, sperm survival test, penetration test, immunocytochemical experiments, Western blot (Macakova et al., 2016)

#### **Study using <sup>31</sup>P MRI spectroscopy**

<sup>31</sup>P MRI spectroscopy (Jozefovicova et al., 2016)

#### **Study of mitochondrial sperm dysfunction of TgHD boars**

Immunocytochemical experiments, measurement of MEGS activity, SDS-PAGE, respirometry (Krizova et al., 2017)

## 4. RESULTS

### 4.1. Mutated huntingtin causes testicular pathology in transgenic minipig boars

Monika Macakova, **Bozena Bohuslavova**, Petra Vochozkova, Antonin Pavlok, Miroslava Sedlackova, Daniela Vidinska, Klara Vochyanova, Irena Liskova, Ivona Valekova, Monika Baxa, Zdenka Ellederova, Jiri Klima, Stefan Juhas, Jana Juhasova, Jana Klouckova, Martin Haluzik, Jiri Klempir, Hana Hansikova, Jana Spacilova, Ryan Collins, Ian Blumenthal, Michael Talkowski, James F. Gusella, David S. Howland, Marian DiFiglia, Jan Motlik (2016)

*Neurodegenerative Diseases*, 16(3–4), 245–259. <https://doi.org/10.1159/000443665>

IF (2016) 2,842

In this publication, we described the pathology of TgHD boar testes due to the presence of the mutant huntingtin. Although mtHtt primarily causes degeneration of neurons, it can also affect peripheral tissues. In the F1 generation of our TgHD boars, the development of testicular degeneration has been the first phenotype discovered. It was first observed at the age of 13 months in boars (Baxa et al., 2013). This may be due to the fact that the testes have the most similar genes expression to the brain. Testicular atrophy, which was also observed in transgenic mice models of HD, was detected, too.

The aim of the publication was to monitor the reproductive parameters of TgHD boars compared to their WT siblings. For testing, we used the oldest F1 and F2 generation boars (2009-2011). We focused on sperm and testicular pathology. The primary task was to find out whether the lentiviral construct insert did not break any coding sequences in the pig genome. Furthermore, we focused on reproductive failure. The number of sperm in the ejaculate, progressivity and sperm motility were detected using the SCA analyzer (Sperm Cell Analyzer). We have shown that TgHD boars have decreased sperm counts, decreased progressivity and motility. We found reduced ability of TgHD sperms to penetrate oocytes in vitro by penetration tests. In addition, immunohistochemistry confirmed a significantly lower proliferative activity of spermatogonial sperm in TgHD. All parameters worsened with age. Many pathological changes of flagella were detected using electron microscopy. Deformation of mitochondrial sheath and sperm neck, cochlear flares, double axonemas was detected. Also epithelium of testes showed pathological changes. Sertoli cells were apoptotic, resulting in increased density of cytoplasm and its vacuolization. In the study, we provided evidence of sperm degeneration and testicular dysfunction on the model of transgenic minipigs for HD.

Low molecular fragments of mtHtt that induce causing cytotoxicity were detected. Both endogenous and mutant huntingtins were expressed in sperm. The age of onset of disease depends on the number of CAG repeats. This onset may also affect the polymorphisms of proteins interacting with Htt. We assume that these polymorphisms can contribute to various degrees of testicular degeneration in TgHD boars of the same age. In this study we have shown TgHD sperm injury and extensive testicular degeneration on the TgHD mini-tract model. We showed that insertion of the lentiviral construct did not break any coding sequence in the pig genome. We indicated that the testicular defect was due to the presence of mtHtt and its fragmented cytotoxic form in testicular tissue, because we did not detect any hormonal changes in TgHD animals and their healthy siblings.

#### **4.2. <sup>31</sup>P MR Spectroscopy of the Testes and Immunohistochemical Analysis of Sperm of Transgenic Boars Carried N terminal Part of Human Mutated Huntingtin**

M. Jozefovicova, V. Herynek, F. Jiru, M. Dezortova, J. Juhásová, S. Juhas, J. Klíma, B. Bohuslavova, J. Motlik, M. Hájek

Article: Cesk Slov Neurol N 2015; 78/111(Supplementum 2): 28-33 DOI: 10.14735/amcsnn20152S28

IF (2015) 0,209

The aim of this study was to demonstrate changes in the testes of the 24-month old TgHD of F2 generation using <sup>31</sup>P magnetic resonance spectroscopy and immunohistochemical analysis of the TgHD sperm collected from the F1 and F3 generation prior to the clinical signs of HD.

<sup>31</sup>P MR spectroscopy is a non-invasive method that can be used to monitor metabolic changes in various types of tissues (brain, liver, muscle, testes). The *in vivo* <sup>31</sup>PMR spectrum contains seven characteristic peaks derived from phosphomonoesters (PMEs), phosphodiesteres (PDEs), adenosine triphosphates (three peaks represent three phosphates - ATP -  $\alpha$ , -  $\beta$ , -  $\gamma$ ), inorganic phosphate (Pi) and phosphocreatine). Phosphocreatine is not present in the testes, but is like the rest after contamination from the muscle.

For <sup>31</sup>P MR spectroscopy we used 5 TgHD boars and 5 WT siblings from F2 generation at the age of two years.

We found a significant decrease in the PDE /  $\gamma$ -ATP ratio ( $p = 0.022$ ) in TgHD boars compared to WT siblings and no difference in PME and Pi concentration.

Furthermore, immunohistochemical analysis of sperms from two years old (F3 generation) and four years old (F1 generation) siblings was performed.

Ejaculated sperm of the boars were stained with anti-poly Q antibody 3B5H10. In TgHD sperms a fluorescence signal was detected along the entire sperm flagella, whereas in WT siblings this signal was not observed. Htt antibody EPR5526 showed spotted staining in the flagella of both genotypes, but the fluorescence signal was stronger in TgHD sperms and showed statistical significance.

Although our model of Huntington's minipig does not exhibit typical clinical signs such as uncontrolled muscle movements or weight loss yet, this model has a significant problem with the fertility of TgHD boars. Initial changes in sperm count, motility and progressivity were described in our first manuscript "*Mutated huntingtin causes testicular pathology in transgenic minipig boars*". Our second manuscript "*<sup>31</sup>P MR Spectroscopy of the Testes and Immunohistochemical Analysis of the Sperms of the Transgenic Boars*", changes on the TgHD minipig reproduction apparatus. <sup>31</sup>P MR spectrometry is a non-invasive technique that can be used to monitor testicular function, and it is important that this manuscript represents the first <sup>31</sup>P MR spectroscopy used on large animal models of HD. On the basis of magnetic resonance examination, a significant decrease in the relative concentration of phosphodiesterases was found in the testicular parenchyma of TgHD in comparison with non-transgenic subjects of the same age category. Immunohistochemical analysis of sperm revealed marked anti-polyQ specific (3B5H10) staining as well as a significant increase in anti-hunting staining (EPR5526) in TgHD sperm as compared with non-transgenic sperm. Based on these results, we can conclude that human mtHtt has a negative effect on testicular metabolism and causes an increased incidence of abnormal sperm.

#### **4.3. Mitochondrial Metabolism in Large-Animal Model of Huntington's Disease: The Hunt for Biomarkers in the Spermatozoa of Presymptomatic Minipigs**

*Running title: Mitochondrial metabolism biomarkers in TgHD boar spermatozoa...*

Jana Krizova, Hana Stufkova, Marie Rodinova, Monika Macakova, **Bozena Bohuslavova**,

Daniela Vidinska, Jiri Klima, Zdenka Ellederova, Antonin Pavlok, David S. Howland, Jiri Zeman, Jan Motlik and Hana Hansikova

*Neuro-Degenerative Diseases*, 17(4–5), 213–226. <https://doi.org/10.1159/000475467>

IF (2017) 2,842



The aim of the study was to optimize methods for measuring mitochondrial metabolism in sperm and to determine the possible HD biomarkers in TgHD spermatozoa that express the N-terminal part of the mutant human huntingtin. During the study, samples of 12 TgHD and 12 WT of 12-65 month old were repeatedly sampled. Respiratory parameters of mitochondria was measured by polarography, mitochondrial metabolism was assessed by detecting the oxidation of radiolabelled substrates mitochondrial energy generating system (MEGS), and the content of oxidative phosphorylation system subunits was detected by Western blot. Three possible factors were statistically evaluated: the influencing effects of HD, filial generation and age of animals.

As there is an ongoing discussion about whether sperm metabolism relies on oxidative phosphorylation (OXPHOS) or glycolysis energy, possibly both, the studies were focused on selected parameters of mitochondrial metabolism. Glycolysis appears to be the key factor in to sperm motility (Mukai & Okuno, 2004). However, the capacitation that are important for zona pellucida penetration are characterized by hyperactivity due to the increased amplitude of flagellar strokes and higher production of ATP produced by OXPHOS in mitochondria (Stendardi et al., 2011). First of all, we found that the polyQ signal of mtHtt is located along flagella (Macakova et al., 2016). Since the signal was also visible in the middle section of the flagella, which is rich in mitochondria, it indicated that a direct interaction of mtHtt with the mitochondria could occur. After optimization of mitochondrial metabolism measurements, the study focused on the identification of MM biomarkers of HD in TgHD sperms. When measuring MEGS, we focused on the statistical analysis of 3 possible interfering factors, namely the effect of HD, filial generation and age of animal. The analysis revealed the differences between TgHD and WT. Of the total of 36 measured parameters 8, it was related to a different branch generation. These parameters were also affected by age. Incubation 2 ([1-14C] pyruvate + carnitine + ADP) was reduced in TgHD animals and was also significantly influenced by age and filial generation of the animal. Incubation 4 ([1-14C] pyruvate + ADP) Pyruvate + malonate + ADP), the ratio 6 / CS and complex dependent respiration to GMDc-rot (glutamate + malate + ADP + cytochrome c) were significantly reduced in TgHD animals. SDS-PAGE immunoblots of selected subunits of OXPHOS and PDHc (pyruvate dehydrogenase complex) in sperm obtained at age 47 months did not show significant PDHc subunit disorders. Only slightly reduced content of SDHA (succinate dehydrogenase A) (SDH70 complex II) and aconitase 2 subunit was found in the sperm of both TgHD subjects. In the case of SDHA, we observed a decrease in the amount of subunit

with the age in TgHD. When comparing sperms from the same boars at the age of 14 and 47 months, the amount of SDHA reached approximately 50% of the age matched control. Although only the shares of the SDHA subunit were lower in Western blots analysis, the histochemical assay revealed a slight disparity in the activities of OXPHOS complexes between the samples. Already at the age of 14 months, the activities of complexes II and IV were lower, whereas the activities of complexes I and V were higher in TgHD compared to WT sperms.

In this study, we analyzed the MM of sperm from TgHD minipigs boars carrying the N-terminal human mtHtt gene on chromosome 1. Changes in MM may be an important biomarker of HD. During the longitudinal study, we identified four biomarkers that indicate non-specific pathology in complex I of the oxidative phosphorylation system and glycolysis metabolism, which may be linked to the toxic function of small mtHtt fragments present in the brain and testis in TgHD. The biomarkers were measured by methods widely used in the molecular diagnosis of mitochondrial disorders and therefore could be easily used as biomarkers for HD treatment efficiency.

## 5. DISCUSSION

Many scientific teams around the world are engaged in the introduction of effective treatments for incurable diseases. Large funds are spent on this research. In order to introduce effective therapy, it is necessary to know the cause of the disease, but also the phenotype of the disease. Disease animal models are developed to thoroughly study the phenotype and test the potential treatment. These models may be genetic in which the mutated gene of the disease is introduced into the animal or non-genetic in which the chemicals are administered to induce symptoms of the disease.

In my work I followed the phenotype of Huntington's disease focused on testicular degeneration. I studied the TgHD minipigs, which were created in 2009 in Liběchov (Baxa et al., 2013).

The first specific goal was to describe functional and structural changes in sperms of TgHD boars. We have confirmed the expression of mtHtt in the sperm flagella and in testes. The expression was high, which is in agreement, that the highest expression of Htt occurs in the brain and the testes (Li et al., 1993). We monitored reduced sperm counts, decreased progressivity and sperm motility, and poor penetration ability of TgHD sperms compared to sperms from WT siblings. The defect of these parameters was first measured at the age of 13 months, worsening with the age. These changes were also observed in human HD patients who were screened for reproductive failure (Van Raamsdonk et al., 2007). In addition, EM analysis revealed the deformation of the mitochondrial mantle in the tail portion of the TgHD sperm. Folded or coiled tails and double or triple axonemes were observed. This may be due to a disturbance in the distribution of cytoplasm excess leading to the presence of cytoplasmic droplets. This phenomenon, along with dysfunction of sperm motility, may be associated with a reduction in mitochondrial energy metabolism and functional impairment of the respiratory chain II complex. We observe abnormal acrosome in TgHD sperms, but not in WT controls. These abnormalities were more pronounced in the F2 generation. In addition, almost all TgHD sperms from F2 generation contained cytoplasmic droplets. Observed testicular degeneration is consistent with the observation in R6 / 2 and HD mice (Leavitt et al., 2001; Sathasivam et al., 1999). Furthermore, testicular atrophy is observed in some TgHD boars, similar as in mouse models of HD (Papalexi et al., 2005; Van Raamsdonk et al., 2005, 2007). Previous studies on rodent models for HD showed male sterility (Sathasivam et al., 1999). We have confirmed this phenotype in a large animal model of HD, in minipigs. The

histology analysis of testes revealed a decrease in spermatogony and the enlargement of the endoplasmic reticulum. The reduction in the number of developing spermatocytes and spermatocytes was also observed in HD patients (Van Raamsdonk et al., 2007) and YAC128 mice (Van Raamsdonk et al., 2005). We also checked that the insertion of the lentiviral construct did not interrupt any coding sequence in the pig genome. Because the result was negative, the remain question was whether the pathology in the testis was caused by mtHtt or by the altered fertility hormone levels. Although testicular degeneration in HD is well described in mouse models (R6 / 2 and YAC128), it is not clear whether this phenotype is independent or is due to alterations of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis (GnRH). Significant loss of GnRH neurons starting at 5 weeks, followed by a decrease in plasma testosterone levels at 12 weeks of age, was found in R6 / 2 mice (Papalexi et al., 2005), while atrophy of testes without concurrent loss of GnRH neurons was described in YAC128 model (Van Raamsdonk et al., 2007). Analysis of testosterone levels in YAC128 mice revealed no significant difference compared to controls, even when testicular atrophy was present (Van Raamsdonk et al., 2007). Furthermore, treatment with testosterone had no effect on the peripheral HD phenotype, e.g. weight loss or motor function in R6 / 2 mice (Papalexi et al., 2005). The analysis of complete neuroendocrine status in HD patients by Saleh did not show a significant difference in plasma levels of LH, FSH and testosterone among all male HD patients and controls (Saleh et al., 2009). However, Markianos observed significantly lower levels of testosterone and LH in HD patients compared to healthy controls (Markianos et al., 2005). These conflicting results suggested a detailed hormonal analysis of our swine model. We did not notice any significant differences in fertility hormone levels between TgHD and control boars, and no changes in libido were observed during regular sperm sampling. There is an evidence that expression of mtHtt leads to selective cellular dysfunction and degeneration (Bhide et al., 1996). The most affected cells are neurons. However, we also provided data on sperm degeneration and testicular dysfunction in TgHD models.

A second specific goal was to study metabolic defects of TgHD pig testes using  $^{31}\text{P}$  MR spectroscopy. Because the biopsy is invasive and can cause further damage to spermatogenesis (van der Grond, Van Pelt, et al., 1991), we used  $^{31}\text{P}$  MR spectrometry. It is a non-invasive technique that can be used to monitor the function of the testes as described in several studies (Srinivas et al., 2002; van der Grond et al., 1992; van der Grond, Van Pelt, et al., 1991; van der Grond, Laven, Lock, et al., 1991). Previous  $^{31}\text{P}$  MR spectrometry studies in human testes have shown that the PME / ATP ratio is a more sensitive parameter to monitor

the function of the testes, differentiation between normal testes, oligospermia and azoospermia compared to PDE / ATP or Pi / ATP ratios (van der Grond, 1995; van der Grond, Laven, Lock, et al., 1991). However, our TgHD boars did not show a significant change in the PME / ATP ratio. It has been shown that the PDE peak mainly consists of glycerophosphocholine (GPC) and a lower amount of glycerophosphoranolamine (GPE) (van der Grond et al., 1992). GPC is present at very high concentrations in seminal plasma and a concentration correlates with sperm motility (Hinton & Setchell, 1980; van der Grond et al., 1992). Therefore, we believe that the reduced level of the PDE /  $\gamma$ -ATP ratio in TgHD boars could be related to a decreased amount of seminal plasma or changes in sperm mobility. A similar reduction in the PDE / ATP ratio of testicular phosphodiesterases (PDE) ( $p < 0.05$ ), as observed in our TgHD boars, was observed in a study of rats having ethanol in their liquid diet for 10 weeks (Farghali et al., 1991).

A third aim was to study the mitochondrial dysfunction of sperms from TgHD minipigs. Since in our previous studies showed that TgHD sperms are able to bind to the zona pellucida, but have a decreased ability to penetrate the oocyte, which then leads to a decrease in fertility, we decided to clarify whether this pathology is associated with mitochondria dysfunction. We focused on a detailed analysis of MM of TgHD sperms. Changes in MM may be an important biomarker for HD (Oliveira et al., 2007). We have used methods that are widely used in the molecular diagnosis of mitochondrial disorders. We first demonstrated that mtHtt is present in sperm and that it may directly interact with mitochondria. Focusing on the impact of the generation, only 8 out of the 36 parameters in the analysis were influenced by the generation to which the animals belonged. The effect of HD was demonstrated by a significant reduction in some parameters of MEGS capacity and sperm respiration in TgHD boars. We found five parameters, which might be useful for monitoring the progression of HD and potential MM HD biomarkers in transgenic boars: MEGS incubation ([1-<sup>14</sup>C] pyruvate + carnitine + ADP), ([<sup>14</sup>C] pyruvate + ADP), 6 U<sup>14</sup>C malate + pyruvate + malonate + ADP), 6 / CS ratio and I. complex-dependent respiration. Incubations containing pyruvate were reduced, suggesting that the defect was associated with a deficiency of pyruvate dehydrogenase or complex I. On the other hand, increased sensitivity to respiration-dependent inhibition of complex I was demonstrated in skeletal muscle of R6 / 2 mice (Gizatullina et al., 2006). Since incubations containing pyruvate are significantly reduced regardless of the presence of L carnitine in the reaction, we can assume that the metabolic defect is rather independent of the  $\beta$ -oxidation rate of fatty acids (Brass & Hoppel, 1980). We found only a slight decrease in SDH by

histochemical staining, we assume that the observed decrease in SDH subunit and aconitase content is an early response to oxidative stress probably still compensated by an unknown mechanism during the presymptomatic stage of HD. Our comprehensive biochemical approach to TgHD sperm study suggests that small toxic mtHtt fragments can interact with cellular metabolism to significantly alter sperm MM and that mitochondrial dysfunction may cause impaired penetration activity of sperm, the first preclinical marker of HD in TgHD boars.

This study demonstrated that the TgHD model is a suitable model for studying the HD phenotype. Also, for a similar physiology of pigs and humans, it is suitable as a model for testing preclinical HD treatment studies.

## 6. CONCLUSIONS

Studying the phenotype of transgenic animal models is very important in order to better understand the pathophysiology and to test new therapeutic approaches to prevent further progression of the disease and give hope for the introduction of treatment leading to complete cure. These studies are particularly needed in those diseases where no treatment is available so far.

The dissertation was focused on studying the reproductive phenotype of the TgHD boars with N-terminal part of human mutated huntingtin. Because in our model typical phenotypic manifestations as involuntary movements and uncoordinated walking haven't been observed, but reproductive failures have been observed. With the regular admission of TgHD boars, we began to notice that the sows did not remain pregnant. We observed reproductive problems of boars at the age of 13 months (Baxa et al., 2013). We investigated whether it is a HD related phenotype.

Although most human HD patients have children, this does not mean they have no reproductive problems. Most of them have children before the first signs emerge without knowing they have this disease. Our model of TgHD minipigs shows significant reproductive problems. There is a significant reduction in sperm count of TgHD boars compared to WT siblings; in addition the progressivity and motility are also significantly reduced. The reduced ability to penetrate the oocyte by sperm could be caused by mitochondrial (MM) metabolism damage, which cases the lack of energy for the sperm. mtHtt was showed to be located in the middle section of the flagella, which is rich in mitochondria.

Since HD still belongs to incurable diseases, and the symptoms of the disease are only diminishing, but not the cause of the disease that is now known, scientists around the world are trying to find effective treatments that could be used for clinical treatment. In order to introduce treatment, a complete study of the HD phenotype is needed. Thorough knowledge of the phenotype is the first step in introducing a successful treatment.

## 7. CITOVANÁ LITERATÚRA / REFERENCES

- Baxa, M., Hruska-Plochan, M., Juhas, S., Vodicka, P., Pavlok, A., Juhasova, J., ... Motlik, J. (2013). A transgenic minipig model of Huntington's Disease. *Journal of Huntington's Disease*, 2(1), 47–68. <https://doi.org/10.3233/JHD-130001>
- Bhide, P. G., Day, M., Sapp, E., Schwarz, C., Sheth, A., Kim, J., ... DiFiglia, M. (1996). Expression of normal and mutant huntingtin in the developing brain. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 16(17), 5523–5535. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8757264>
- Brass, E. P., & Hoppel, C. L. (1980). Relationship between acid-soluble carnitine and coenzyme A pools in vivo. *The Biochemical Journal*, 190(3), 495–504. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7470064>
- Farghali, H., Williams, D. S., Gavalier, J., & Van Thiel, D. H. (1991). Effect of short-term ethanol feeding on rat testes as assessed by <sup>31</sup>P NMR spectroscopy, <sup>1</sup>H NMR imaging, and biochemical methods. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 15(6), 1018–1023. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1789376>
- Gizatullina, Z. Z., Lindenberg, K. S., Harjes, P., Chen, Y., Kosinski, C. M., Landwehrmeyer, B. G., ... Gellerich, F. N. (2006). Low stability of huntington muscle Mitochondria against Ca<sup>2+</sup> in R6/2 mice. *Annals of Neurology*, 59(2), 407–411. <https://doi.org/10.1002/ana.20754>
- 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. *Cytogenetic and Genome Research*, 103(1–2), 58–62. <https://doi.org/10.1159/000076290>
- Gusella, J. F., Persichetti, F., & MacDonald, M. E. (1997). The genetic defect causing Huntington's disease: repeated in other contexts? *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*, 3(4), 238–246. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9131586>
- Gusella, J. F., Wexler, N. S., Conneally, P. M., Naylor, S. L., Anderson, M. A., Tanzi, R. E., ... Martin, J. B. (1983). A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature*, 306(5940), 234–238. <https://doi.org/10.1038/306234a0>
- Hinton, B. T., & Setchell, B. P. (1980). Concentrations of glycerophosphocholine,



- phosphocholine and free inorganic phosphate in the luminal fluid of the rat testis and epididymis. *Journal of Reproduction and Fertility*, 58(2), 401–406. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7431273>
- Huntington, G. (2003). On Chorea. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, 15(1), 109–112. <https://doi.org/10.1176/jnp.15.1.109>
- Jozefovicova, M., Herynek, V., Jiru, F., Dezortova, M., Juhasova, J., Juhas, S., ... Hajek, M. (2016). Minipig model of Huntington's disease: <sup>1</sup>H magnetic resonance spectroscopy of the brain. *Physiological Research*, 65(1), 155–163. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26596319>
- Krizova, J., Stufkova, H., Rodinova, M., Macakova, M., Bohuslavova, B., Vidinska, D., ... Hansikova, H. (2017). Mitochondrial Metabolism in a Large-Animal Model of Huntington Disease: The Hunt for Biomarkers in the Spermatozoa of Presymptomatic Minipigs. *Neurodegenerative Diseases*, 17(4–5), 213–226. <https://doi.org/10.1159/000475467>
- 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. *The American Journal of Human Genetics*, 68(2), 313–324. <https://doi.org/10.1086/318207>
- Li, S. H., Schilling, G., Young, W. S., Li, X. J., Margolis, R. L., Stine, O. C., ... Ranen, N. G. (1993). Huntington's disease gene (IT15) is widely expressed in human and rat tissues. *Neuron*, 11(5), 985–993. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8240819>
- Macakova, M., Bohuslavova, B., Vochozkova, P., Pavlok, A., Sedlackova, M., Vidinska, D., ... Motlik, J. (2016). Mutated Huntingtin Causes Testicular Pathology in Transgenic Minipig Boars. *Neurodegenerative Diseases*, 16(3–4), 245–259. <https://doi.org/10.1159/000443665>
- Markianos, M., Panas, M., Kalfakis, N., & Vassilopoulos, D. (2005). Plasma testosterone in male patients with Huntington's disease: Relations to severity of illness and dementia. *Annals of Neurology*, 57(4), 520–525. <https://doi.org/10.1002/ana.20428>
- Mukai, C., & Okuno, M. (2004). Glycolysis Plays a Major Role for Adenosine Triphosphate Supplementation in Mouse Sperm Flagellar Movement. *Biology of Reproduction*, 71(2),

540–547. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.026054>

Neylan, T. C. (2003). Neurodegenerative Disorders. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, *15*(1), 108–108. <https://doi.org/10.1176/jnp.15.1.108>

Oliveira, J. M. A., Jekabsons, M. B., Chen, S., Lin, A., Rego, A. C., Gonçalves, J., ... Nicholls, D. G. (2007). Mitochondrial dysfunction in Huntington's disease: the bioenergetics of isolated and in situ mitochondria from transgenic mice. *Journal of Neurochemistry*, *101*(1), 241–249. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04361.x>

Papalexi, E., Persson, A., Björkqvist, M., Petersén, Å., Woodman, B., Bates, G. P., ... Popovic, N. (2005). Reduction of GnRH and infertility in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *European Journal of Neuroscience*, *22*(6), 1541–1546. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04324.x>

Ross, C. A., & Tabrizi, S. J. (2011). Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment. *The Lancet Neurology*, *10*(1), 83–98. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70245-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70245-3)

Saleh, N., Moutereau, S., Durr, A., Krystkowiak, P., Azulay, J.-P., Tranchant, C., ... Maison, P. (2009). Neuroendocrine Disturbances in Huntington's Disease. *PLoS ONE*, *4*(3), e4962. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004962>

Sathasivam, K., Hobbs, C., Turmaine, M., Mangiarini, L., Mahal, A., Bertaux, F., ... Bates, G. P. (1999). Formation of polyglutamine inclusions in non-CNS tissue. *Human Molecular Genetics*, *8*(5), 813–822. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10196370>

Srinivas, M., Degaonkar, M., Chandrasekharam, V. V. S. S., Gupta, D. K., Hemal, A. K., Shariff, A., & Jagannathan, N. R. (2002). Potential of MRI and 31P MRS in the evaluation of experimental testicular trauma. *Urology*, *59*(6), 969–972. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12031396>

Stendardi, A., Focarelli, R., Piomboni, P., Palumberi, D., Serafini, F., Ferramosca, A., & Zara, V. (2011). Evaluation of mitochondrial respiratory efficiency during in vitro capacitation of human spermatozoa. *International Journal of Andrology*, *34*(3), 247–255. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2010.01078.x>

- van der Grond, J. (1995). Diagnosing testicular function using 31P magnetic resonance spectroscopy: a current review. *Human Reproduction Update*, 1(3), 276–283. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9187943>
- van der Grond, J., Laven, J. S., Lock, M. T., te Velde, E. R., & Mali, W. P. (1991). 31P magnetic resonance spectroscopy for diagnosing abnormal testicular function. *Fertility and Sterility*, 56(6), 1136–1142. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1743334>
- van der Grond, J., Laven, J. S., te Velde, E. R., & Mali, W. P. (1991). Abnormal testicular function: potential of P-31 MR spectroscopy in diagnosis. *Radiology*, 179(2), 433–436. <https://doi.org/10.1148/radiology.179.2.2014287>
- van der Grond, J., Laven, J. S., van Echteld, C. J., Dijkstra, G., Grootegoed, J. A., de Rooij, D. G., & Mali, W. P. (1992). The progression of spermatogenesis in the developing rat testis followed by 31P MR spectroscopy. *Magnetic Resonance in Medicine*, 23(2), 264–274. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1549041>
- van der Grond, J., Van Pelt, A. M., van Echteld, C. J., Dijkstra, G., Grootegoed, J. A., de Rooij, D. G., & Mali, W. P. (1991). Characterization of the testicular cell types present in the rat by in vivo 31P magnetic resonance spectroscopy. *Biology of Reproduction*, 45(1), 122–127. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1652290>
- Van Raamsdonk, J. M., Murphy, Z., Selva, D. M., Hamidizadeh, R., Pearson, J., Petersén, Ása, ... Leavitt, B. R. (2007). Testicular degeneration in Huntington disease. *Neurobiology of Disease*, 26(3), 512–520. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2007.01.006>
- 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. *Human Molecular Genetics*, 14(10), 1379–1392. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi147>

## 8. PREHĽAD PUBLIKÁCIÍ / LIST OF PUBLICATIONS

### 8.1. Publikácie v impaktovaných časopisoch/ Publications in Impacted Magazines

#### a) in extenso s podkladom pre dizertačnú prácu

Monika Macakova, **Bozena Bohuslavova**, Petra Vochozkova, Antonin Pavlok, Miroslava Sedlackova, Daniela Vidinska, Klara Vochoyanova, Irena Liskova, Ivona Valekova, Monika Baxa, Zdenka Ellederova, Jiri Klima, Stefan Juhas, Jana Juhasova, Jana Klouckova, Martin Haluzik, Jiri Klempir, Hana Hansikova, Jana Spacilova, Ryan Collins, Ian Blumenthal, Michael Talkowski, James F. Gusella, David S. Howland, Marian DiFiglia, Jan Motlik (2016) **Mutated Huntingtin Causes Testicular Pathology in Transgenic Minipig Boars.** *Neurodegenerative Diseases*, 16(3–4), 245–259. <https://doi.org/10.1159/000443665>

IF (2016) 2,842

M. Jozefovicova, V. Herynek, F. Jiru, M. Dezortova, J. Juhásová, S. Juhas, J. Klíma, **B. Bohuslavova**, J. Motlik, M. Hájek (2015) **<sup>31</sup>P MR Spectroscopy of the Testes and Immunohistochemical Analysis of Sperm of Transgenic Boars Carried N-terminal Part of Human Mutated Huntingtin,** *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie, Cesk Slov Neurol N* 2015; 78/111(Supplementum 2): 28-33, DOI: 10.14735/amcsnn20152S28

IF (2015) 0,209

Jana Krizova, Hana Stufkova, Marie Rodinova, Monika Macakova, **Bozena Bohuslavova**, Daniela Vidinska, Jiri Klima, Zdenka Ellederova, Antonin Pavlok, David S. Howland, Jiri Zeman, Jan Motlik and Hana Hansikova (2017), **Mitochondrial metabolism in large-animal model of huntington's disease: the hunt for biomarkers in the spermatozoa of presymptomatic minipigs** *Neuro-Degenerative Diseases*, 17(4–5), 213–226. <https://doi.org/10.1159/000475467>

IF (2017) 2,842

#### b) in extenso bez podkladu dizertačnej práce

Ardan T, Němcová L, **Bohuslavová B**, Klezlová A, Popelka Š, Studenovská H, Hrnčiarová E, Čejková J, Motlík J. (2015) **Reduced Levels of Tissue Inhibitors of Metalloproteinases in**

**UVB Irradiated Corneal Epithelium** *Photochem Photobiol.* 2016 Jun 18. doi: 10.1111/php.12612

IF (2015) 2,477

Daniela Vidinská, Petra Vochozková, Petra Šmatlíková, Taras Ardan, Štefan Juhás, Jana Juhásová, **Božena Bohuslavová**, Monika Baxa, Ivona Valeková Ján Motlík, Zdenka Ellederová **Gradual phenotype development in Huntington's disease transgenic minipig model at 24 months of age** Podaný v časopise *Neuro-Degenerative Diseases*

IF (2017) 2,842

Melvin M. Evers, Jana Miniarikova, Stefan Juhas, Astrid Valles-Sanchez, **Božena Bohuslavova**, Jana Juhasova, Helena Kupcova Skalnikova, Petr Vodicka, Cynthia Brouwers, Bas Blits, Hana Kovarova, Zdenka Ellederova, Jan Motlik, Sander J. van Deventer, Harald Petry, Pavlina Konstantinova **AAV5-miHTT gene therapy demonstrates broad distribution and strong mutant huntingtin lowering in a Huntington's disease minipig model** Podaný v časopise *Neuron Journal*

IF(2017) 14,024

## **8.2. Publikácie v knižných zborníkoch/Publications in book collections**

Petra Rausova, Petra Vochozkova, Daniela Vidinska, Eva Hrnčiarova, **Božena Bohuslavova**, Monika Macakova, Ivona Valekova, Stefan Juhas, Taras Ardan, Petr Solc, Jan Motlik, Zdenka Ellederova (2017) **Porcine model of huntington's disease** Kapitola v knihe *Huntington disease*, (2017)

## **8.3. Publikácie v neimpaktovaných časopisoch/Publications in unimpacted Magazines**

Gabriela Kocurová, Daniela Pallová, **Božena Bohuslavová**, Taras Ardan, Jan Motlík (2015) **Huntingtonova nemoc** *Bioprospekt*

**Božena Bohuslavová**, Monika Mačáková (2015) **Testikulárna degenerácia pri huntingtonovej chorobe** *Bioprospekt*

## 9. CURRICULUM VITAE

MVDr. Božena Bohuslavová

### **e-mail:**

[bohuslavova@iapg.cas.cz](mailto:bohuslavova@iapg.cas.cz)

### **Pozície:**

9/2013 –súčasnosť: Centrum Pigmod, Liběchov , ČR

Laboratoř bunkové regenerace a plasticity

PhD študent

9/2013 – súčasnosť: Ústav živočíšne fyziologie a genetiky AV ČR Liběchov

Laboratoř bunkové regenerace a plasticity

PhD študent

9/2011-6/2012 : Diplomant na katedre biológie a genetiky Univerzity veterinárske

lekárstva a farmácie v Košiciach, SR

### **Vzdelanie:**

10/2013 súčasnosť: Karlova univerzita v Prahe, Přírodovědecká fakulta

Študijný progra.: Bunková a vývojová biologia

PhD štúdium

2006-2013 : Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, SR

Študijný program: Všeobecné veterinárske lekárstvo

MVDr. štúdium

2002-2006 : Gymnázium Konštantínova 2, Prešov

### **Doplnkové vzdelanie.**

- 06/2014 : Kurz základov vedeckej práce
- 02/2015 : Kurz práce s laboratornymi zvieratami, Osvědčení o odborné  
způsobnosti k navrhování pokusů a projektů pokusu,  
evidečné číslo CZ 02939
- 06/2016 : Kurz spracovanie a analýza mikroskopických obrázkov  
v biomedicíne
- 31.3.2017 : Osvědčení o způsobilosti pro řidiče a průvodce,  
evidečné číslo CZ 07234

**Vedecké členství:**

EHDN – European Huntington´s Disease Network

**Jazykové zručnosti:**

- Slovenský jazyk: rodný
- Český jazyk: pasívne
- Anglický jazyk: stredne pokročilý
- Franzúzsky jazyk: základy