

UNIVERZITA KARLOVA

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra biochemie**

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Bc. Katarína Ďurčeková

**Analýza mitochondriálního energetického metabolismu v časných  
fázích rozvoje Huntingtonovy nemoci**

Analysis of mitochondrial energetic metabolism in early stages of  
Huntington's disease

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí práce: RNDr. Hana Hansíková, CSc.

Konzultant: RNDr. Lucie Rychtářová, Ph.D.

Praha 2024

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

.....

## Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce RNDr. Haně Hansíkové, CSc. za její vstřícnost, laskavé vedení, usměrnění a cenné rady při psaní této diplomové práce. Ráda bych také poděkovala své konzultantce RNDr. Lucii Rychtářové, Ph.D. za velkou trpělivost a pomoc při výzkumné části mé práce a doc. MUDr. Jiřímu Klempířovi, Ph.D. z Neurologické kliniky 1. LF UK za předané znalosti. Mé poděkování patří i celému kolektivu Laboratoře pro studium mitochondriálních poruch za ochotu a vytvoření příjemného pracovního prostředí. V neposlední řadě děkuji i svým rodičům, sourozencům a přátelům za oporu a povzbudivá slova, kterými mně při tvorbě této práce podporovali.

Tato diplomová práce byla finančně podpořena výzkumným projektem NU20-04-00136.

## Abstrakt

Huntingtonova nemoc (HN) je autozomálně dominantní neurodegenerativní onemocnění charakterizované motorickými, psychiatrickými a kognitivními příznaky. Průměrný věk nástupu HN je 40 let a u postižených osob má toto onemocnění nepříznivou prognózu. Vzhledem k tomu, že dosud není k dispozici kauzální léčba, je současná léčba HN zaměřena pouze na zmírnění symptomů. Klinickému projevu HN předchází asymptomatické období, kdy již probíhají kontinuální biochemické, strukturální a funkční změny na buněčné úrovni. Naše předchozí studie prokázaly poškození mitochondriálních parametrů v lymfocytech a v kultivovaných fibroblastech pacientů s rozvinutou HN.

Cílem této práce bylo funkčními metodami charakterizovat základní složky mitochondriálního energetického metabolismu a najít vhodné mitochondriální biomarkery pro sledování progresu HN. Analyzovaný soubor tvořilo 12 linií kultivovaných kožních fibroblastů od pacientů s geneticky prokázanou HN, čtyři pacienti v asymptomatickém, čtyři v časném a čtyři v pokročilém stádiu HN a 4 linie od zdravých osob. Mitochondriální respirace a glykolytická aktivita byly analyzovány pomocí sledování spotřeby kyslíku a změn pH v reálném čase, produkce ATP pomocí luminiscence, metabolický obrat a katalytická aktivita pyruvátdehydrogenasového komplexu pomocí oxidace substrátů.

Linie fibroblastů od pacientů v asymptomatickém a časném období HN vykazovaly zvýšenou maximální respiraci, což by mohlo znamenat, že u nich dochází k aktivaci procesů, které vedou k stimulaci energetického metabolismu. Fibroblasty pacientů v pokročilém stádiu HN naopak měly sníženou bazální i maximální respiraci oproti kontrolám. Získané výsledky též poukazují na poruchy Krebsova cyklu a systému OXPHOS u pacientů v pokročilém stádiu nemoci. V našem souboru nebyly ve sledovaných fázích rozvoje HN zjištěny signifikantní rozdíly v glykolytické aktivitě buněk, v produkci ATP a v katalytické aktivitě pyruvátdehydrogenasového komplexu.

Tato pilotní studie je základem pro další výzkum mitochondriální role u HN na širším souboru vzorků a na jiných typech neinvazivního biologického materiálu.

**Klíčová slova:** kultivované kožní fibroblasty, dýchací řetězec, mitochondrie, Huntingtonova nemoc, biomarker

## Abstract

Huntington's disease (HD) is an autosomal dominant neurodegenerative disorder characterized by motor, psychiatric and cognitive symptoms. The average age of onset of HD is 40 years and affected individuals have an unfavourable prognosis. Since there is still no curative treatment available, the current treatment of HD focuses only on symptom suppression. The clinical manifestation of HD is preceded by an asymptomatic period in which continuous biochemical, structural and functional changes at the cellular level are already occurring. Our previous studies have demonstrated impaired mitochondrial parameters in lymphocytes and cultured fibroblasts of patients with advanced HD.

The aim of this study was to characterize the essential components of mitochondrial energy metabolism by functional methods and to find suitable mitochondrial biomarkers to monitor progression of HD. The analysed set consisted of 12 cell lines of cultured skin fibroblasts from patients with genetically proven HD, four patients in asymptomatic, four in early and four in symptomatic stages of HD. Four lines from healthy individuals served as controls. Mitochondrial respiration and glycolytic activity were analysed by real-time monitoring of oxygen consumption and pH changes, ATP production by luminescence, and metabolic turnover and catalytic activity of the pyruvate dehydrogenase complex by substrate oxidation.

Patients in the asymptomatic and early stages of HD showed increased maximal respiration, which could indicate that there is activation of processes that lead to stimulation of energy metabolism. In contrast, patients in symptomatic stage of HD had reduced basal and maximal respiration compared to controls. The results also point to disturbances of the Krebs cycle and the OXPHOS system in this group of patients. No significant differences in cell glycolytic activity, ATP production and catalytic activity of pyruvate dehydrogenase complex were found in the analysed set.

This pilot study provides a basis for further investigation of the mitochondrial role in HD in a larger sample set and in other types of non-invasive biological material.

**Keywords:** cultured skin fibroblasts, respiratory chain, mitochondria, Huntington's disease, biomarker

## Obsah

Seznam zkratk a symbolů .....	8
1 Teoretický úvod .....	12
1.1 Huntingtonova nemoc .....	12
1.1.1 Genetika Huntingtonovy nemoci .....	12
1.1.2 Symptomy Huntingtonovy nemoci .....	13
1.1.3 Diagnostika a terapie Huntingtonovy nemoci .....	16
1.2 Protein huntingtin a jeho role v rozvoji Huntingtonovy nemoci .....	17
1.2.1 Fyziologické funkce proteinu huntingtinu v organismu .....	17
1.2.2 Proteolýza a agregace mutovaného huntingtinu – patogeneze Huntingtonovy nemoci .....	18
1.3 Mitochondrie .....	19
1.4 Systém oxidační fosforylace – syntéza ATP v mitochondriích .....	20
1.4.1 Komplex I (NADH:ubichinon oxidoreduktasa) .....	21
1.4.2 Komplex II (sukcinátdehydrogenasa) .....	21
1.4.3 Komplex III (ubichinol:cytochrom <i>c</i> reduktasa) .....	22
1.4.4 Komplex IV (cytochrom <i>c</i> oxidasa) .....	22
1.4.5 F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> ATP syntasa (komplex V) .....	23
1.4.6 Superkomplexy .....	24
1.5 Pyruvátdehydrogenasový komplex .....	26
1.6 Krebsův cyklus a citrát syntasa jako mitochondriální biomarker .....	27
1.7 Mitochondrie a jejich role v buněčné bioenergetice v kontextu neurodegenerativních onemocnění .....	29
1.7.1 Mitochondrie a jejich patologie u Huntingtonovy nemoci – vliv mutovaného huntingtinu na fyziologii mitochondrií .....	31
1.7.2 Postižení bioenergetického metabolismu v periferních tkáních u Huntingtonovy nemoci .....	33
2 Cíle práce .....	35
3 Materiál a metody .....	36
3.1 Materiál .....	36
3.1.1 Použitý biologický materiál .....	36
3.1.2 Použité chemikálie .....	37
3.2 Přístroje a laboratorní vybavení .....	39
3.2.1 Použité přístroje .....	39
3.2.2 Komerčně dodávané kazety a destičky .....	40
3.2.3 Počítačové programy použité pro analýzu .....	41

3.3 Metody .....	41
3.3.1 Kultivace kožních fibroblastů .....	41
3.3.2 Měření kapacity mitochondriálního energetického metabolismu .....	43
3.3.3 Stanovení koncentrace proteinu podle Lowryho .....	46
3.3.4 Stanovení aktivity citrátsyntasy .....	47
3.3.5 Analýza na přístroji <i>Seahorse XFe24</i> .....	47
3.3.6 Analýza ATP produkce pomocí luminiscence .....	51
3.3.7 Stanovení katalytické aktivity pyruvátdehydrogenasového komplexu .....	53
4 Výsledky .....	56
4.1 Analýza KMEM u pacientů s HN .....	56
4.2 Analýza na přístroji <i>Seahorse XFe24</i> .....	58
4.3 Analýza ATP produkce pomocí luminiscence .....	60
4.4 Stanovení katalytické aktivity pyruvátdehydrogenasového komplexu .....	62
5 Diskuze .....	63
6 Závěr .....	68
7 Seznam použité literatury .....	69
8 Přílohy .....	78

## Seznam zkratk a symbolů

°C	stupeň celsia, jednotka teploty
μl	mikrolitr (jednotka objemu)
μCi/μl	mikrocurie na mikrolitr (jednotka koncentrace)
4p16.3	pás 16.3 na krátkém raménku chromozomu 4
ADP, ATP	adenosindifosfát, adenosintrifosfát
AP5A	P1,P5-di(adenosine-5')pentafofát
ATB	antibiotikum
Bcl-2	pro-apoptotická rodina proteinů (z angl. <i>B-cell lymphoma 2 protein</i> )
BCS	scintilační roztok (z angl. <i>Biodegradable Counting Scintillant</i> )
BDNF, <i>BDNF</i>	mozkový neurotrofický faktor (z angl. <i>brain-derived neurotrophic factor</i> ) a příslušný gen
BSA	hovězí sérový albumin (z angl. <i>bovine serum albumin</i> )
Ca <sup>2+</sup>	vápenatý kation
CAG	cytosin-adenin-guanin – kodon pro aminokyselinu glutamin
CCCP	karbonylkyanid-3-chlorofenylhydrazon
CoA	koenzym A
COX	cytochrom <i>c</i> oxidasa (komplex IV)
CREB	transkripční faktor (z angl. <i>cAMP response element binding protein</i> )
CS	citrátsyntasa
Cu <sub>A</sub> , Cu <sub>B</sub>	redoxně aktivní měďnatá centra komplexu IV
dH <sub>2</sub> O	destilovaná voda
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle medium
DMSO	dimethylsulfoxid
DPM	počet rozpadů radionuklidu za minutu (z angl. <i>disintegrations per minute</i> ), míra radioaktivity měřená scintilačním počítačem
Drp1	z angl. <i>dynamin-related protein 1</i>
DTNB	5,5-dithiobis-(2-nitrobenzoát) (Ellmanovo činidlo)



E1, E2, E3	enzymy pyruvátdehydrogenasového komplexu (pyruvátdehydrogenasa, dihydrolipoyltransacetylasa, dihydrolipoyldehydrogenasa)
ECAR	rychlost extracelulární acidifikace (z angl. <i>extracellular acidification rate</i> )
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ETC	elektronový transportní řetězec (z angl. <i>electron transport chain</i> )
ER	endoplazmatické retikulum
FAD, FADH <sub>2</sub>	flavinadenindinukleotid (oxidovaná a redukována forma)
FBS	fetální hovězí sérum (z angl. <i>fetal bovine serum</i> )
FCCP	karbonylkyanid-p-trifluoromethoxyfenylhydrazon
Fe <sub>a</sub> , Fe <sub>a3</sub>	redoxně aktivní centra hemu <i>a</i> , <i>a</i> <sub>3</sub> podjednotky I komplexu IV
FeS	železo-sírná centra
Fis1	protein mitochondriálního dělení (z angl. <i>fission 1 protein</i> )
FMN	flavinmononukleotid
HAP1	z angl. <i>huntingtin-associated protein 1</i>
HN	Huntingtonova nemoc
HSF1	transkripční faktor tepelného šoku (z angl. <i>heat shock transcription factor 1</i> )
HTT; <i>HTT</i>	protein huntingtin a příslušný gen
iPSCs	indukované pluripotentní kmenové buňky (z angl. <i>induced pluripotent stem cells</i> )
K	kontrola
K <sup>+</sup>	draselný kation
kDa	kilodalton
KMEM	kapacita mitochondriálního energetického metabolismu
M	muž
Mfn1	mitofusin1 protein
Mfn2	mitofusin2 protein
Mg <sup>2+</sup>	hořečnatý kation
mg/ml	miligram na mililitr (jednotka hmotnostní koncentrace)
mHTT	mutovaný protein huntingtin

ml	mililitr (jednotka objemu)
MilliQ-UV	ultračistá voda
mPTP	mitochondriální permeabilní tranzitní pór
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
mtDNA	mitochondriální deoxyribonukleová kyselina
NAD <sup>+</sup> , NADH	nikotinamidadenindinukleotid (oxidovaná a redukována forma)
NSCs	neuronální kmenové buňky (z angl. <i>neural stem cells</i> )
NQR	NADH:ubichinon oxidoreduktasa (komplex I)
OCR	rychlost spotřeby kyslíku (z angl. <i>oxygen consumption rate</i> )
OPA1	protein mitochondriální fúze (z angl. <i>optic atrophy 1 protein</i> )
OSCP	podjednotka F <sub>o</sub> domény ATP syntasy (z angl. <i>oligomycin sensitivity-conferring protein</i> )
OXPHOS	oxidační fosforylace (z angl. <i>oxidative phosphorylation</i> )
P	pacient
p53	tumor-supresorový protein p53
PBS	fosfátový pufr (z angl. <i>phosphate buffered saline</i> )
PDHc	pyruvátdehydrogenasový komplex
PDK	pyruvátdehydrogenasa-kinasa
PDP	pyruvátdehydrogenasa-fosfatasa
PGC1- $\alpha$ , <i>PGC1-<math>\alpha</math></i>	centrální protein mitochondriální biogeneze (z angl. <i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha</i> ) a příslušný gen
pH	záporný dekadický logaritmus aktivity iontů H <sub>3</sub> O <sup>+</sup>
polyQ	polyglutaminová sekvence
Q, Q $\cdot^-$ , QH <sub>2</sub>	koenzym Q (ubichinon, ubisemichinon, ubichinol)
ROS	reaktivní formy kyslíku (z angl. <i>reactive oxygen species</i> )
RLU	relativní světelné jednotky (z angl. <i>relative light units</i> )
rpm	počet otáček za minutu (z angl. <i>revolutions per minute</i> )
rRNA	ribozomální ribonukleová kyselina
SDH (-A, B, C, D)	sukcinátdehydrogenasa (komplex II) a její podjednotky
T+E	roztok trypsinu a ethylendiamintetraoctové kyseliny

TFC	hodnotící škála celkové funkční kapacity pacientů s HN (z angl. <i>Total Functional Capacity</i> )
TPP	thiamindifosfát
TrkB	z angl. <i>tropomyosin receptor kinase B</i>
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
UHDRS	hodnotící škála pro sledování klinických změn pacientů s HN (z angl. <i>Unified Huntington 's Disease Rating Scale</i> )
v/v	objemová procenta (z angl. <i>volume/volume</i> )
WT	z angl. <i>wild type model</i>
w/v	hmotnostní procenta (z angl. <i>weight/volume</i> )
Ž	žena

# 1 Teoretický úvod

## 1.1 Huntingtonova nemoc

Huntingtonova nemoc (HN) je závažné dědičné neurodegenerativní onemocnění charakterizované motorickými, psychiatrickými a kognitivními příznaky. Toto onemocnění bylo poprvé popsáno americkým lékařem Georgem Huntingtonem v roce 1872, po kterém bylo pojmenováno jako Huntingtonova chorea (pozn. chorea je označení pro mimovolní, nepravidelné pohyby různých částí těla). Později se však v odborné i laické veřejnosti prosadilo označení Huntingtonova nemoc, které odráží skutečnost, že existuje i mnoho nemotorických příznaků HN, které mohou být ve skutečnosti více omezující než ty motorické<sup>1</sup>.

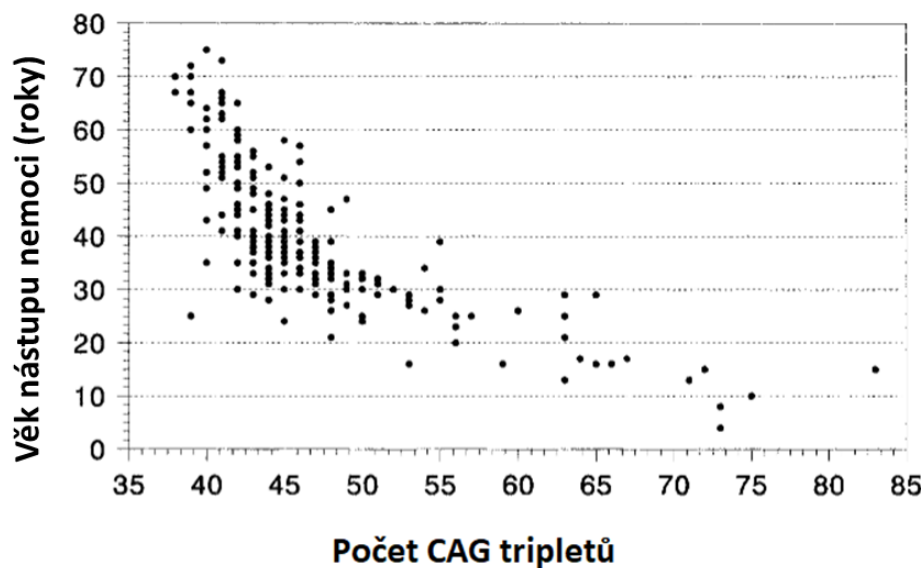
Prevalence HN je etnicky a geograficky variabilní a v současnosti má rostoucí trend. Postihuje všechny rasové skupiny, nejvíce však zasahuje populaci severoevropského původu<sup>2</sup>. V západní populaci má prevalenci 10,6–13,7 jedinců na 100 000 obyvatel. V asijských zemích, jako je Japonsko, Tchaj-wan a Hongkong, je výskyt HN mnohem nižší. Pohybuje se v rozmezí 1–7 jedinců na milion obyvatel. Rozdíly v prevalenci onemocnění mezi etnickými skupinami souvisejí s genetickými rozdíly v *HTT* genu. Populace s vysokou prevalencí mají delší průměrné CAG repetice<sup>3</sup>.

### 1.1.1 Genetika Huntingtonovy nemoci

Huntingtonova nemoc představuje autozomálně dominantní onemocnění způsobené abnormální expanzí CAG tripletů v genu pro huntingtin (*HTT*) lokalizovaném na krátkém raménku 4. chromozomu (4p16.3). Procesem translace pak vzniká mutovaný huntingtin (mHTT), toxický protein s abnormálně dlouhou polyglutaminovou (polyQ) sekvencí na N-konci proteinu<sup>4</sup>.

Lidé, kteří netrpí HN mají nemutovaný gen *HTT* s méně než 36 CAG repeticemi. U osob s více než 39 opakováními CAG je jisté, že se onemocnění vyvine, zatímco v rozsahu mezi 36 a 39 repeticemi je pozorována snížená penetrance tohoto genu, což znamená, že u některých lidí s těmito počty CAG se HN vyvine a u některých ne<sup>5,6</sup>. Střední počet opakování mezi 29 a 35 nezpůsobuje HN, může se však v budoucích generacích rozšířit do patogenního rozsahu<sup>1</sup>. Takto vznikají zdánlivě sporadické případy HN, kdy se nemoc projeví u člověka bez zjevné rodinné anamnézy. Zdánlivě sporadické případy se vyskytují u 6–8 % nových pacientů s HN<sup>7</sup>.

Přítomnost 60 a více CAG tripletů v *HTT* genu vede ke vzniku tzv. juvenilní formy HN s objevením prvních symptomů ještě před dovršením 20. roku života pacienta<sup>8</sup>. Juvenilní forma HN s časným nástupem je zpravidla děděna od otce. Je to důsledek toho, že spermie vykazují větší variabilitu a počet CAG opakování než somatické tkáně. To taky znamená, že otec s počtem repetice CAG ve středním rozsahu může mít dítě s rozšířenou patogenní délkou repetice<sup>9</sup>. Juvenilní formou trpí jenom 5 až 7 % všech pacientů s HN<sup>10</sup>. U osob s HN obecně platí, že čím větší je počet opakování CAG tripletů, tím dříve se u pacienta onemocnění projevívá<sup>4</sup>. Tuto skutečnost znázorňuje **Obrázek 1**.



**Obrázek 1:** Závislost věku nástupu HN na počtu CAG tripletů v genu pro *HTT*. Převzato a upraveno podle<sup>10</sup>.

### 1.1.2 Symptomy Huntingtonovy nemoci

HN je progresivní onemocnění, které má kromě motorických i mnoho psychiatrických, behaviorálních a kognitivních příznaků. První příznaky a projevy HN se u pacientů obvykle začínají pomalu a nenápadně manifestovat v dospělosti mezi 30. a 50. rokem života<sup>4</sup>. Průměrný věk nástupu symptomů je 40 let, existuje však i juvenilní forma HN (nástup <20 let) a forma HN s pozdním počátkem (>70 let)<sup>1</sup>. Několik let po objevení psychiatrických změn se u pacientů začínají manifestovat motorické deficity, zvláště nekontrolovatelné, mimovolní pohyby různých částí těla označované jako chorea. Stav pacienta se postupně zhoršuje v průběhu 10 až 20 let od nástupu motorických symptomů až do jeho smrti<sup>4</sup>. Progrese onemocnění vede k nutnosti každodenní péče do konce života. Nejčastější příčinou úmrtí pacientů s HN je zápal plic, na druhém místě je to sebevražda<sup>11</sup>.

System klasifikace pacientů s HN do konkrétního stádia nemoci dle klinických projevů je nejednotný a vyžaduje další upřesnění a standardizaci. Rozlišení premanifestního a manifestního období HN je poněkud sporné, protože u většiny pacientů se objeví některé kognitivní, behaviorální nebo psychiatrické příznaky často mnoho let předtím, než se objeví první motorické příznaky<sup>1</sup>. Některé studie považují za nástup manifestní HN právě okamžik, kdy se u pacientů objeví charakteristické motorické příznaky. Před tímto okamžikem je jedinec klasifikován jako premanifestní nositel genu<sup>1,12</sup>. Jiné studie však zohledňují i psychiatrické, kognitivní a behaviorální změny, kvůli kterým nelze postižené pacienty zařadit do premanifestního stádia HN. Tyto studie pak pacienty s HN zařazují do čtyřech kategorií: asymptomatické nositele mutace, osoby v prodromálním stádiu nemoci (u kterých se objevují první změny na psychice), osoby v časném stádiu HN a osoby v pokročilém stádiu HN se závažnými funkčními deficity. Této klasifikace jsme se přidrželi i v předkládané práci.

#### 1.1.2.1 Poruchy motoriky u pacientů s Huntingtonovou nemocí

Charakteristické poruchy motoriky pacientů s HN zahrnují mimovolní nechtěné a nedobrovolné pohyby. Motorické symptomy HN lze rozdělit do dvou kategorií: hyperkineze (chorea) a hypokineze. V časném stádiu onemocnění obvykle převládají hyperkinetické pohyby, které zasahují převážně svaly obličeje či distální oblasti těla, jako jsou prsty na ruce a nohou. S postupem onemocnění se tyto mimovolní pohyby rozšiřují od distálních částí k proximálním a axiálním svalům. To má za následek nekoordinovanost pohybů, potíže při chůzi a časté pády<sup>11</sup>.

V pokročilejším stádiu nemoci se začíná projevovat hypokineze vedoucí k omezení a zpomalení pohybu. Mezi její typické projevy lze zařadit dystonii (pomalejší pohyby se zvýšeným svalovým tonusem vedoucím k abnormálnímu držení těla), svalovou rigiditu, bradykinezi (pomalost pohybu) a akinezi (problémy se zahájením pohybu)<sup>11</sup>. Obecně platí, že tyto pozdější příznaky bývají více funkčně omezující než chorea. Motorické příznaky dříve či později omezí výkonnost pacienta v zaměstnání a stíží vykonávání každodenních aktivit<sup>1</sup>.

#### 1.1.2.2 Behaviorální a psychiatrické symptomy Huntingtonovy nemoci

Psychiatrické příznaky jsou obvykle prvními symptomy pacientů s HN, které se začínají projevovat mnoho let před nástupem prvních motorických symptomů. Behaviorální a psychiatrické změny zahrnují stavy jako je podrážděnost, deprese, apatie, úzkost,

obsedantně kompulzivní chování a psychóza<sup>6</sup>. Nejčastějším psychiatrickým symptomem pacientů je deprese. Samovražedné sklony se častěji objevují u pacientů v časném a premanifestním stádiu nemoci či v období ztráty nezávislosti. V pozdějších stádiích nemoci se může objevit psychóza, která je u většiny pacientů spojena s poklesem kognitivních funkcí<sup>11</sup>.

#### 1.1.2.3 Kognitivní symptomy Huntingtonovy nemoci

Stejně jako psychiatrické změny, i kognitivní deficity můžeme u pacientů s HN často pozorovat ještě v premanifestním období. Kognitivní symptomy jsou charakterizovány poruchami rozpoznávání emocí, rychlosti zpracování smyslových podnětů a vizuálně-prostorových funkcí<sup>13</sup>. Kognitivní změny se týkají zejména výkonných funkcí. Pacienti ztrácejí schopnost rozlišit, co je relevantní a co ne, ztrácejí též schopnost plánovat a organizovat svůj život. Dochází také k poruchám paměti a zpomalení všech psychomotorických procesů<sup>11</sup>.

Mezi méně známé, ale převažující příznaky HN patří také nechtěný úbytek hmotnosti, poruchy spánku a cirkadiánního rytmu a dysfunkce autonomního nervového systému<sup>11</sup>. Pacienti postižení HN často potřebují výrazně zvýšený příjem kalorií (až 4 000 kalorií za den) na udržení stabilní hmotnosti<sup>1</sup>.

#### 1.1.2.4 Symptomy juvenilní formy Huntingtonovy nemoci

HN s nástupem v dospělosti je charakterizována typickou triádou klinických symptomů – motorické defekty, psychiatrické poruchy a kognitivní deficity. Ačkoli se stejné symptomy projevují i u juvenilní formy HN, podrobná symptomatologie může být odlišná<sup>10</sup>.

Juvenilní HN se obvykle začíná projevovat poruchami chování a problémy s učením ve škole. U pacientů se objevují psychiatrické příznaky a zhoršují se jejich kognitivní funkce<sup>11</sup>. Onemocnění s nástupem v první dekádě života kromě zhoršujících se kognitivních funkcí a problémů s chováním často doprovází svalová rigidita končetin nebo trupu, orální dysfunkce a záchvaty<sup>14</sup>. Chorea je u těchto dětí vzácná, ale u dospívajících může být jedním z prvních příznaků. Adolescenti v prvních stádiích nemoci projevují závažné behaviorální poruchy vyžadující lékařský nebo právní zásah, jako je žhárství, pokusy o sebevraždu, sexuální agrese či zneužívání drog nebo alkoholu<sup>10</sup>.

Progrese nemoci u dětí a mladistvých může mít odlišný průběh, u všech pacientů však nakonec dojde ke ztrátě schopnosti ústně komunikovat, chodit a bezpečně se stravovat. V posledních fázích nemoci jsou mladí dospělí upoutaní na lůžko a odkázáni na každodenní péči druhých<sup>10</sup>.

#### 1.1.2.5 Klinické hodnocení symptomů Huntingtonovy nemoci

Pro pacienta, rodinu i pečovatele je důležité klinické hodnocení symptomů a příznaků HN v průběhu času. Pro účely systematického klinického sledování pacienta, a především pro výzkumné účely, bylo vyvinuto několik hodnotících škál. Mezi nejznámější patří Shoulsonova-Fahnova škála a Unified Huntington's Disease Rating Scale (UHDRS)<sup>11</sup>.

Shoulson a Fahn v roce 1979 zavedli hodnotící škálu Total Functional Capacity (TFC) používanou v klinické praxi<sup>15</sup>. Jedná se o hodnocení celkové funkční kapacity pacientů s HN. Skóre se přiděluje podle schopnosti jedince samostatně fungovat v každé ze čtyř oblastí – zaměstnání, finance, domácí práce a činnosti každodenního života – a podle úrovně ošetrovatelské péče, kterou potřebuje<sup>1</sup>. TFC škála je v rozsahu od 0 do 13, přičemž vyšší skóre znamená lepší fungování pacienta<sup>16</sup>.

V roce 1996 byla vyvinuta klinická hodnotící škála Unified Huntington's Disease Rating Scale (UHDRS) určená pro hodnocení čtyř oblastí klinické výkonnosti a kapacity pacientů s HN. V rámci této škály se hodnotí motorické, kognitivní funkce, behaviorální abnormality a funkční kapacita (hodnocená pomocí Shoulsonovy-Fahnovy TFC škály) pacientů. Klasifikace UHDRS se používá jako užitečný nástroj pro sledování klinických změn pacientů s HN v průběhu času. Toto hodnocení má využití obzvláště pro výzkumné účely během klinických studií<sup>12</sup>.

#### 1.1.3 Diagnostika a terapie Huntingtonovy nemoci

Vzhledem k tomu, že HN je v Evropě nejčastější příčinou chorey s behaviorálními, psychiatrickými a kognitivními příznaky, je HN při kombinaci těchto příznaků zpravidla prvním vyšetřovaným onemocněním. Diagnostika HN je poměrně jednoduchá – provádí se genetický test na přítomnost mutované alely huntingtinu. Diagnóza je potvrzena identifikací zvýšeného počtu CAG repetice v *HTT* genu. Ačkoli diagnostikovat HN není obtížné, někdy se mohou vyskytnout atypické projevy onemocnění, kvůli kterým je pak náročné poznat, kdy pacient přešel z asymptomatického stadia do stavu symptomatického<sup>17</sup>.



Vzhledem k tomu, že dosud není k dispozici kauzální léčba, je současná léčba HN čistě symptomatická.<sup>17</sup> Pod záštitou organizace European Huntington's Disease Network však probíhá několik prospektivních klinických studií. Velký potenciál má genová terapie založená na intrastriatální injekci microRNA kompletního *HTT* genu s využitím adeno-asociovaného virového vektoru. U pacientů účastnících se obdobné klinické studie v USA bylo zaznamenáno snížení hladiny biomarkerů neurodegenerace. V budoucnu by tato forma genové terapie mohla mít uplatnění v léčbě HN<sup>18</sup>.

## 1.2 Protein huntingtin a jeho role v rozvoji Huntingtonovy nemoci

V patologii HN hraje důležitou roli protein huntingtin (HTT) kódovaný genem *HTT*. Tento protein je nezbytný pro normální vývoj nervové soustavy, ačkoliv jeho funkce na buněčné úrovni není zcela objasněna<sup>1</sup>. Nejvyšší míru exprese má HTT v centrálním nervovém systému a ve varlatech. Lidský HTT má velikost 348 kDa a je složen ze 3144 aminokyselin. Na N-konci proteinu je tzv. polyQ oblast, která je u zdravých jedinců kódována 9–35 CAG triplety<sup>19</sup>. Expanze CAG tripletů nad 35 má za následek vznik mutovaného proteinu mHTT. PolyQ oblast je následována doménou bohatou na proliny, která je pravděpodobně důležitá pro stabilizaci struktury polyQ úseku a má také vliv na sklon mHTT k agregaci<sup>20</sup>.

### 1.2.1 Fyziologické funkce proteinu huntingtinu v organismu

Protein HTT má v lidském organismu mnoho důležitých funkcí. Je nezbytný pro embryonální vývoj a podílí se na fyziologických a vývojových procesech v postnatálním období. Experimenty na zvířecích HTT knock-out modelech stejně jako ty na kultivovaných striatálních neuronech naznačují antiapoptotickou roli tohoto proteinu<sup>21</sup>.

HTT je převážně cytoplazmatický protein, je však přítomen i v jádře, kde reguluje transkripci některých genů. Jsou to hlavně geny kódující proteiny zodpovědné za vývoj neuronů (např. gen *BDNF*, gen pro mozkový neurotrofický faktor, z angl. *brain-derived neurotrophic factor*) či klíčové regulátory energetického metabolismu jako je PGC1- $\alpha$  (z angl. *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha*). V cytoplazmě protein HTT interaguje s mnohými organelami, včetně lysozomů, endoplazmatického retikula, Golgiho aparátu a mitochondrií. HTT též interaguje s proteiny účastnící se endocytózy, reguluje transport endozomů a buněčnou autofagii<sup>20</sup>.

HTT se v intracelulárním prostředí také podílí na transportu organel a vezikul v dendritech a axonech neuronů. Interaguje přímo s molekulárním motorem dyneinem nebo nepřímo skrz protein HAP1 (z angl. *huntingtin-associated protein 1*) s dynaktinem a kinesinem. HTT může zvýšit rychlost pohybu vezikul podél mikrotubul a zrychlit tak jejich axonální transport. Kromě toho koordinuje i směr transportu těchto vezikul<sup>20</sup>. Zmiňovaný protein je též hojně zastoupen v synaptických zakončeních neuronů, kde interaguje s cytoskeletálními a synaptickými vezikulárními proteiny, čímž reguluje synaptickou aktivitu neuronů<sup>21</sup>.

Protein HTT se neexprimuje jenom v neuronech, ale je přítomen i v dělicích se buňkách, kde se podílí na koordinaci buněčného dělení. V průběhu mitózy HTT skrz interakci s dyneinem napomáhá akumulaci proteinů, které regulují sestavení dělicího vřeténka. Ztráta funkce HTT pak vede k nesprávné orientaci vřeténka během mitózy<sup>20</sup>.

### 1.2.2 Proteolýza a agregace mutovaného huntingtinu – patogeneze Huntingtonovy nemoci

Mutovaný huntingtin se zmnoženým počtem repetitivních glutaminových zbytků na N-konci proteinu je hlavním znakem HN. Může vytvářet inkluzní a agregátní formy v jádře a cytoplazmě, které jsou pro buňky toxické<sup>22</sup>. Amyloidní vlákna mHTT jsou tvořena zejména strukturami  $\beta$ -listu. Nerozpustnost a toxicita proteinových agregátů mHTT u pacientů s HN jsou hlavní příčinou odumírání neuronů<sup>23</sup>. Přestože k neuropatologii mHTT dochází v celém mozku, charakteristickou změnou u pacientů s HN je selektivní ztráta buněk v *corpus striatum*<sup>24</sup>.

V progresi HN má významnou roli proteolytické štěpení HTT. Proteolýzou HTT vznikají N-koncové fragmenty proteinu obsahující polyQ oblast, které vykazují větší agregaci a neuronální toxicitu než protein plné délky. Tyto fragmenty jsou translokovány do jádra, kde způsobují buněčnou smrt neuronů tím, že interferují s transkripcí<sup>25</sup>. mHTT tvoří agregáty vícero typů a zatím není známo, které z nich hrají hlavní roli v patogenezi HN. Intracelulární inkluze, fibrily, oligomery či amorfní agregáty mHTT vykazují značnou konformační diverzitu. Většina odborníků se shoduje, že právě oligomery mHTT vykazují větší toxicitu jako fibrily a jsou tedy hlavním toxickým agens zodpovědným za patogenezi HN<sup>21</sup>.

Jako důsledek interakce mHTT s proteiny účastníci se transkripce, energetického metabolismu, buněčného cyklu a signalizace dochází k buněčné smrti a apoptóze

neuronů<sup>26</sup>. Úbytek neuronů a dysfunkce bazálních ganglií přispívají k postupné motorické dysfunkci, kognitivnímu úpadku a psychickým poruchám pacientů s HN<sup>27</sup>.

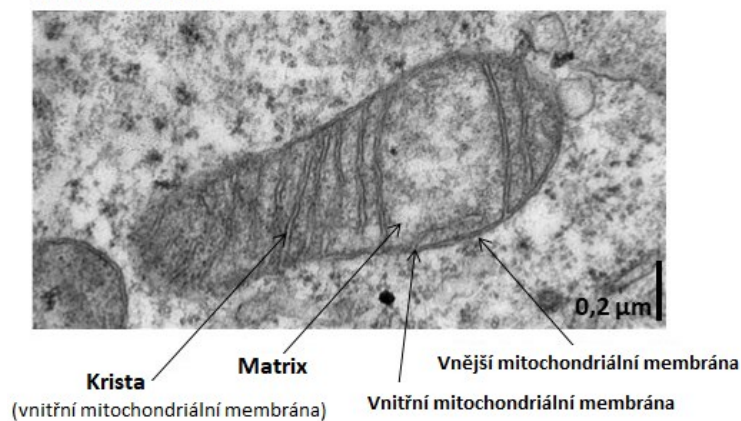
### 1.3 Mitochondrie

Mitochondrie jsou esenciální eukaryotní organely složené z vnější membrány, vnitřní membrány vytvářející kristy a mitochondriální matrix (**Obrázek 2A**, str. 20). Tyto organely mají vlastní cirkulární, dvouvláknovou mitochondriální DNA (mtDNA), která u člověka představuje asi 1 % celkové buněčné DNA. mtDNA kóduje 2 typy rRNA (12S rRNA a 16S rRNA), 22 typů tRNA a 13 podjednotek enzymů dýchacího řetězce. Mitochondrie také obsahují i ribozomy nazývané mitoribozomy<sup>28</sup>.

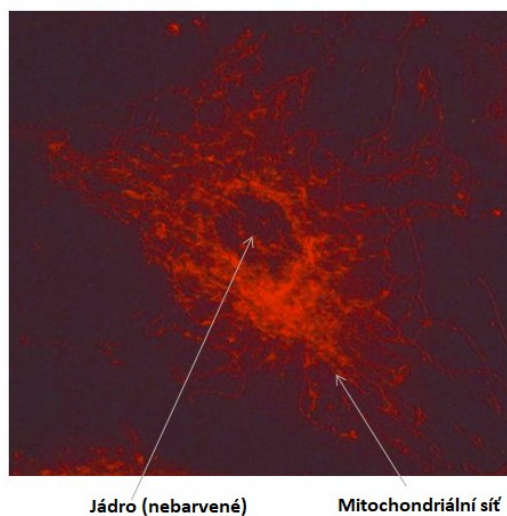
Mitochondrie se podílí na procesu oxidační fosforylace (OXPHOS, z angl. *oxidative phosphorylation*), jehož systém je lokalizován ve vnitřní mitochondriální membráně<sup>29</sup>. V procesu OXPHOS generuje mitochondrie až 90 % veškerého ATP syntetizovaného v buňce. Kromě OXPHOS v mitochondriích probíhá i metabolismus aminokyselin, oxidace mastných kyselin či část močovinového cyklu. Kvůli těmto procesům bývá mitochondrie označována jako hlavní metabolická organela eukaryotních buněk<sup>30</sup>.

Mitochondrie vytvářejí dynamickou bohatě se větvící síť (**Obrázek 2B**, str. 20) napříč celou buňkou. Uspořádání těchto organel, jejich velikost a ultrastrukturální změny odráží metabolický stav buňky<sup>31</sup>. Jakékoliv narušení mitochondriální homeostázy a dynamiky aktivuje různé signální dráhy, které indukují buněčnou smrt a apoptózu<sup>32</sup>. HN patří mezi nemoci způsobené mutací v nemitochondriálním genu pro HTT, která sekundárně ovlivňuje mitochondriální metabolismus. Tyto změny mohou hrát důležitou roli v patogenezi tohoto onemocnění<sup>33</sup>.

## A Mitochondrie



## B Mitochondriální síť



**Obrázek 2:** A. Ultrastruktura mitochondrie v cytoplazmě (elektronmikroskopický snímek). B. Mitochondriální síť (epifluorescenční snímek). Mitochondrie je nitrobuněčná organela ohraničena dvěma membránami – vnitřní a vnější. Prostor uvnitř organely vyplňuje mitochondriální matrix. Mitochondrie vytvářejí dynamickou síť napříč celou buňkou. Převzato a upraveno podle <sup>34</sup>.

### 1.4 Systém oxidační fosforylace – syntéza ATP v mitochondriích

Mitochondrie jsou vysoce dynamické organely, které mají v buňce mnoho nenahraditelných funkcí. Mezi ty nejdůležitější lze zařadit produkci ATP a tvorbu nízkých hladin ROS pro buněčnou signalizaci. Obě tyto funkce jsou propojeny skrz systém oxidační fosforylace (OXPHOS)<sup>35</sup>.

Systém OXPHOS je složen z dýchacího řetězce (též nazývaný elektronový transportní řetězec, ETC, z angl. *electron transport chain*), který je tvořen komplexy I–IV, a z ATP syntasy, někdy taky označované jako komplex V. Tyto komplexy jsou ukotveny ve vnitřní mitochondriální membráně. Součástí systému OXPHOS jsou

i mobilní elektronové přenašeče – koenzym Q (ubichinon) a cytochrom *c*. Skrz ETC dochází k postupnému transportu elektronů ze substrátů NADH a FADH<sub>2</sub>, které vznikají v Krebsově cyklu, až na finální akceptor elektronů, kterým je molekulární kyslík. Při přenosu elektronů pumpují komplexy I, III a IV protony do mezimembránového prostoru, čímž na vnitřní mitochondriální membráně vzniká elektrochemický protonový gradient, který využívá ATP syntasa na tvorbu ATP. Systém OXPHOS schematicky znázorňuje **Obrázek 3** (str. 25).

#### 1.4.1 Komplex I (NADH:ubichinon oxidoreduktasa)

Komplex I nazývaný i NADH:ubichinon oxidoreduktasa (NQR) je největší enzym ETC, který má charakteristický tvar písmena L. Jeho větší část je zakotvená ve vnitřní mitochondriální membráně a jeho menší raménko zasahuje do mitochondriální matrix<sup>36</sup>. Mitochondriální komplex I se skládá ze 46 podjednotek s celkovou hmotností přibližně 980 kDa<sup>37</sup>. Bioenergetickou funkci enzymu zabezpečuje tzv. katalytické jádro složené ze 14 podjednotek. Sedm z nich je hydrofobních a kódovaných mtDNA, zbylých sedm je hydrofilních<sup>38</sup>.

Komplex I je prvním enzymem pro vstup elektronů z Krebsova cyklu do ETC. Elektrony z redukovaného kofaktoru NADH produkovaného Krebsovým cyklem jsou přeneseny na membránový přenašeč elektronů – ubichinon – který pak vstupuje do Q-cyklu, kde se redukuje na ubichinol. Přenos elektronů komplexem I zabezpečuje kofaktor flavinmononukleotid (FMN) a sedm železo-sirných center (FeS klastry)<sup>35</sup>. Redukce ubichinonu indukuje konformační změnu membránové části komplexu I, která vede k translokaci čtyř protonů z matrixu do mezimembránového prostoru. Transfer dvou elektronů z NADH na ubichinon je tedy spojen s translokací čtyř protonů<sup>36</sup>.

Komplex I zajišťuje asi 40 % protonmotivní síly potřebné k syntéze ATP<sup>39</sup>. Několik neurodegenerativních onemocnění (Parkinsonova choroba, dystonie, Leberova hereditární optická neuropatie) je spojeno s mutacemi v genech kódujících podjednotky tohoto komplexu<sup>40</sup>.

#### 1.4.2 Komplex II (sukcinátdehydrogenasa)

Komplex II nebo sukcinátdehydrogenasa (SDH) je enzym, který propojuje Krebsův cyklus se systémem OXPHOS. Tento komplex se skládá ze dvou ve vodě rozpustných podjednotek (SDHA, SDHB) a dvou membránových podjednotek (SDHC, SDHD).

Všechny podjednotky jsou kódovány jadernou DNA. Mutace v genech kódujících tento komplex se mohou manifestovat jako primární mitochondriální onemocnění nebo jako dispozice k nádorovému bujení<sup>41</sup>.

Komplex II je druhým nezávislým vstupem elektronů do ETC. Tento enzym oxiduje sukcinát na fumarát a přenáší elektrony z FADH<sub>2</sub> přes tři FeS klastry na ubichinon, který se přijetím elektronů redukuje na ubichinol. Komplex II nefunguje jako protonová pumpa a nepřispívá tedy ke tvorbě protonového gradientu<sup>36</sup>.

#### 1.4.3 Komplex III (ubichinol:cytochrom *c* reduktasa)

Komplex III nazývaný ubichinol:cytochrom *c* reduktasa nebo cytochrom *bc*<sub>1</sub> komplex je součástí dýchacího řetězce ve formě symetrického dimeru. Jedenáct strukturních podjednotek monomeru komplexu III je kódováno 9 jadernými geny a jedním v mtDNA. Na přenosu elektronů se však podílí jenom tři z jedenácti podjednotek: cytochrom *b* kódovaný mtDNA, cytochrom *c*<sub>1</sub> a Rieskeho Fe-S protein obsahující 2Fe-2S klastr<sup>42</sup>.

Transport elektronů a translokace protonů se v rámci komplexu III odehrává podle modelu tzv. Q-cyklu. Ubichinol transportuje elektrony přes tento komplex na cytochrom *c*, přičemž se on sám oxiduje na ubichinon. Nejdříve se ubichinol (QH<sub>2</sub>) naváže na komplex III, přičemž dojde k translokaci dvou protonů z matrix do mezimembránového prostoru. Z QH<sub>2</sub> se uvolní dva elektrony – jeden putuje na Rieskeho železo-sírné centrum a druhý je transportován na cytochrom *b*. Tento elektron přijme druhá molekula koenzymu Q vázaná na komplex III za vzniku ubisemichinonu (Q<sup>•</sup>). Elektron z 2Fe-2S klastru je přenesen na cytochrom *c*<sub>1</sub>, odkud je následně přijat cytochromem *c*. Poté se naváže druhá molekula QH<sub>2</sub> na komplex III, která podstoupí stejný oxidační proces za současné redukce Q<sup>•</sup> na QH<sub>2</sub>. Q-cyklus je tímto dokončen a komplex III pumpuje další dva protony do mezimembránového prostoru<sup>35</sup>.

#### 1.4.4 Komplex IV (cytochrom *c* oxidasa)

Komplex IV nebo cytochrom *c* oxidasa (COX) je posledním enzymem mitochondriálního ETC. U člověka se tento komplex skládá ze 13 podjednotek. Tzv. katalytické podjednotky I–III jsou kódovány mtDNA a syntetizovány v mitochondriích. Další podjednotky kóduje jaderná DNA a syntetizují se na ribozomech v cytosolu<sup>43</sup>. Katalytická podjednotka I obsahuje redoxně aktivní centrum hemu *a* (Fe<sub>a</sub>) a binukleární centrum složené z hemu *a*<sub>3</sub>

(Fe<sub>a3</sub>) a Cu<sub>B</sub>. Podjednotka II obsahuje redoxně aktivní centrum Cu<sub>A</sub> a podjednotka III je zapojena do pumpování protonů<sup>35</sup>.

Redukovaný mobilní elektronový přenašeč cytochrom *c* přenáší jednotlivé elektrony z komplexu III na komplex IV, kde se molekulární kyslík redukuje na vodu. Cytochrom *c* interaguje s podjednotkou II komplexu IV a přenáší elektron na Cu<sub>A</sub> centrum. Elektrony pak putují přes hem *a* až do binukleárního centra, kde se váže kyslík a je redukován na vodu. Za současného přenosu elektronů na jednu molekulu kyslíku komplex IV pumpuje čtyři protony z mitochondriální matrix do mezimembránového prostoru<sup>35</sup>.

#### 1.4.5 F<sub>1</sub>F<sub>o</sub>ATP syntasa (komplex V)

Při přenosu čtyř elektronů přes komplexy dýchacího řetězce se redukuje jedna molekula kyslíku za vzniku dvou molekul vody. Současně komplexy ETC jako reakci na přenos elektronů pumpují deset protonů z mitochondriální matrix do mezimembránového prostoru, kde se hromadí a vytvářejí elektrochemický protonový gradient. Ten spolu s koncentrací protonů generuje proton-motivní sílu potřebnou na syntézu ATP pomocí F<sub>1</sub>F<sub>o</sub>ATP syntasy<sup>35</sup>.

Mitochondriální ATP syntasa (komplex V) je multimerní enzymový komplex složený až z 20 různých podjednotek s celkovou hmotností 600 kDa. Dvě podjednotky komplexu V (*a*, A6L) jsou kódovány mtDNA, zbytek kóduje jaderná DNA. Tento molekulární motor patří mezi ATPasy F-typu a skládá se ze dvou oddělitelných částí: F<sub>1</sub> (faktor 1) a F<sub>o</sub> (faktor způsobující citlivost ATP syntasy k oligomycinu). Doména F<sub>o</sub> je transmembránová s podjednotkovým složením  $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$ . Podjednotky  $\alpha$  a  $\beta$  vytvářejí hexamer  $\alpha_3\beta_3$ , podjednotky  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\varepsilon$  tvoří centrální stonek komplexu V. Doména F<sub>1</sub> zasahuje do mitochondriální matrix a skládá se z c-kruhu (u savců je tvořen 8 kopiemi c-podjednotky<sup>44</sup>) a podjednotek *a*, *b*, *d*, F<sub>6</sub> a OSCP. Tato doména obsahuje i řadu dalších podjednotek (*e*, *f*, *g*, A6L), které zasahují do membrány a jsou spojeny s doménou F<sub>o</sub><sup>45,46</sup>.

Komplex V syntetizuje ATP díky energii gradientu protonů, které přecházejí z mezimembránového prostoru do matrix skrz doménu F<sub>o</sub>. Tato doména pak přenáší energii na doménu F<sub>1</sub>, kde se ADP fosforyluje na ATP. Uvolněná energie způsobuje rotaci c-kruhu spolu s připojenými podjednotkami  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\varepsilon$ . Rotace podjednotky  $\gamma$  v rámci hexameru  $\alpha_3\beta_3$  pak poskytuje energii pro syntézu ATP. Tento proces se nazývá rotační

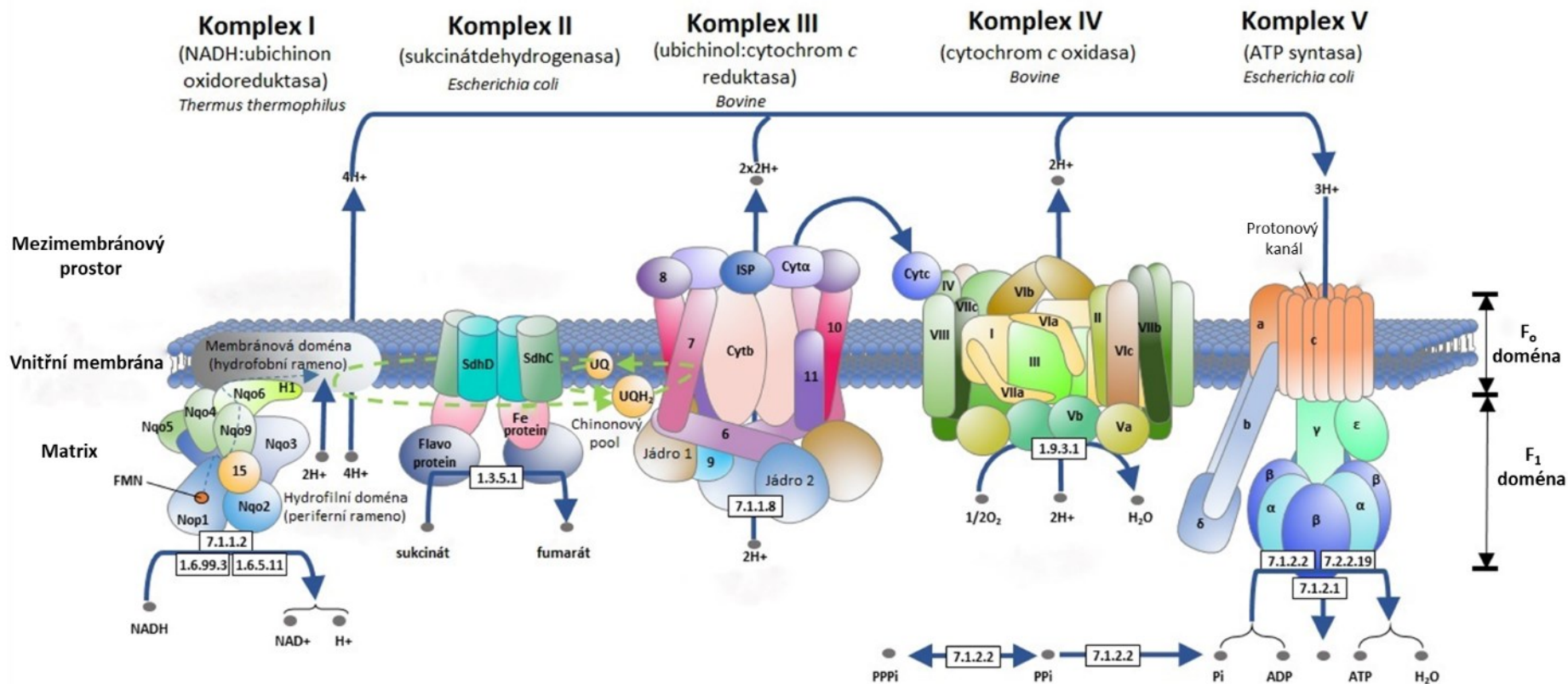
katalýza<sup>45</sup>.  $F_1F_0$ ATP syntasu lze tedy dle funkce rozdělit na dvě části: rotor (c-kruh,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ) a stator ( $\alpha_3\beta_3$ , a, b, d,  $F_6$ , OSCP)<sup>47</sup>.

#### 1.4.6 Superkomplexy

Už několik let je známo, že komplexy OXPHOS mohou spolu interagovat a shlukovat se za tvorby tzv. superkomplexů. Sdružování jednotlivých komplexů už bylo objasněno, jejich specifická funkce je však zatím neznámá<sup>48</sup>. Všechny doposud popsané superkomplexy systému OXPHOS lze rozdělit do dvou skupin. První skupina se nazývá respirasom a zahrnuje komplexy dýchacího řetězce v různých poměrech. Druhá skupina, tzv. ATP syntasom zahrnuje ATP syntasu, fosfát a ADP transportéry<sup>49</sup>.

Hlavní superkomplexy v savčích mitochondriích mají stechiometrii  $III_2IV_1$ ,  $I_1III_2$ ,  $I_1III_2IV_1$  a  $I_2III_2IV_{1-2}$  (cit.<sup>48</sup>). Komplex V se taky podílí na tvorbě vyšších oligomerních struktur. ATP syntasy savčích mitochondrií jsou uspořádány v dlouhých řadách dimerů na vrcholu krist<sup>50</sup>. V mitochondriích srdeční tkáně byl nedávno zjištěn nový typ strukturního uspořádání komplexů, kde ve formě kondenzovaného klastru byly paralelně uspořádány respirasomy spolu s ATP syntasami. Předpokládá se, že toto blízké uspořádání protonových pump a ATP syntas umožňuje přímý přenos protonů do komplexu V s maximální rychlostí a minimálními úniky<sup>49</sup>.





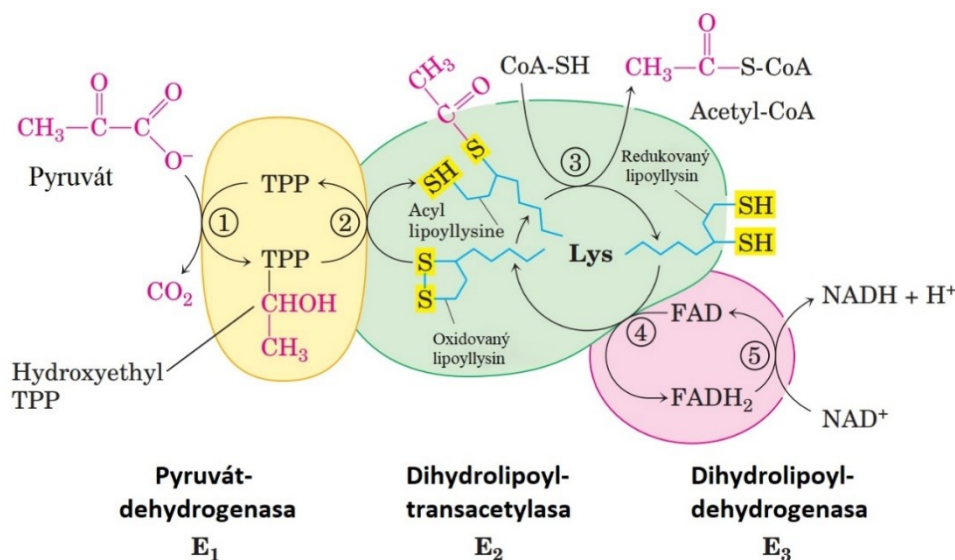
**Obrázek 3: Systém oxidační fosforylace (OXPHOS).** Schéma znázorňuje komplexy I–V systému OXPHOS. Elektrony z buněčného metabolismu jsou přes komplex I a II přeneseny na koenzym Q, který je předá komplexu III. Následný transfer elektronů na komplex IV zabezpečuje mobilní přenašeč cytochrom c. Finálním akceptorem elektronů je molekula kyslíku. Současně s transportem elektronů dochází i k translokaci protonů z matrix do meziembránového prostoru. Vytvořený elektrochemický protonový gradient využívá komplex V na syntézu ATP. Převzato a upraveno podle <sup>51</sup>.

## 1.5 Pyruvátdehydrogenasový komplex

Pyruvátdehydrogenasový komplex (PDHc) je centrálním enzymem buněčného energetického metabolismu. Tento multienzymový komplex propojuje glykolýzu s Krebsovým cyklem a v důsledku může ovlivnit i OXPHOS. Aktivita PDHc je zásadním faktorem určujícím metabolickou a bioenergetickou flexibilitu organismů vůči různým stresům ohrožujícím homeostázu. Tento enzymový komplex je lokalizován na rozhraní matrix a vnitřní mitochondriální membrány<sup>52</sup>. Všechny podjednotky PDHc jsou kódovány jadernou DNA<sup>53</sup>.

PDHc katalyzuje limitní krok metabolismu glukosy – ireverzibilní oxidační dekarboxylaci pyruvátu za vzniku acetyl-CoA (**Obrázek 4**, str. 27). Komplex reguluje tok glykolytických metabolitů do Krebsova cyklu. PDHc je složena z několika kopií třech základních enzymů: pyruvátdehydrogenasy (E1), dihydrolipoyltransacetylasy (E2) a dihydrolipoyldehydrogenasy (E3). Pro svou správnou funkci potřebuje PDHc celkově pět kofaktorů: thiamindifosfát (TPP), kyselinu lipoovou, koenzym A (CoA), NAD<sup>+</sup> a FAD<sup>54</sup>.

Mechanismus reakce katalyzované PDHc začíná dekarboxylací pyruvátu  $\alpha$ -podjednotkou enzymu E1 v přítomnosti kofaktoru TPP skrz intermediát hydroxyetyl-TPP<sup>52</sup>. Následně je hydroxyethylová skupina oxidována na acetát a přenesena na lipoát, který je amidovou vazbou připojen na  $\epsilon$ -amino skupinu lysinu enzymu E2. Tato vazba vytváří flexibilní rameno, které se pohybuje od aktivního místa E1 přes aktivní místo E2 až k E3. Acetylový zbytek je z lipoátu přenesen na CoA za vzniku výsledného produktu dekarboxylace pyruvátu, kterým je acetyl-CoA. Posledním krokem katalyzovaným PDHc je regenerace oxidované formy lipoátu prostřednictvím kofaktorů FAD a NAD<sup>+</sup> (cit. <sup>54</sup>).



**Obrázek 4: Pyruvátdehydrogenasový komplex (PDHc).** Schematické znázornění mechanismu oxidační dekarboxylace pyruvátu za vzniku acetyl-CoA katalyzované PDHc. PDHc se skládá ze tří hlavních katalytických podjednotek: E1 (pyruvátdehydrogenasa), E2 (dihydrolipoyltransacetylasa) a E3 (dihydrolipoyldehydrogenasa). Pro svou správnou funkci PDHc potřebuje pět kofaktorů: thiamindifosfát (TPP), lipoát, koenzym A (CoA),  $\text{NAD}^+$ , FAD. Převzato a upraveno podle <sup>54</sup>.

Savčí PDHc obsahuje specifickou kinasu (pyruvátdehydrogenasa-kinasa, PDK), která deaktivuje PDHc fosforylací v blízkosti aktivního místa podjednotky E1. Kromě PDK obsahuje i specifickou fosfatasa (pyruvátdehydrogenasa-fosfatasa, PDP), která enzym defosforylací reaktivuje. Aktivita PDK je modulovaná několika faktory: poměrem koncentrací ATP/ADP,  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$ , acetyl-CoA/CoA, ionty  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{pH}^{55}$ .

Současné studie potvrzují předpoklad, že PDHc hraje rozhodující roli v patofyziologii HN. V některých částech mozku (*caudate nucleus*, *putamen*, *hippocampus*) pacientů s HN byla pozorována snížená aktivita PDHc<sup>56</sup>. Novější studie na lymfoblastech pacientů s HN naopak zjistily zvýšení aktivity PDHc až o 26 % oproti zdravým kontrolám<sup>57</sup>. Je třeba provést další studie, aby bylo možné učinit jednoznačný závěr o tom, jak a proč je funkce PDHc u HN ovlivněna.

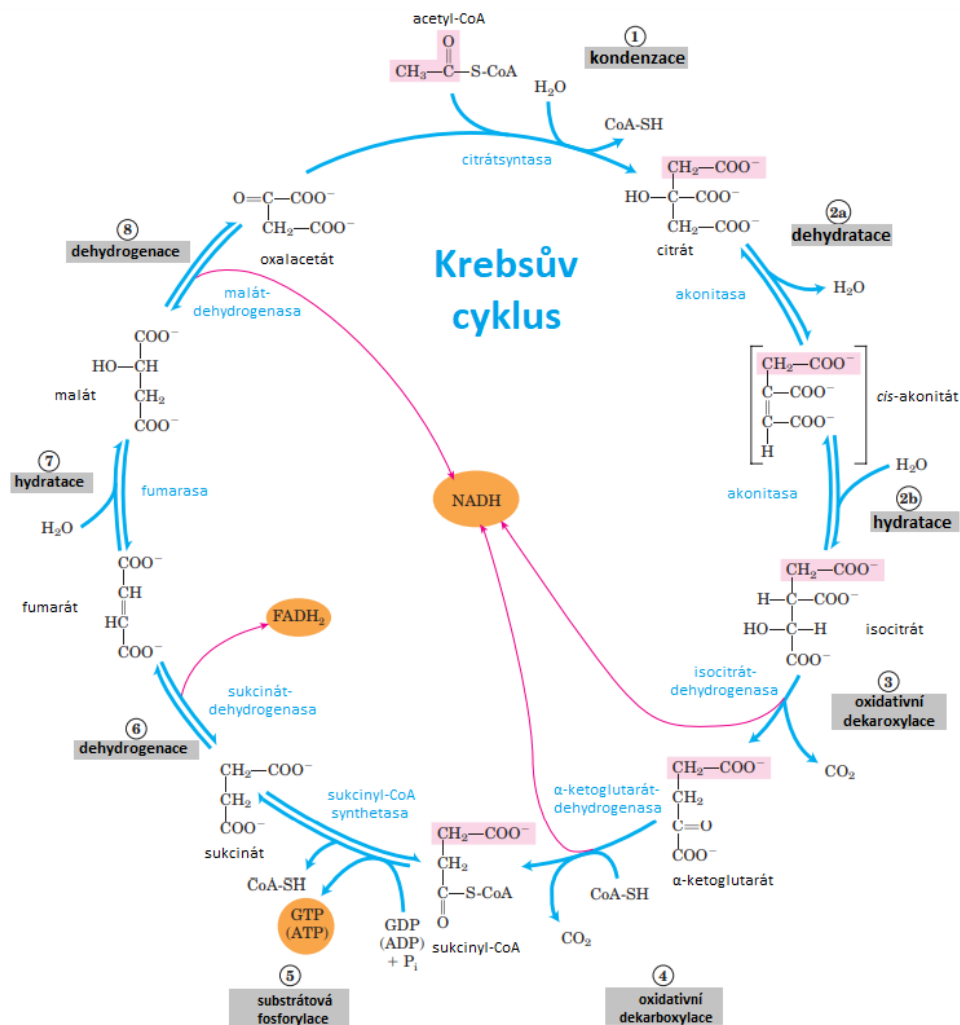
## 1.6 Krebsův cyklus a citrát syntáza jako mitochondriální biomarker

Krebsův nebo taky citrátový cyklus je centrální dráhou buněčného metabolismu. Stejně jako PDHc i Krebsův cyklus produkuje redukované kofaktory  $\text{NADH}$  a  $\text{FADH}_2$ , které jsou využívány mitochondriálním systémem OXPHOS na tvorbu energie. Enzymy Krebsova cyklu jsou u eukaryot lokalizovány v mitochondriální matrix, kde jsou

uspořádaný ve formě nadmolekulárního komplexu (tzv. „Krebsův metabolon“), který interaguje s ETC<sup>58</sup>. Všechny enzymy Krebsova cyklu jsou kódovány jadernou DNA<sup>53</sup>.

Acetyl-CoA produkovaný PDHc podléhá následné oxidaci v citrátovém cyklu. V prvním kroku Krebsova cyklu (**Obrázek 5**, str. 29) acetyl-CoA podstupuje kondenzaci s oxalacetátem za vzniku citrátu. Tento krok je katalyzován enzymem citrátsyntasou. Citrát je pak přeměněn na isocitrát, který je dekarboxylován na  $\alpha$ -ketoglutarát. Molekula  $\alpha$ -ketoglutarátu podléhá oxidační dekarboxylaci za vzniku energeticky bohatého sukcinyl-CoA a následně sukcinátu. Dehydrogenací sukcinátu vzniká fumarát a jeho hydratací malát. Ten podstupuje dehydrogenaci za vzniku oxalacetátu, který pak může reagovat s dalším acetyl-CoA<sup>54</sup>.

Citrátsyntasa (CS) je enzym ovlivňující rychlost Krebsova cyklu. Má klíčovou roli v regulaci tvorby energie prostřednictvím mitochondriální respirace. Tento enzym je inhibován ATP, NADH a deriváty mastných kyselin<sup>59</sup>. Aktivita CS se často používá jako biomarker obsahu a funkce mitochondrií. Předchozí studie ukázaly úzkou souvislost mezi změnou aktivity CS a morfologickou změnou obsahu mitochondrií po dlouhodobé elektrické stimulaci kosterního svalu králíka<sup>60</sup>. Bylo zjištěno, že aktivita CS ve svalech se zvyšuje při fyzické aktivitě a klesá s postupným stárnutím či při metabolických poruchách, jako je například diabetes mellitus 2. typu<sup>61</sup>.



Obrázek 5: Krebsův cyklus – schéma jednotlivých reakcí. Převzato a upraveno podle <sup>54</sup>.

## 1.7 Mitochondrie a jejich role v buněčné bioenergetice v kontextu neurodegenerativních onemocnění

Jak už bylo zmíněno, jedním z hlavních znaků HN je odumírání neuronů v části koncového mozku označované *corpus striatum*. Právě mitochondriální biogeneze hraje ústřední roli v přežití a aktivitě neuronů. Neurony představují postmitotické buňky s limitovanou schopností vlastní regenerace, takže narušení aktivity, integrity, mobility a hemostázy mitochondrií má široký vliv na funkci a údržbu neuronů <sup>62</sup>.

Mezi klíčové úlohy mitochondrií v neuronech lze zařadit ATP produkci, homeostázu  $\text{Ca}^{2+}$  iontů, produkci reaktivních forem kyslíku (ROS, z angl. *reactive oxygen species*) a antioxidační aktivitu<sup>32</sup>. Neurony jsou buňky s vysokou energetickou náročností, které většinu vytvořeného ATP spotřebovávají na udržení neuronálních funkcí, zejména neurotransmise<sup>62</sup>. Kvůli nenahraditelným funkcím mitochondrií

v neuronech si tyto buňky vyvinuly aparát kontroly kvality mitochondrií, který udržuje jak kvalitu fungování, tak i počet mitochondrií v buňce<sup>32</sup>.

ROS mají v buňce několik fyziologických funkcí, z nich nejdůležitější je buněčná signalizace. Mnohem častěji se však zmiňují v souvislosti s patologickými procesy. ROS jsou hlavním zdrojem oxidačního stresu, který je častou příčinou neurodegenerativních onemocnění. Mezi hlavní zdroje ROS v neuronech patří přenos elektronů během procesu OXPHOS a také funkce enzymů jako je pyruvátdehydrogenasa, glycerol-3-fosfátdehydrogenasa a další. Mitochondrie má širokou enzymovou výbavu, pomocí které se chrání vůči generovaným ROS. Ta zahrnuje enzymy jako je katalasa, superoxidodismutasa, glutathionreduktasa a mnoho dalších. Poškození mitochondrií vede ke zvýšení ROS v neuronech a způsobuje jejich degeneraci či smrt<sup>32</sup>.

Kromě ochrany neuronů vůči ROS mitochondrie uskladňují  $\text{Ca}^{2+}$  ionty, čím regulují homeostázi vápníku v buňce.  $\text{Ca}^{2+}$  ionty zvyšují míru respirace, regulaci systému OXPHOS a míru ATP produkce<sup>63</sup>. Mezi generací ROS a vápníkem je vzájemné propojení. Během mitochondriální tvorby ROS mění  $\text{Ca}^{2+}$  ionty konformaci komplexů I – IV dýchacího řetězce, což vede ke zvýšené produkce ROS<sup>64</sup>.

Jeden z hlavních mechanismů kontroly kvality mitochondrií je mitochondriální fúze a dělení. Pokud v procesu dělení vznikne poškozená mitochondrie, je automaticky degradována buněčným procesem mitochondriální autofagie, tzv. mitofagie. Ten spočívá v pohlcení abnormálních mitochondrií autofagozomy<sup>65</sup>. Hladina ROS v buňce je hlavním faktorem pro urychlení procesu mitochondriálního dělení, kterého se účastní proteiny Fis1 (z angl. *fission 1 protein*) a Drp1 (z angl. *dynamin-related protein 1*). Protein Drp1 má vysokou míru exprese v mozku a zastává klíčovou roli v přežívání neuronů<sup>66</sup>. Mitochondriální fúze se v buňce realizuje za účasti proteinů Mfn1 (mitofusin1), Mfn2 (mitofusin2) a OPA1 (z angl. *optic atrophy 1 protein*)<sup>67</sup>. Za normálních podmínek a při nízké úrovni oxidačního stresu převládá mitochondriální fúze nad jejich dělením<sup>68</sup>. Bylo zjištěno, že nerovnováha mezi fúzí a štěpením mitochondrií hraje centrální roli u neurodegenerativních onemocnění<sup>69</sup>.

### 1.7.1 Mitochondrie a jejich patologie u Huntingtonovy nemoci – vliv mutovaného huntingtinu na fyziologii mitochondrií

Mitochondriální dysfunkce a oxidační stres doprovází řadu neurodegenerativních onemocnění. Zatím však není jasné, zda je mitochondriální dysfunkce zjištěná u HN příčinou, nebo pouze průvodním jevem neuronální toxicity<sup>21</sup>.

Bylo prokázáno, že mitochondrie interagují s agregovanými proteiny u mnoha neurodegenerativních poruch, jako je Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba či HN. mHTT, který je exprimován u pacientů s HN, ovlivňuje pohyb, údržbu, integritu, funkci, dynamiku a homeostázu mitochondrií a činí neurony zranitelnými vůči degeneraci<sup>32</sup>.

Souvislost mezi HN a mitochondriálním poškozením byla prokázána na poklesu mitochondriálního energetického metabolismu, nerovnováze vápníku a vyšší hladině reaktivních forem kyslíku. U pacientů s HN byla pozorována snížená aktivita komplexů I–IV dýchacího řetězce i aktivita jiných důležitých enzymů energetického metabolismu<sup>21</sup>. Na kožních fibroblastech pacientů s HN v porovnání se zdravými jedinci bylo prokázáno snížení počtu krist, menší mitochondriální hustota a funkční poškození mitochondrií<sup>70</sup>.

Už teď je známo vícero způsobů, kterými mHTT negativně ovlivňuje fyziologické funkce mitochondrií – snižuje produkci energie a membránový potenciál, narušuje homeostázu vápníku, zvyšuje oxidační stres a spouští apoptotické dráhy zprostředkované kaspasou. Tyto mitochondriální defekty jsou pravděpodobně výsledkem interakce mHTT s vnější mitochondriální membránou. mHTT také nepřímo působí i na biogenezi a funkci mitochondrií tím, že reguluje genovou expresi klíčového transkripčního regulátoru mitochondriální biogeneze a respirace, PGC1- $\alpha$ <sup>21</sup>. Mechanismy, kterými mHTT způsobuje mitochondriální dysfunkci shrnuje **Obrázek 6** (str. 33).

U pacientů s HN bylo pozorováno narušení rovnováhy mitochondriální fúze a dělení. S postupem nemoci dochází k zvyšování hladiny proteinů Fis1 a Drp1, zatímco míra exprese Mfn1/2 klesá<sup>71</sup>. Studie na HN modelech ukazují, že zvýšená míra mitochondriálního dělení je výsledkem vazby mHTT na Drp1 protein<sup>72</sup>. V procesu zvýšeného dělení dochází častěji ke vzniku defektních mitochondrií. Na to, aby se jich nervová buňka zbavila a ochránila se tak před apoptózou, využívá proces mitochondriální autofagie (mitofagie). U HN však mHTT interaguje s autofagickými receptory a blokuje jejich vazbu na defektní mitochondrie<sup>73</sup>.

Mitochondrie jsou hlavní orgány v řízení apoptózy a buněčné smrti. Vnitřní apoptotická dráha spuštěná buněčným stresem nebo poškozením zahrnuje tvorbu pórů v mitochondriální membráně a uvolnění cytochromu *c* do cytoplazmy. Tvorbu pórů indukuje pro-apoptická rodina proteinů Bcl-2 (z angl. *B-cell lymphoma 2 protein*)<sup>74</sup>. Cytochrom *c* po uvolnění do cytoplazmy skrz různé mediátory aktivuje kaspasu-3 a kaspasu-7 jako finální apoptotické enzymy<sup>75</sup>. Studie na svalových buňkách HN pacientů ukázaly, že mHTT zvyšuje expresi pro-apoptického proteinu z rodiny Bcl-2. Stejně působí mHTT i na proteiny mitochondriálního dělení Fis1 a Drp1. Lze tedy říct, že mHTT působí jako silný modulátor mitochondriálního dělení a apoptózy<sup>32</sup>.

Mutovaný HTT v neuronech také ovlivňuje expresi některých genů. Z nich nejvýznamnější jsou geny pro tumor-supresorový protein p53, BDNF, CREB protein (z angl. *cAMP response element binding protein*) či PGC1- $\alpha$ . U pacientů s HN byla po smrti detekována snížená hladina centrálního proteinu mitochondriální biogeneze PGC1- $\alpha$  v *corpus striatum*. Pokles exprese tohoto proteinu měl za následek snížení exprese cytochromu *c* a komplexu IV<sup>76</sup>.

Mutovaný HTT v neuronech striata způsobuje přesun hlavního senzoru buněčného metabolismu – AMP-aktivované proteinkinasy (AMPK) – do jádra buňky. To má za následek snížení hladiny Bcl-2 proteinů a následnou apoptózu. Aktivace AMPK má naopak neuroprotektivní charakter a vede ke zvýšení exprese PGC1- $\alpha$ , který zvyšuje hladinu ATP a mitochondriální biogenezi<sup>32</sup>. Bylo dokázáno, že mHTT narušením strukturální integrity mitochondrií snižuje jejich bioenergetickou aktivitu a syntézu ATP<sup>77</sup>.

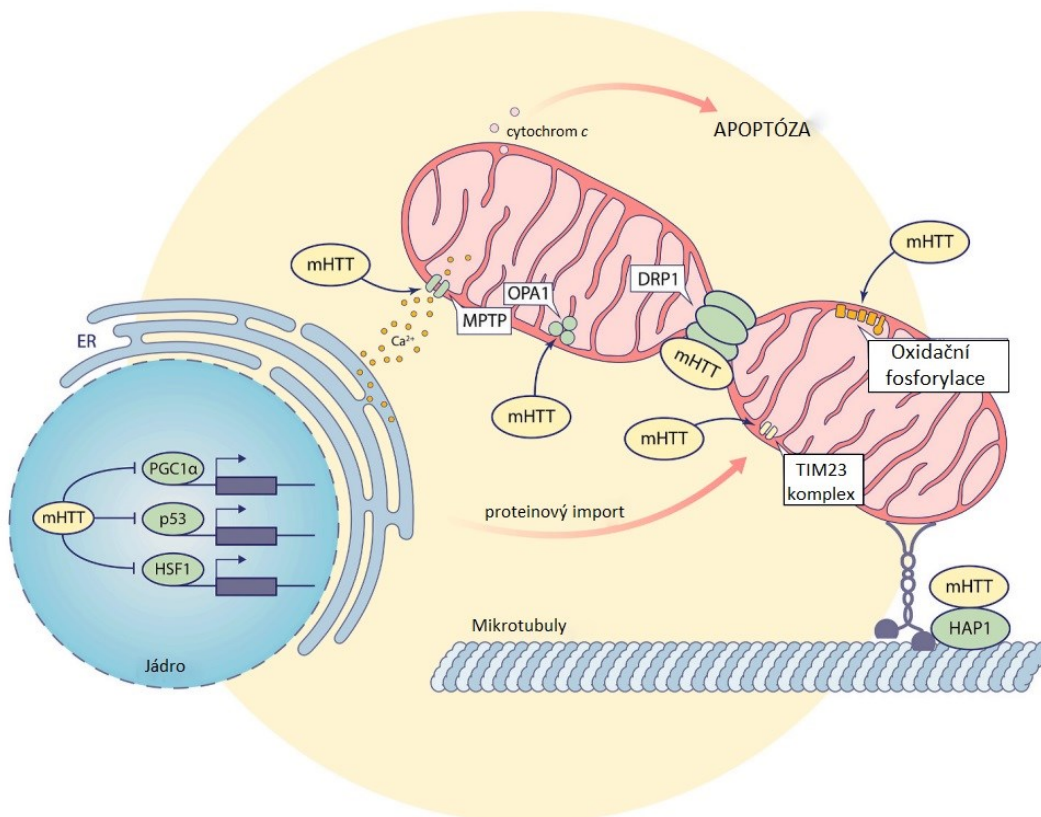
Protein BDNF má klíčovou roli ve vývoji neuronů. Jeho interakcí s buněčným receptorem TrkB (z angl. *tropomyosin receptor kinase B*) se aktivuje signální kaskáda, která přes CREB aktivuje PGC1- $\alpha$ . Jako důsledek interakce mHTT s BDNF dochází u pacientů s HN k poklesu hladiny proteinu BDNF v oblasti striata. To by mohlo být důvodem progresu tohoto onemocnění<sup>32</sup>.

Na lidských i zvířecích modelech HN byla zjištěna porucha homeostázy vápníku, která může být přímo nebo nepřímo indukována mHTT. Tento mutovaný protein zvyšuje influx  $\text{Ca}^{2+}$  iontů do mitochondrií, což narušuje syntézu ATP a vede k apoptóze. mHTT indukuje otevření mitochondriálního permeabilního tranzitního póru (mPTP), který



umožňuje vstup  $\text{Ca}^{2+}$  do mitochondrie skrz vnitřní mitochondriální membránu, uvolňování cytochromu *c* do cytoplazmy a spuštění apoptózy<sup>78</sup>.

U pacientů s HN jsou mitochondrie hlavní cílovou organelou mHTT, který působí na jejich biogenezi a dynamiku. Mnohé studie naznačují, že úprava funkce a biogeneze mitochondrií by mohla ochránit neurony v oblasti striata před toxicitou mHTT a zpomalit tak progresi HN<sup>32</sup>.



**Obrázek 6: Schéma různých mechanismů, kterými mutovaný huntingtin (mHTT) způsobuje mitochondriální dysfunkci v neuronech.** Na transkripční úrovni mHTT ovlivňuje expresi genů *PGC1-α*, *p53* a *HSF1*. mHTT také snižuje enzymovou aktivitu komplexů systému OXPHOS, narušuje interakci mikrotubul s mitochondriemi a homeostázi vápníku. Má vliv i na dynamiku a transport mitochondrií, import proteinů do mitochondrií a buněčnou smrt. DRP1 – dynamin-related protein 1, ER – endoplazmatické retikulum, HAP1 – huntingtin-associated protein 1, HSF1 – transkripční faktor tepelného šoku, MPTP – mitochondriální permeabilní tranzitní pór, p53 – tumor-supresorový protein p53, *PGC1α* – centrální protein mitochondriální biogeneze. Převzato a upraveno podle<sup>79</sup>.

### 1.7.2 Postižení bioenergetického metabolismu v periferních tkáních u Huntingtonovy nemoci

Mozek využívá přibližně 20 % celkové energie spotřebované lidským tělem. Jakékoliv změny mitochondriálního metabolismu proto mají největší dopad na fyziologii a funkci

mozku. Bioenergetické deficity pacientů s HN však nepostihují jenom mozek, ale pozorujeme je i v periferních tkáních, jako jsou kosterní svaly, krevní buňky či kožní fibroblasty. V těchto tkáních byla také potvrzena exprese mHTT, což otevřelo další možnosti studia mitochondriálního deficitu v lépe dostupném biologickém materiálu<sup>34,80</sup>.

Atrofie kosterního svalstva je považována za sekundární k neurologickým příznakům a přispívá k úbytku hmotnosti pacientů s HN. Postižení svalové tkáně bylo dokumentováno u maratonského běžce, který byl nositelem mutovaného *HTT* genu (43 CAG repetice). Ještě před nástupem chorey se u něho objevila pomalu progredující myopatie s deficitem komplexu IV systému OXPHOS. Tato studie naznačila, že mitochondriální biomarkery mohou být ve svalech detekovatelné ještě před objevením neuronálních příznaků<sup>81</sup>. Poškození kosterních svalů bylo pozorováno i na myších a prasečích transgenních modelech exprimujících mHTT<sup>82,83</sup>.

Změny v mitochondriální funkci a struktuře byly detekovány na lymfocytech izolovaných z periferní krve pacientů s HN. B-lymfocyty pacientů vykazovaly sníženou hladinu pro-apoptického proteinu Bax a snížený mitochondriální membránový potenciál<sup>84</sup>. U lymfoblastů pacientů s HN ve srovnání s kontrolními vzorky byly pozorovány ultrastrukturální změny mitochondrií – remodelace krist a změny ve velikosti mitochondrií<sup>85</sup>.

Studie z roku 2018 na kožních fibroblastech pacientů s HN odhalila snížení mitochondriální metabolické aktivity a zvýšení hladiny antioxidantních enzymů ve srovnání s buňkami zdravých dárců<sup>86</sup>. Při analýze věku nástupu nemoci na mitochondriální patologii bylo zjištěno, že mitochondriální respirace a celkový bioenergetický profil jsou významně nižší ve fibroblastech pacientů s HN s dřívějším věkem nástupu nemoci<sup>87</sup>. Výsledky těchto studií naznačily, že fibroblasty by mohli být vhodným biologickým materiálem pro hledání časných biomarkerů HN.

## 2 Cíle práce

Nástupu prvních klinických symptomů u pacientů s HN předchází asymptomatické období, které obvykle trvá 15–20 let, a kdy již pozorujeme kontinuální strukturální, biochemické a funkční změny na buněčné úrovni. Naše předchozí studie prokázaly změny v mitochondriálních parametrech ve fibroblastech pacientů s plně rozvinutou formou HN ve srovnání s kontrolami<sup>70</sup>. Chtěli jsme otestovat, zda by vybrané mitochondriální parametry ve fibroblastech mohly být použity k monitorování progresu v počátečních stádiích HN.

Cílem této práce bylo charakterizovat základní složky mitochondriálního energetického metabolismu (dýchací řetězec, Krebsův cyklus, PDHc) v kožních fibroblastech pacientů v asymptomatických, časných i pokročilých fázích rozvoje HN.

### **Díličními cíli práce bylo v kožních fibroblastech pacientů s HN:**

- charakterizovat metabolický obrat metodou kapacity mitochondriálního energetického metabolismu (KMEM)
- studovat mitochondriální respiraci a glykolytickou aktivitu sledováním spotřeby kyslíku a změn pH v reálném čase (Seahorse)
- analyzovat míru ATP produkce pomocí luminiscence
- stanovit katalytickou aktivitu pyruvátdehydrogenasového komplexu
- porovnat výsledky analýz a zhodnotit trendy studovaných parametrů v závislosti na stádiu nemoci
- korelovat výsledky s dalšími biochemickými a klinickými parametry.

## 3 Materiál a metody

### 3.1 Materiál

#### 3.1.1 Použitý biologický materiál

Analyzovaný soubor tvořily linie kultivovaných fibroblastů od 12 pacientů s geneticky prokázanou HN: 4 pacienti v asymptomatickém, 4 v časném a 4 v pokročilém stádiu nemoci (**Tabulka 3.1**). Jako kontrolní fibroblasty byly použity 4 linie kožních fibroblastů od zdravých osob (**Tabulka 3.1**). Každá studovaná skupina měla poloviční zastoupení žen a poloviční zastoupení mužů. Biologický materiál byl získán kožní biopsií po informovaném souhlasu osob ve spolupráci s Neurologickou klinikou 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy.

**Tabulka 3.1: Soubor linií kultivovaných kožních fibroblastů od pacientů s HN a kontrol.** V tabulce je popsáno stadium nemoci pacienta, jeho pohlaví, věk, počet CAG tripletů v genu pro HTT, délka trvání nemoci, hodnocení podle TFC škály a klinické hodnocení pacienta.

	Stadium	Pohlaví	Věk* (roky)	Počet CAG tripletů	Délka trvání nemoci**	TFC	Klinika
K1	kontrola	Ž	33	nd	0	13	0
K2	kontrola	Ž	47	nd	0	13	0
K3	kontrola	M	29	18/19	0	13	0
K4	kontrola	M	36	20/20	0	13	0
P1	asymptomatické	M	48	41	0	13	0
P2	asymptomatické	M	31	44	0	13	0
P3	asymptomatické	Ž	41	40	0	13	0
P4	asymptomatické	Ž	50	41	0	13	0
P5	časné	Ž	38	46	7	12	změny chování
P6	časné	M	25	45	4	10	změny chování
P7	časné	Ž	48	49	8	12	motorika
P8	časné	M	45	43	5	13	deprese
P9	pokročilé	Ž	29	52	2	13	motorika, ztráta náhledu
P10	pokročilé	M	50	45	11	8	motorika, exekutivní deficit
P11	pokročilé	M	47	45	5	12	motorika
P12	pokročilé	Ž	61	43	4	12	motorika

**Vysvětlivky:** K1–K4: kontrolní vzorky, P1–P12: pacienti s HN, Ž – žena, M – muž, nd – nedefinováno, TFC (z angl. Total Functional Capacity) – hodnotící škála celkové funkční kapacity pacientů s HN, \* – věk v době odběru kožní biopsie, \*\* – počet roků trvání nemoci od propuknutí nemoci do odběru kožní biopsie.

## Etika

Veškeré experimenty zahrnující biologický humánní materiál byly prováděny v souladu s Helsinskou deklarací z roku 1975 a byly schváleny Etickou komisí Všeobecné fakultní nemocnice v Praze, povolení č. 14/19 Grant AZV VES 2020 VFN 23.5.2019.

### 3.1.2 Použité chemikálie

[1- <sup>14</sup> C]pyruvát (0,1 μCi/μl)	PerkinElmer (USA)
[1,4- <sup>14</sup> C]sukcinát (0,1 μCi/μl)	Moravěk Biochemicals, Inc (USA)
2-Deoxy-D-glukosa	Sigma-Aldrich (USA)
Acetyl-CoA (acetyl-koenzym A)	Sigma-Aldrich (USA)
Acetyl-karnitin	Sigma-Aldrich (USA)
ADP sodná sůl (adenosin-5'-difosfát)	Sigma-Aldrich (USA)
ATP disodná sůl (adenosin-5'-trifosfát)	Thermo Scientific (USA)
Antimycin A	Sigma-Aldrich (USA)
AP5A (P <sup>1</sup> ,P <sup>5</sup> -di(adenosine-5')pentafofát)	Fluka (Švýcarsko)
Arsenit	Fluka (Švýcarsko)
Atraktylosid	Sigma-Aldrich (USA)
BSA (hovězí sérový albumin)	Sigma-Aldrich (USA)
CCCP (karbonylkyanid-3-chlorofenylhydrazon)	Sigma-Aldrich (USA)
D-(+)-glukosa	Sigma-Aldrich (USA)
Digitonin	Sigma-Aldrich (USA)
DL-dithiotreitol	Sigma-Aldrich (USA)
DMSO (dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich (USA)
DTNB (5,5-dithiobis-(2-nitrobenzoát))	Sigma-Aldrich (USA)
EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová)	Sigma-Aldrich (USA)
FCCP (karbonylkyanid- <i>p</i> -trifluoromethoxyfenylhydrazon)	Sigma-Aldrich (USA)
Fumarát sodný	Sigma-Aldrich (USA)
HClO <sub>4</sub>	Penta (ČR)
KCl	Sigma-Aldrich (USA)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dr. Kulich Pharma (ČR)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich (USA)

Koenzym A, sodná sůl (CoA)	Sigma-Aldrich (USA)
KOH	Penta (ČR)
Kreatin	Sigma-Aldrich (USA)
Kyselina trichloroctová	Penta (ČR)
Laurylmaltosid ( <i>n</i> -dodecyl $\beta$ -D-maltosid)	Sigma-Aldrich (USA)
L-glutamin	Sigma-Aldrich (USA)
L-karnitin	Sigma-Aldrich (USA)
Malát sodný	Sigma-Aldrich (USA)
Malonát	Sigma-Aldrich (USA)
MgCl <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich (USA)
NaOH	Penta (ČR)
Oligomycin	Sigma-Aldrich (USA)
Oxalacetát	Sigma-Aldrich (USA)
Oxalát draselný (K-oxalát)	Sigma-Aldrich (USA)
Pyruvát sodný	Sigma-Aldrich (USA)
Poly-L-lysin	Sigma-Aldrich (USA)
Rotenon	Sigma-Aldrich (USA)
Sukcinát sodný	Sigma-Aldrich (USA)
Thiaminpyrofosfát chlorid (TPP <sup>+</sup> )	Sigma-Aldrich (USA)
Tris/HCl	Sigma-Aldrich (USA)
[U- <sup>14</sup> C]malát (0,2 $\mu$ Ci/ $\mu$ l)	PerkinElmer (USA)
$\beta$ -nikotinamidadenindinukleotid (NAD <sup>+</sup> )	Sigma-Aldrich (USA)

#### 3.1.2.1 Komerčně dodávané reagensy

<b>Antibiotický a antimykotický roztok (ATB)</b> Antibiotic-antimycotic 100X	Biosera (Francie)
<b>BCS</b> (scintilační roztok Ecolite)	MP Biomedicals, LLC (USA)
<b>CellTiter-Glo® Buffer</b>	Promega (Francie)
<b>CellTiter-Glo® Substrate</b> (lyofilizovaný)	Promega (Francie)
<b>D5030 medium</b>	Sigma-Aldrich (USA)

<b>DMEM medium</b> (4,5 g/l glukosa, stabilní glutamin, pyruvát sodný, 3,7 g/l NaHCO <sub>3</sub> )	PAN-Biotech (Nemecko)
<b>Fetální hovězí sérum (FBS, fetal bovine serum)</b>	HyClone (USA)
<b>Folinovo reagens</b>	Penta (ČR)
<b>Fosfátový pufr PBS 10X</b> (1,54M NaCl, 56mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 10mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,4)	Lonza (Švýcarsko)
<b>Seahorse XF Calibrant Solution pH 7,4</b>	Agilent (USA)
<b>Trypsin-EDTA 10X roztok (T+E)</b> (0,5% (w/v) trypsin, 0,2% (w/v) EDTA v roztoku PBS)	Biosera (Francie)

### 3.1.2.2 Roztoky připravené v laboratoři

<b>Acetyl-CoA</b> (10mM roztok)	
<b>BSA</b> (0,2 mg/ml)	
<b>DTNB</b> (1mM roztok v 1 M Tris/HCl pufru pH 8,1)	
<b>Kpi roztok</b> (4,25 ml 119mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 45,75 ml 119mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	
<b>Laurylmaltosid</b> (15% (w/v) roztok)	
<b>Lowry A</b> (0,4% (w/v) NaOH, 2% (w/v) Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	
<b>Lowry B</b> (0,5% (w/v) CuSO <sub>4</sub> )	
<b>Lowry C</b> (1% (w/v) vínan sodnodraselný)	
<b>Oxalacetát</b> (10mM roztok v 0,1M Tris/HCl pufru pH 8,1)	
<b>Pracovní pufr pro KMEM</b> (30mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4; 75mM KCl; 8mM Tris pH 7,6; 1,6mM EDTA pH 7,4; 0,2mM AP5A)	

## 3.2 Přístroje a laboratorní vybavení

### 3.2.1 Použité přístroje

Analytické váhy ABT 220-5DNM	Kern (Německo)
Automatické mikropipety	BioTech (USA), Eppendorf (Německo), Gilson (USA), Thermo Scientific (USA)
Centrifuga Mikro 200	Hettich (Německo)
Centrifuga Universal 32R	Hettich (Německo)

Dávkovač Dispensette	Brand (Německo)
Laminární box Clean Air	Clean Air (Nizozemsko)
Luminometr GloMax-Multi+	Promega (Francie)
Mikrocentrifuga se dvěma rotory	Roth (Německo)
Mikropipeta Scepter Handheld Automated Cell Counter	Merck Millipore (USA)
Mikroskop Nikon Eclipse Ti2-U	Nikon (Japonsko)
Multikanálová pipeta Nichipet 7000	Deltalab (Španělsko)
Minitřepačka MS 3 basic	IKA-Werke (Německo)
pH metr 774	Metrohm (Švýcarsko)
Prep Station termostat na Seahorse	Agilent (USA)
Seahorse XFe24 analyzátor	Agilent (USA)
Scintilační analyzátor LS 6500	Beckman (USA)
Spektrofotometr UV-2401PC	Shimadzu (Japonsko)
TCC-Controller	Shimadzu (Japonsko)
Termoblok Accublock	Labnet International (USA)
Termostat Heratherm IMC 18	Thermo Scientific (USA)
Termostat ME-26	Julabo (Německo)
Termostat Sanyo CO <sub>2</sub> incubator	Sanyo (Japonsko)
Termostat TCH100	Laboratorní přístroje Praha (ČR)
Termostat The IncuSafe Multigas Incubator	PHCbi (Holandsko)
Třepací vodní lázeň typ 357	Elpin+ (Polsko)
Třepačka typ TS-100	Biosan (Lotyšsko)
Vortex Genie 2 mixer	Scientific Industries (USA)
<b>3.2.2 Komerčně dodávané kazety a destičky</b>	
Kazety ( <i>Seahorse extracellular flux cartridges</i> )	Agilent (USA)
24jamkové kultivační destičky ( <i>Seahorse cell culture micropates</i> )	Agilent (USA)
96jamkové mikrodestičky	Promega (Francie)



### 3.2.3 Počítačové programy použité pro analýzu

Excel 2016	Microsoft (USA)
GraphPad Prism 8.4.3	GraphPad Software (USA)
Seahorse Wave 2.4 Software	Agilent (USA)

## 3.3 Metody

### 3.3.1 Kultivace kožních fibroblastů

#### 3.3.1.1 Rozmrazování fibroblastů

Kožní fibroblasty se dlouhodobě skladují v kontejnerech s tekutým dusíkem při teplotě  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Po vyjmutí zkumavky z tekutého dusíku byly buňky rychle rozmrazeny pod proudem vlažné vody. Buněčná suspenze byla následně v laminárním boxu předem vysvíceném UV lampou napipetována do kultivační lahve o ploše  $25\text{ cm}^2$  s 5 ml přefiltrovaného DMEM média vyhřátého na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , které obsahovalo 10 % (v/v) fetálního hovězího séra (FBS) a 1 % (w/v) antibiotika (ATB). Následující ráno bylo médium odsáto pomocí Pasteurovy pipety do odpadu a do lahve bylo napipetováno 5 ml čerstvě přefiltrovaného kultivačního media.

#### 3.3.1.2 Pasážování fibroblastů

Kožní fibroblasty byly pěstovány v kultivačních lahvích o ploše  $25\text{ cm}^2$  a  $75\text{ cm}^2$ . Buňky fibroblastů byly kultivovány v 5 ml (v  $25\text{ cm}^2$  lahvích) nebo 10 ml (v  $75\text{ cm}^2$  lahvích) DMEM media s 10% (v/v) FBS a 1% (w/v) ATB do konfluence 80–100 %. Buňky byly pasážovány v laminárním boxu, který byl předem vysvícen UV lampou po dobu minimálně 30 minut. Pasážování fibroblastů probíhalo podle níže uvedeného postupu.

Nejdříve bylo z lahve odsáto médium a kultivační plocha byla opláchnuta asi 5 ml PBS (10x naředěn destilovanou vodou). Poté byl k buňkám přidán 1% (w/v) roztok T+E o objemu 750  $\mu\text{l}$  do  $25\text{ cm}^2$  lahve, resp. 1,5 ml do  $75\text{ cm}^2$  lahve. Buňky byly trypsinizovány v termostatu při  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  a 5%  $\text{CO}_2$  po dobu 10 minut. Následně bylo k buňkám přidáno 10 ml (do  $25\text{ cm}^2$  lahvích) resp. 20 ml (do  $75\text{ cm}^2$  lahvích) předem přefiltrovaného media. Obsah kultivační lahve byl důkladně rozsuspendován opětovným nasáváním pomocí sérologické pipety a poté byl rovnoměrně rozdělen do dvou lahví. Buňky v kultivačních lahvích byly následně uloženy do termostatu a dále kultivovány při  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  s 5%  $\text{CO}_2$  atmosférou. Pro následující analýzy byly použity fibroblasty v pasážích 7–18.

### 3.3.1.3 Sklizení fibroblastů pro měření kapacity mitochondriálního energetického metabolismu a aktivity pyruvátdehydrogenasového komplexu

Pro účely KMEM byly kožní fibroblasty pěstovány v čtyřech 75cm<sup>2</sup> kultivačních lahvích z každé buněčné linie do asi 80% konfluence. Pro účely měření aktivity PDHc byly použity kultivované fibroblasty ze dvou 75cm<sup>2</sup> kultivačních lahví v konfluenci 90–100 %. Procento konfluence bylo průběžně kontrolováno pod mikroskopem (*Nikon Eclipse Ti2-U*). Po dosažení vhodné konfluence bylo z kultivačních lahví přelito medium do 50ml centrifugační zkumavky a kultivační plocha byla opláchnuta 10 ml PBS. Poté bylo k buňkám přidáno 1,5 ml 1% (w/v) roztoku T+E. Buňky byly trypsinizovány v termostatu při 37 °C po dobu 10 minut a následně byly rozsuspendovány v mediu, ve kterém byly kultivovány a přeneseny do centrifugační zkumavky.

Poté byly buňky centrifugovány při 4 °C se zrychlením 350xg po dobu 5 min (*Centrifuga Hettich Universal 32R*). Po centrifugaci byla peleta buněk rozsuspendována v 8 ml ledového PBS a centrifugována za stejných podmínek. Peleta buněk pak byla rozsuspendována v 1 ml ledového PBS, přenesena do 1,5ml centrifugační zkumavky a za stejných podmínek centrifugována. Po odsátí PBS byla zjištěna hmotnost vlhké pelety (*Analytické váhy ABT 220-5DNM*).

Pro účely měření kapacity mitochondriálního energetického metabolismu (KMEM) byly buňky po zvážení rozsuspendovány v novém ledovém PBS (200 µl PBS/50 mg vlhké váhy pelety) a inkubovány s 0,1mM roztokem digitoninu (0,3 µl roztoku digitoninu/1 mg vlhké váhy pelety) po dobu 30 minut při 4 °C. Z tohoto vzorku bylo pak 100 µl využito na měření KMEM, 20 µl bylo odebráno na stanovení koncentrace proteinu dle Lowryho a 100 µl na stanovení aktivity citrátsyntasy.

### 3.3.1.4 Zmrazování fibroblastů

Laminární box byl předem vysvícen UV lampou po dobu minimálně 30 minut. Buňky napěstované do konfluence 80–100 % byly zmrazené dle následujícího postupu. Médium z kultivační lahve bylo přelito do 15ml centrifugační zkumavky, kultivační plocha byla opláchnutá asi 10 ml PBS a k buňkám byl přidán 1% (w/v) roztok T+E o objemu 750 µl do 25cm<sup>2</sup> lahve, resp. 1,5 ml do 75cm<sup>2</sup> lahve. Buňky byly trypsinizovány v termostatu při 37 °C a 5% CO<sub>2</sub> po dobu 10 minut. Následně byly rozsuspendovány v mediu, ve kterém byly kultivovány a přeneseny do 15ml centrifugační zkumavky. Poté byly buňky centrifugovány při 20 °C se zrychlením 350xg po dobu 5 min (*Centrifuga Hettich*

*Universal 32R*). Po centrifugaci byl supernatant vylit do odpadu a peleta s buňkami byla rozsuspensována v 1,0 ml DMEM média s 10% DMSO. Buněčná suspenze pak byla přenesena do zmrazovací zkumavky, která byla vložena do mrazicího boxu a spolu s ním uložena do  $-80$  °C. Následující den byly fibroblasty v kryozkumavce přeneseny do kontejneru s tekutým dusíkem, kde byly dále skladovány.

### 3.3.2 Měření kapacity mitochondriálního energetického metabolismu

Metoda měření kapacity mitochondriálního energetického metabolismu (KMEM) byla převzata z holandské laboratoře v Nijmegen. Tuto metodu prvně publikoval doktor Antoon J. M. Janssen v roce 2006 (cit.<sup>88</sup>). Metoda byla vyvinuta pro analýzu metabolismu buněk ze svalové biopsie. Pro účely její aplikace na kožní fibroblasty byla metoda KMEM optimalizována v Laboratoři pro studium mitochondriálních poruch<sup>89</sup>.

#### 3.3.2.1 Příprava inkubací pro analýzu KMEM

Samotnému měření předcházela příprava pracovního pufru pro KMEM (složení viz 3.1.2.2) a jednotlivých inkubací dle **Tabulky 3.2** (str. 44). Inkubace bez  $^{14}\text{C}$ -značených substrátů byly připraveny do alikvótů a skladovány v mrazícím boxu při  $-80$  °C. Alikvóty značených substrátů byly připraveny v koncentraci  $0,1 \mu\text{Ci}/\mu\text{l}$  a uskladňovány odděleně v objemu  $5 \mu\text{l}$  při  $-80$  °C. Měření každé buněčné linie bylo provedeno v sérii 10 inkubací obsahujících  $^{14}\text{C}$ -značený pyruvát, malát nebo sukcinát. Kromě značených substrátů inkubace obsahovaly různé donory a akceptory acetyl-CoA a inhibitory Krebsova cyklu. Jednotlivé inkubace obsahují složky o těchto koncentracích: 1mM pracovní pufr pro KMEM, 5mM  $\text{MgCl}_2$  a dle inkubace  $[1-^{14}\text{C}]$ pyruvát,  $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ malát a  $[1,4-^{14}\text{C}]$ sukcinát, 1mM pyruvát, 1mM malát, 1mM sukcinát, 2mM ADP, 5mM L-karnitin,  $2\mu\text{M}$  CCCP,  $40\mu\text{M}$  atraktylosid, 5mM malonát, 2mM acetyl-karnitin a 2mM arsenit. Na regeneraci ADP pomocí kreatinkinasy byl do všech reakcí kromě reakce č. 3 a 4 přidán 20mM kreatin.

**Tabulka 3.2: Složení inkubací pro měření KMEM.**

Inkubace	Substrát
1	[1- <sup>14</sup> C]pyruvát + malát + ADP
2	[1- <sup>14</sup> C]pyruvát + karnitin + ADP
3	[1- <sup>14</sup> C]pyruvát + malát (– ADP)
4	[1- <sup>14</sup> C]pyruvát + malát (– ADP) + CCCP
4a	[1- <sup>14</sup> C]pyruvát – karnitin + ADP
5	[1- <sup>14</sup> C]pyruvát + malát + ADP + atraktylosid
6	[U- <sup>14</sup> C]malát + pyruvát + malonát + ADP
7	[U- <sup>14</sup> C]malát + acetylkarnitin + malonát + ADP
8	[U- <sup>14</sup> C]malát + acetylkarnitin + arsenit + ADP
9	[1,4- <sup>14</sup> C]sukcinát + acetylkarnitin + ADP

*Vysvětlivky: ADP – adenosindifosfát, CCCP – karbonylkyanid-3-chlorofenylhydrazon*

Měření KMEM probíhalo ve 24 skleněných vialkách o objemu 2 ml (každá inkubace byla provedena v duplikátu). Pro každý značený substrát byl rovněž pipetován blank s přídavkem PBS místo vzorku, celkem 4 lahvičky 2x pro reakce s [1-<sup>14</sup>C]pyruvátem, a po jedné pro reakce obsahující [U-<sup>14</sup>C]malát a [1,4-<sup>14</sup>C]sukcinát. Před začátkem měření byly alikvóty pro jednu sérii 10 inkubací rozmrazeny na ledu a rozpipetovány po 35 µl do skleněných lahviček. Následně bylo do každé lahvičky přidáno 10 µl příslušného pracovního roztoku značeného substrátu, připraveného dle následující kapitoly.

### 3.3.2.2 Příprava pracovních roztoků značených substrátů pro analýzu KMEM

Každý ze značených substrátů byl rozmražen na ledu a dále se postupovalo dle **Tabulky 3.3** (str. 45). Nejdříve byl zásobní roztok značeného substrátu naředěn 100mM HCl a inkubován (*Třepací vodní lázeň typ 357, Elpin+*) při 37 °C po dobu 10 minut (amplituda 4, rychlost míchání 120 rpm). Inkubace zabezpečila vychytání samovzniklého <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>. Následně byl do roztoku přidán 20mM roztok Tris (pH 8,0) a v případě pracovního roztoku [1-<sup>14</sup>C]pyruvátu navíc 100mM roztok pyruvátu, který byl vždycky čerstvě připraven v den analýzy.

**Tabulka 3.3: Složení pracovních roztoků značených substrátů po analýzu KMEM.**

	[1- <sup>14</sup> C]pyruvát	[U- <sup>14</sup> C]malát	[1,4- <sup>14</sup> C]sukcinát
zásobní roztok příslušného substrátu (μl)	3,5	2,0	2,4
100mM HCl (μl)	13,92	8,0	9,6
100mM pyruvát (μl)	8,7	0	0
20mM Tris pH 8,0 (μl)	148	90	48
výsledný objem (μl)	174	100	60

### 3.3.2.3 Průběh analýzy KMEM

Všechny reakce pro měření KMEM byly prováděny při 37 °C (amplituda 4, rychlost míchání 120 rpm) v třepací vodní lázni (*Třepací vodní lázeň typ 357, Elpin+*) v skleněných vialkách o objemu 2 ml s víčky s filtračním papírkem a gumovým septem. Před začátkem měření byl filtrační papír na víčkách navlhčen 40 μl 1M NaOH pro jímání CO<sub>2</sub> vzniklého během reakce. Reakce byly startovány přidáním 5 μl vzorku buněčné suspenze s digitoninem (reakce 1–20) (příprava viz 3.3.1.3.) nebo 5 μl PBS (reakce 21–24). Reakce probíhala po dobu 20 minut a byla zastavena přidáním 50 μl 3M HClO<sub>4</sub> přes gumové septum pomocí mikrostříkačky Hamilton. Po skončení všech reakcí byly uzavřené lahvičky uskladněny v 4 °C po dobu 1 hodiny pro zachycení veškerého CO<sub>2</sub>. Poté byl filtrační papírek z víčka přenesen do scintilační lahvičky se 3 ml roztoku BCS, kde byl ponechán přes noc. Následující den byla změřena hodnota radioaktivity za pomoci scintilačního analyzátoru (*Beckman Coulter LS6500*). V duplikátech byly také změřeny aktivity pracovních roztoků pyruvátu, malátu a sukcinátu o objemu 10 μl v 3 ml roztoku BCS ke zjištění hodnoty DPM na 1 nmol látky.

Na měření KMEM jedné buněčné linie bylo potřeba 100 μl buněčného lyzátu. Dalších 120 μl bylo uskladněno při –80 °C na pozdější spektrofotometrické stanovení koncentrace proteinu dle Lowryho a aktivity citrát syntasy, které byly použity pro normalizaci a vyhodnocení měření KMEM. Výsledky analýzy KMEM byly zpracovány v programu *Microsoft Excel* a statisticky vyhodnoceny pomocí programu *GraphPad Prism*. Na vyhodnocení katalytické aktivity jednotlivých inkubací byl použit vztah (3.1) na následující straně.

$$A_{kat} = \frac{3 \cdot \frac{A_v}{A_s}}{c_{prot} \cdot V} \quad (3.1)$$

kde  $A_{kat}$  je katalytická aktivita inkubace ( $\text{nmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ),  $A_v$  je radioaktivita vzorku po odečtení radioaktivity blanku s PBS ( $\text{DPM} \cdot 20 \text{ min}^{-1}$ ),  $A_s$  je radioaktivita substrátu – pyruvátu, malátu anebo sukcinátu ( $\text{DPM} \cdot \text{nmol}^{-1}$ ),  $V$  je objem vzorku ( $5 \cdot 10^{-3} \text{ ml}$ ),  $c_{prot}$  je koncentrace proteinu v buněčném lyzátu ( $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ).

### 3.3.3 Stanovení koncentrace proteinu podle Lowryho

Metoda stanovení koncentrace proteinu pomocí Folinova reagens byla publikována v roce 1951 americkým biochemikem Lowrym<sup>90</sup>. Vzorek lyzátu fibroblastů o objemu 20  $\mu\text{l}$  byl naředěn 20  $\mu\text{l}$   $\text{dH}_2\text{O}$  a důkladně rozsuspendován. Poté bylo 5  $\mu\text{l}$  naředěného vzorku smícháno se 195  $\mu\text{l}$   $\text{dH}_2\text{O}$ . Všechny vzorky byly připraveny v duplikátu. Následně byly připraveny kalibrační roztoky naředěním zásobního roztoku BSA ( $0,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) podle **Tabulky 3.4**. Kalibrační roztoky byly připraveny v duplikátu.

**Tabulka 3.4: Složení kalibračních roztoků pro stanovení koncentrace proteinu dle Lowryho.**

Zkumavka č.	Objem $\text{dH}_2\text{O}$ ( $\mu\text{l}$ )	Objem zásobního roztoku BSA ( $\mu\text{l}$ )	Množství BSA ( $\mu\text{g}$ )
1	175	25	5
2	150	50	10
3	125	75	15
4	100	100	20
5	75	125	25
6	200	0	0

Poté byl připraven roztok MIX smíšením roztoků A, B a C (složení viz 3.1.2.2) v poměru 48:1:1. Nejprve byly smíchány roztoky B a C a pak k nim byl přidán roztok A. K analyzovaným i ke kalibračním vzorkům byl přidán 1 ml roztoku MIX, vzorky byly vortexovány a inkubovány 15 minut při pokojové teplotě. Pak bylo ke všem vzorkům přidáno 100  $\mu\text{l}$  čerstvě naředěného Folinova reagens (ředěn  $\text{dH}_2\text{O}$  v poměru 1:1). Roztoky byly okamžitě vortexovány a ponechány stát 30 minut při laboratorní teplotě. Poté byla na spektrofotometru (*Spektrofotometr UV-2401PC*) změřena absorbance všech vzorků při 700 nm. Na výpočet koncentrace proteinu ve vzorku,  $c_{prot}$  ( $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) byl použit vztah (3.2) na následující straně.

$$c_{prot} = 2 \cdot \frac{\bar{m}}{V}, \quad (3.2)$$

kde  $\bar{m}$  je aritmetický průměr obsahu proteinu ve vzorku změřen pomocí spektrofotometru ( $\text{mg} \cdot 10^{-3}$ ),  $V$  je objem vzorku ( $5 \cdot 10^{-3}$  ml).

### 3.3.4 Stanovení aktivity citrátsyntasy

Princip stanovení aktivity citrátsyntasy (CS) je založen na měření absorpce –SH skupiny volného CoA pomocí Ellmanova reagens (5,5-dithiobis-(2-nitrobenzoát), DTNB). Tuto metodu prvně popsal a publikoval P. A. Srere v roce 1969 (cit. <sup>91</sup>). Merkaptidový iont má silnou absorpci při 412 nm, proto lze tuto reakci sledovat při této vlnové délce.

Ke 100  $\mu\text{l}$  buněčného lyzátu bylo přidáno 10  $\mu\text{l}$  15% (w/v) laurylmaltosidu a směs byla inkubována na ledu po dobu 15 minut. Zbytky tkáně byly zcentrifugovány při laboratorní teplotě na stolní mikrocentrifuze (*Centrifuga Hettich Mikro 200*) při 10 000xg po dobu 3 minut. Supernatant byl pomocí automatické pipety přenesen do nové mikrozkuřavky a následně byla stanovena aktivita CS v 30  $\mu\text{l}$  vzorku. Měření každého vzorku bylo provedeno v duplikátu. Reakční směs pro změření pozadí obsahovala 0,1M Tris/HCl pH 8,1; 0,1mM DTNB a 0,5mM acetyl-CoA a 30  $\mu\text{l}$  vzorku. Aktivita byla zaznamenána na spektrofotometru (*Spektrofotometr UV-2401PC*) při 412 nm, teplotě 37 °C po dobu 120 sekund. Následně byl do směsi přidán 0,5mM oxalacetát, směs byla promíchána a aktivita byla sledována za stejných podmínek jako pozadí. Specifická aktivita citrátsyntasy, SA ( $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ) byla vypočtena podle vztahu

$$SA = \frac{10^3 \cdot \overline{\Delta A} \cdot V}{\varepsilon \cdot c_{prot} \cdot l \cdot V_{vz}}, \quad (3.3)$$

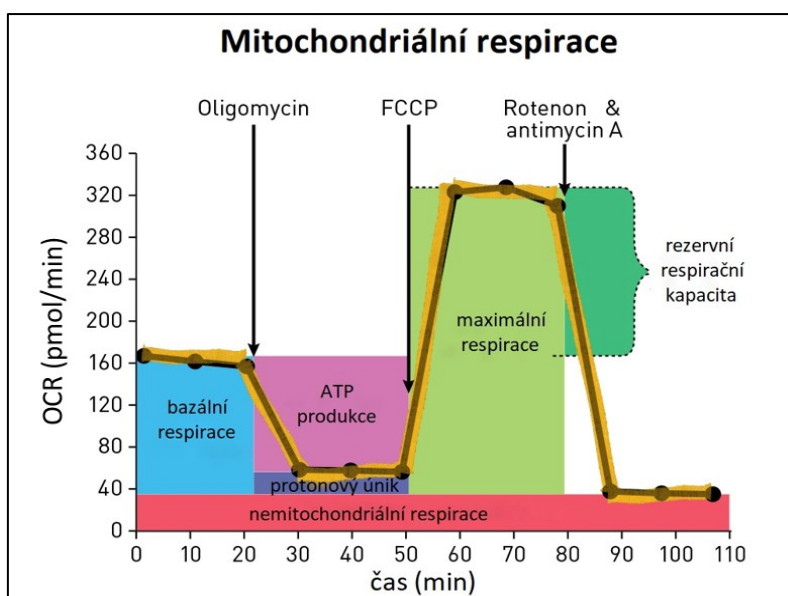
kde  $\overline{\Delta A}$  je aritmetický průměr rozdílu aktivity a pozadí ( $\text{min}^{-1}$ ),  $V$  je objem reakční směsi (1 ml),  $\varepsilon$  je molární absorpční koeficient ( $13,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ),  $c_{prot}$  je koncentrace proteinu (stanovená metodou dle Lowryho) ( $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ),  $l$  je délka absorpčního prostředí (1 cm),  $V_{vz}$  je objem vzorku ( $30 \cdot 10^{-3}$  ml).

### 3.3.5 Analýza na přístroji Seahorse XFe24

Analyzátor *Seahorse Xfe24* (Agilent) se používá na měření metabolismu živých buněk v reálném čase v 24jamkovém formátu. Analyzátor mimo jiné umožňuje měřit dvě funkce buněčného metabolismu – mitochondriální respiraci<sup>92</sup> a glykolytickou aktivitu<sup>93</sup>. Během jednoho cyklu mohou být do každé jamky injikovány až čtyři různé reagensy. Obvykle

se používají: oligomycin (inhibitor  $F_1F_0$ ATP syntasy), FCCP (karbonylkyanid-*p*-trifluoromethoxyfenylhydrazon, tzv. protonofor, který umožní návrat protonů do matrix mitochondrií), rotenon (inhibitor komplexu I systému OXPHOS), antimycin A (inhibitor komplexu III systému OXPHOS) a 2-deoxy-D-glukosa (inhibitor glykolýzy).

Mitochondriální respirace buněk se měří jako rychlost spotřeby kyslíku (OCR, z angl. *oxygen consumption rate*) v závislosti na čase (**Obrázek 7**). Hodnota OCR je měřena v jednotkách  $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}$ . Pomocí injekčních portů se k buňkám postupně přidávají modulatory respirace, které umožňují stanovit základní parametry mitochondriální funkce: bazální, maximální a nemitochondriální respiraci, respiraci spojenou s ATP, protonový únik a rezervní respirační kapacitu.



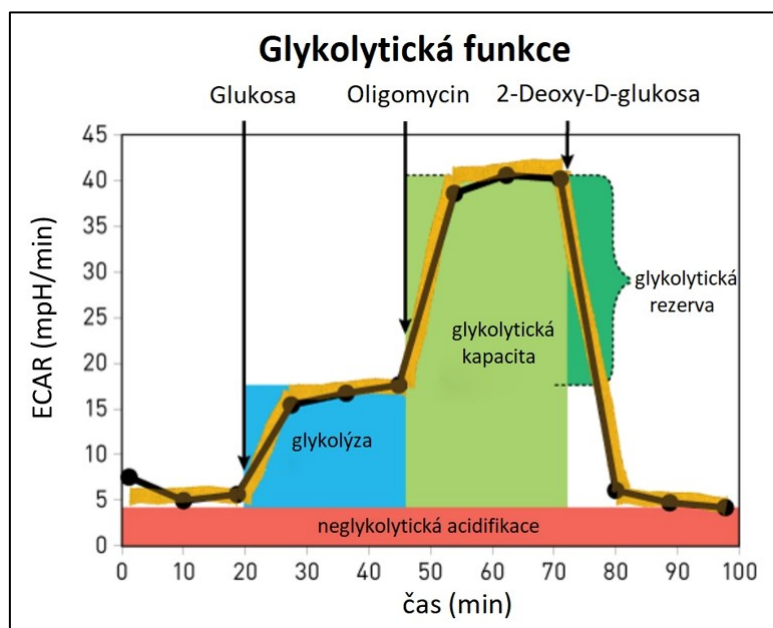
**Obrázek 7: Mitochondriální respirace** – průběh závislosti rychlosti spotřeby kyslíku (OCR) buňkami na čase. FCCP – karbonylkyanid-*p*-trifluoromethoxyfenylhydrazon. Převzato a upraveno podle <sup>94</sup>.

V první části měření je možné změřit bazální respiraci, která představuje energetické požadavky buněk potřebné na udržení jejich fyziologické funkce. Po přidání inhibitoru ATP syntasy oligomycinu dojde k poklesu elektronového průtoku přes ETC, což má za následek snížení spotřeby kyslíku. Tento pokles v OCR ukazuje míru respirace spojenou s ATP produkcí a také zbývající respiraci, která s produkcí ATP nesouvisí, tzv. protonový únik. Druhým přidaným modulátorem respirace je FCCP, který způsobí narušení protonového gradientu a stimulaci ETC. Spotřeba kyslíku komplexem IV tak dosáhne maximální hodnoty. Hodnota OCR po přidání FCCP umožní určit i rezervní respirační kapacitu jako rozdíl maximální a bazální respirace, která poukazuje na



schopnost buněk reagovat na zvýšenou energetickou potřebu. Třetím přídatkem je směs inhibitorů rotenonu a antimycinu A, které umožní určit míru nemitochondriální respirace.

Glykolytická funkce se měří jako závislost rychlosti extracelulární acidifikace (ECAR, z angl. *extracellular acidification rate*) buněčného prostředí na čase (**Obrázek 8**). Graf zobrazuje změny pH v jednotkách  $\text{mpH}\cdot\text{min}^{-1}$  (mili pH za minutu). Přidáním různých reagensů během jednoho měření lze určit hodnoty glykolýzy, glykolytické kapacity, neglykolytické kapacity a glykolytické rezervy.



**Obrázek 8: Glykolytická funkce** – průběh závislosti rychlosti extracelulární acidifikace (ECAR) buněčného prostředí na čase. Převzato a upraveno podle <sup>93</sup>.

Měření se provádí v mediu bez glukosy a pyruvátu, aby buňky nevyužívaly glykolýzu. Hodnota ECAR za těchto podmínek se označuje jako neglykolytická acidifikace. První injikovanou reagensí je glukosa, kterou buňky začnou katabolizovat na pyruvát, za současné produkce NADH, ATP, vody a protonů. Zvýšení koncentrace protonů v mediu vede ke zvýšení hodnoty ECAR, která ukazuje hodnotu glykolýzy za bazálních podmínek. Druhou přidanou reagensí je oligomycin, který inhibuje mitochondriální ATP produkci, a tím stimuluje glykolýzu na maximální kapacitu. Rozdíl mezi glykolytickou kapacitou a mírou glykolýzy určuje glykolytickou rezervu, která odráží schopnost buněk reagovat na energetické požadavky. Pokles ECAR po přidání kompetitivního inhibitoru hexokinasy, 2-deoxy-D-glukosy potvrzuje, že naměřené hodnoty ECAR během experimentu jsou způsobené glykolýzou.

### 3.3.5.1 Nasetí buněk na 24jamkovou kultivační destičku a hydratace kazety

Den před samotným měřením na přístroji *Seahorse XFe24* (Agilent) byly buňky kožních fibroblastů vysety na 24jamkovou kultivační destičku (*Seahorse cell culture microplate*). Před vysetím buněk bylo do každé jamky destičky napipetováno 100  $\mu$ l 0,01% (w/v) poly-L-lysinu naředěného ultračistou vodou (MilliQ-UV). Po 10 minutách byl roztok odsát do odpadu a jamky byly dvakrát promyty 100  $\mu$ l MilliQ-UV vody a vysušeny. Do takto připravených jamek byla pipetována buněčná suspenze, resp. DMEM medium jako blank.

Pro analýzu na přístroji *Seahorse* byly použity kultivované kožní fibroblasty v asi 80% konfluenci z jedné 75cm<sup>2</sup> kultivační lahve. Kultivační medium bylo přelito do 15ml centrifugační zkumavky, buňky byly opláchnuty 10 ml PBS a byl k nim napipetován 1% (w/v) roztok T+E o objemu 1,5 ml. Po 10minutové trypsinizaci při 37 °C byly buňky rozsuspendovány v mediu a přepipetovány do zkumavky. Suspenze byla centrifugována při 300xg, 25 °C, 5 min (*Centrifuga Hettich Universal 32R*). Z buněčné suspenze bylo ještě před centrifugací odebráno 0,5 ml do mikrozkušavky na určení počtu buněk pomocí mikropipety (*Scepter Handheld Automated Cell Counter*). Supernatant byl ze zkumavky odstraněn a peleta byla rozsuspendována v přefiltrovaném DMEM mediu o takovém objemu, aby výsledná koncentrace buněk byla 35 000 na 100  $\mu$ l media v jedné jamce kultivační destičky. Každá měřená buněčná linie byla naseta v pentaplikátech a čtyři jamky obsahovaly 100  $\mu$ l přefiltrovaného media bez buněk jako blank. Po 30 minutách při laboratorní teplotě bylo do všech jamek napipetováno 150  $\mu$ l kultivačního media. Po 30 minutách, kdy si už buňky přisedly na dno jamek, byla destička vložena do termostatu (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>), kde byla ponechána do dalšího dne.

Po nasetí buněk byla hydratovaná kazeta (*Seahorse extracellular flux cartridge*) napipetováním po 1 ml roztoku Seahorse XF Calibrant Solution pH 7,4 do každé jamky spodní části kazety. Celá kazeta pak byla ponechána přes noc v termostatu bez CO<sub>2</sub> při 37 °C.

### 3.3.5.2 Příprava reagentů pro analýzu na přístroji *Seahorse XFe24*

Následující den po nasetí buněk bylo připraveno 100 ml čerstvého media (D5030, 2mM L-glutamin), kterého pH bylo upraveno na hodnotu 7,40 při 37 °C. Reagencie v **Tabulce 3.5** (str. 51) byly připraveny v zásobních koncentracích, zamrazeny a uskladňovány v alikvótech při teplotě -20 °C. V den analýzy byly alikvóty pro jednu

sérii měření rozmrazeny na ledu a naředěny čerstvě připraveným médiem D5030 na pracovní koncentraci dle **Tabulky 3.5**.

**Tabulka 3.5: Složení roztoků reagensů pro analýzu na přístroji Seahorse XFe24.**

Reagencie	Objem media D5030	Objem reagensie	Koncentrace zásobní reagensie	Výsledná koncentrace reagensie v jamce
Glukosa	14 400 $\mu$ l	600 $\mu$ l	2,5 M	10 mM
Oligomycin	1491 $\mu$ l	9 $\mu$ l	2,5 mM	1,5 $\mu$ M
FCCP	3995, 2 $\mu$ l	4,8 $\mu$ l	5 mM	0,6 $\mu$ M
Rotenon	2475 $\mu$ l (pH 7,35)	20 $\mu$ l	2,5 mM	2 $\mu$ M
Antimycin A		5 $\mu$ l	5 mM	1 $\mu$ M
2-Deoxy-D-glukosa		1,969 g ve 12 ml média	1 M	100 mM

*Vysvětlivky: FCCP – karbonylkyanid-p-trifluoromethoxyfenylhydrazon.*

### 3.3.5.3 Příprava destičky a kazety pro analýzu na přístroji Seahorse XFe24

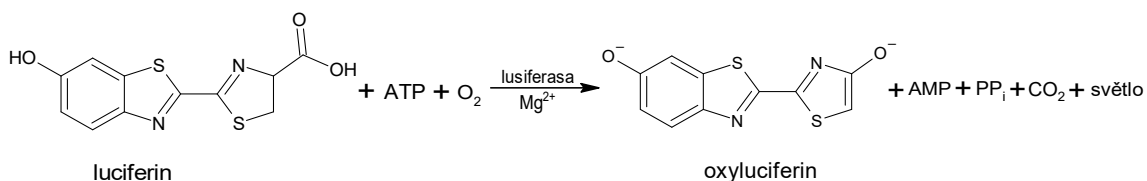
Před měřením bylo buňkám nasetým v kultivační destičce odebráno medium a jamky byly dvakrát propláchnuty 1 ml čerstvě připraveného media D5030 vyhřátého na 37 °C. Následně bylo do každé jamky přidáno 450  $\mu$ l tohoto media a kultivační destička byla inkubována 1 hodinu při 37 °C bez CO<sub>2</sub> atmosféry.

Mezitím byly připravené reagensie (**Tabulka 3.5**) napipetovány do portů kazety – 50  $\mu$ l 100mM glukosy do portu A, 55  $\mu$ l 15 $\mu$ M oligomycinu do portu B, 61  $\mu$ l 6 $\mu$ M FCCP do portu C, 67  $\mu$ l roztoku 20 $\mu$ M rotenonu a 10 $\mu$ M antimycinu A v mediu s 1M 2-deoxy-D-glusou. Kazeta pak byla vložena do inkubátoru bez CO<sub>2</sub> atmosféry, kde byla ponechána 30 minut při 37 °C. Pak byla podle instrukcí firmy Agilent provedena analýza na přístroji *Seahorse XFe24*. Získaná data byla analyzována v programu *Seahorse Wave 2.4 Software* (Agilent), zpracována v programu *Microsoft Excel* a statisticky vyhodnocena pomocí programu *GraphPad Prism*.

### 3.3.6 Analýza ATP produkce pomocí luminiscence

Na analýzu ATP produkce byla použita *CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay* (Promega)<sup>95</sup> a *GloMax-Multi+ luminometr* (Promega). Tato luminiscenční metoda slouží na kvantifikaci ATP vyprodukovaného buňkami, které jsou metabolicky aktivní. Tato metoda využívá vlastnost enzymu luciferázy (**Obrázek 9**, str. 52), která vytváří stabilní

luminiscenční signál. Použitím reagentu, který se přidá k živým buňkám nasetým v 96jamkové mikroděstičce, dojde k buněčné lyzi a k produkci luminiscenčního signálu úměrného množství ATP.



**Obrázek 9: Reakce katalyzovaná luciferasou.** Luciferasa katalyzuje monoxygenaci luciferinu v přítomnosti  $\text{Mg}^{2+}$ , ATP a molekulárního kyslíku. Rovnice vytvořena podle <sup>95</sup> v programu ChemSketch (ACD/Labs).

### 3.3.6.1 Nasetí buněk na 96jamkovou mikroděstičku

Den před samotným měřením byly buňky kožních fibroblastů vysety na 96jamkovou mikroděstičku (Promega). Pro analýzu byly použity kultivované kožní fibroblasty v 90–100% konfluenci z jedné 25cm<sup>2</sup> kultivační lahve. Kultivační medium bylo přelito do 15ml centrifugační zkumavky, buňky byly opláchnuty 5 ml PBS a byl k nim napipetován 1% (w/v) roztok T+E o objemu 750  $\mu\text{l}$ . Po 10minutové trypsinizaci při 37 °C byly buňky rozsuspendovány v mediu a přepipetovány do zkumavky. Suspenze byla centrifugována při 300xg, 25 °C, 5 min (*Centrifuga Hettich Universal 32R*). Z buněčné suspenze bylo ještě před centrifugací odebráno 0,5 ml do mikrozkušavky na určení počtu buněk pomocí mikropipety (*Scepter Handheld Automated Cell Counter*). Supernatant byl ze zkumavky odstraněn a peleta byla rozsuspendována v přefiltrovaném DMEM mediu o takovém objemu, aby výsledná koncentrace byla 20 000 buněk na 100  $\mu\text{l}$  media v jedné jamce mikroděstičky. Každá buněčná linie byla nasetá v tetraplikátech a šest jamek obsahovalo 100  $\mu\text{l}$  přefiltrovaného media bez buněk jako blank. Děstička pak byla vložena do termostatu (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>), kde byla ponechána do dalšího dne.

### 3.3.6.2 Příprava ATP standardů pro vytvoření kalibrační křivky

Předem byl připraven 100mM zásobní roztok ATP v PBS, který byl uschován v alikvótech po 50  $\mu\text{l}$  při –80 °C. Následující den po nasetí buněk na mikroděstičku byl jeden alikvót zásobního ATP rozmražen a 100x naředěn roztokem PBS. Z tohoto 1mM pracovního roztoku ATP byly připraveny standardy pro kalibraci v koncentracích 10  $\mu\text{M}$ ; 5  $\mu\text{M}$ ; 2,5  $\mu\text{M}$ ; 1,25  $\mu\text{M}$ ; 0,625  $\mu\text{M}$ ; 0,313  $\mu\text{M}$ ; 0,156  $\mu\text{M}$  a 0  $\mu\text{M}$ .

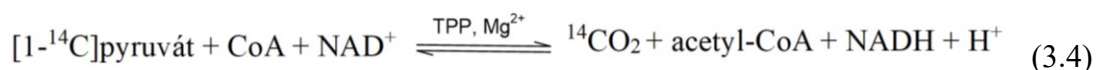
### 3.3.6.3 Příprava mikrodestičky pro analýzu ATP produkce

Mikrodestička s kultivovanými fibroblasty byla vybrána z inkubátoru. Pomocí pipety bylo odsáto kultivační medium a jamky byly dvakrát promyty 100  $\mu$ l PBS. Následně bylo do každé jamky přidáno přesně 100  $\mu$ l PBS. Do volných jamek bylo v triplicátech napipetováno po 100  $\mu$ l z každého ATP standardu.

Reagencie CellTiter-Glo® Buffer (pufr) a CellTiter-Glo® Substrate (substrát) byly před použitím rozmrazeny a vytemperovány na laboratorní teplotu. Pufr o objemu 10 ml byl přenesen do originální lahvičky se substrátem a roztok byl jemně promíchán překlopením. Multikanálovou pipetou bylo do každé jamky přidáno 100  $\mu$ l vzniklé reagencie a pro indukci buněčné lyze byla destička umístěna na třepačku (*Třepačka Biosan TS-100*) po dobu 2 minut, při 500 rpm. Po 10minutové inkubaci při laboratorní teplotě pak byla na přístroji *GloMax-Multi+ luminometr* (Promega) zaznamenaná luminiscence. Výsledky analýzy ATP produkce byly zpracovány v programu *Microsoft Excel* a statisticky vyhodnoceny pomocí programu *GraphPad Prism*.

### 3.3.7 Stanovení katalytické aktivity pyruvátdehydrogenasového komplexu

Pyruvátdehydrogenasový komplex (PDHc) katalyzuje oxidační dekarboxylaci pyruvátu. Jeho katalytickou aktivitu lze stanovit s využitím radioaktivně značeného pyruvátu, měřením množství  $^{14}\text{CO}_2$  jako vzniklého produktu reakce probíhající podle rovnice (3.4).



Zásobní roztoky pro stanovení katalytické aktivity PDHc (kromě roztoků kofaktorů) byly předem připraveny a uchovávány při 4 °C. Tyto roztoky byly před použitím vytemperovány na laboratorní teplotu. Nejdříve byl připraven roztok SMĚS podle **Tabulky 3.6** Pak byly připraveny roztoky kofaktorů, vždy čerstvé v den analýzy. Ty pak byly smíchaný do jednoho roztoku MIX KOFAKTORŮ (**Tabulka 3.6**, str. 54). Roztoky byly připraveny v takovém množství, aby vystačily na měření každého vzorku v tetraplikátech, včetně blanku.

**Tabulka 3.6: Složení roztoků pro stanovení katalytické aktivity PDHc.**

	<b>Reagencie</b>	<b>Zásobní koncentrace (mM)</b>	<b>Objem pro 1 měření (μl)</b>	<b>Koncentrace v reakční směsi (mM)</b>
<b>SMĚS</b>	Kpi	119	84,0	50
	MgCl <sub>2</sub>	80	5,0	2
	DTT	40	5,0	1
	K-oxalát	207	14,5	15
	PBS		10,0	
<b>MIX KOFAKTORŮ</b>	NAD <sup>+</sup>	50	8,0	2
	TPP	8	25,0	1
	CoA	16	3,8	0,3

Suspenze fibroblastů byla před měřením rozmražena na ledu a naředěna 300 μl PBS. Z této suspenze pak bylo 10 μl odebráno pro stanovení koncentrace proteinu dle Lowryho (postup viz kapitola 3.3.3), které bylo provedeno následující den. Ideální koncentrace proteinu pro stanovení aktivity PDHc je u fibroblastů 1,25 až 3,75 mg/ml.

Reakce byly prováděny při 37 °C (amplituda 4, rychlost míchání 120 rpm) v třepací vodní lázni (*Třepací vodní lázeň typ 357, Elpin+*) v skleněných vialkách o objemu 2 ml s víčky s filtračním papírkem a gumovým septem. Pro každý vzorek byly připraveny čtyři vialky, stejně i pro blank. Do každé vialky bylo napipetováno 119 μl reakčního roztoku SMĚS, 36,8 μl roztoku MIX KOFAKTORŮ (dH<sub>2</sub>O v případě blanku) a 40 μl vzorku. Vialky byly uzavřeny víčkem s filtračním papírkem předem navlhčeným 20 μl 10% KOH pro jímání <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> vzniklého během reakce.

Vialka s reakční směsí byla vložena do vodní lázně a ponechána preinkubovat 1 minutu. Poté byl pomocí Hamiltonky přes gumové septum přidán roztok [1-<sup>14</sup>C]pyruvátu o objemu 5 μl a do lázně byla vložena další vialka na preinkubaci. Reakce probíhala po dobu 20 minut a byla zastavena přidáním 50 μl 3M HClO<sub>4</sub> přes gumové septum pomocí mikrostříkačky Hamilton. Po skončení všech reakcí byly uzavřené lahvičky uskladněny v 4 °C po dobu 1 hodiny pro zachycení veškerého CO<sub>2</sub>. Poté byl filtrační papírek z víčka přenesen do scintilační lahvičky se 3 ml roztoku BCS, kde byl ponechán přes noc. Následující den byla změřena hodnota radioaktivity za pomoci scintilačního analyzátoru (*Beckman Coulter LS6500*). V duplikátech byla také změřena aktivita roztoku značeného pyruvátu o objemu 5 μl v 3 ml roztoku BCS ke

zjištění hodnoty DPM na 1 nmol látky. Katalytická aktivita PDHc byla vypočtena podle následující rovnice:

$$A_{kat} = \frac{A_v - A_b}{a_p \cdot t \cdot m_{prot}}, \quad (3.5)$$

kde  $A_{kat}$  je katalytická aktivita PDHc ( $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ),  $A_v$  je specifická aktivita vzorku (DPM),  $A_b$  je specifická aktivita blanku (DPM),  $a_p$  je specifická aktivita pyruvátu ( $\text{DPM} \cdot \text{nmol}^{-1}$ ),  $t$  je inkubační doba ( $t = 20 \text{ min}$ ),  $m_{prot}$  je množství proteinu ve vzorku (mg).

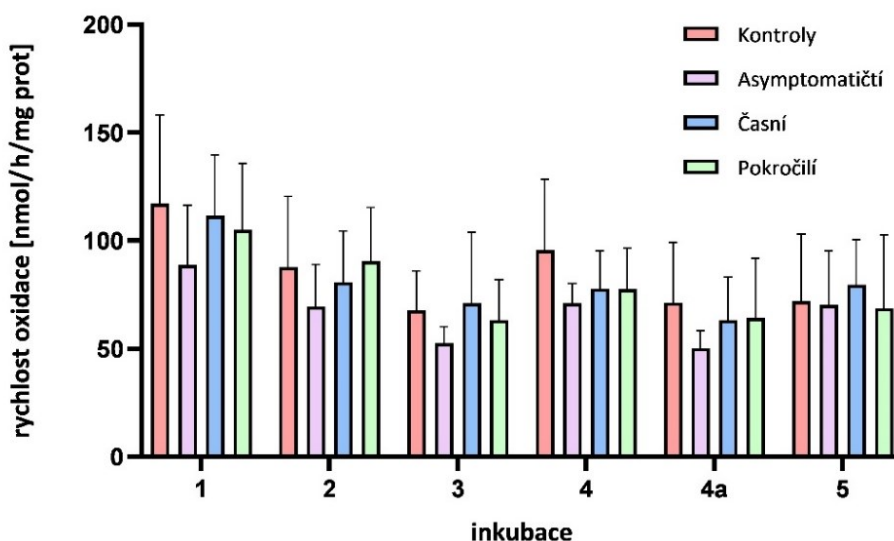
## 4 Výsledky

### 4.1 Analýza KMEM u pacientů s HN

Analýza KMEM byla provedena na kultivovaných kožních fibroblastech od 12 pacientů s geneticky prokázanou HN: 4 pacienti byli v asymptomatickém, 4 v časném a 4 v pokročilém stádiu nemoci. Jako kontrola byly použity 4 linie fibroblastů od zdravých osob. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v příloze (**Tabulka 8.1 až 8.4**, str. 78–79).

V případě pacientů v asymptomatickém stádiu HN pozorujeme mírně sníženou oxidaci pyruvátu (inkubace 1–5, **Obrázek 10**). Toto snížení však nedosahovalo statistické významnosti. Pacienti v pokročilém stádiu HN vykazovali sníženou míru oxidace malátu a sukcinátu (inkubace 6–9, **Obrázek 11**, str. 57), které však též nebylo statisticky významné.

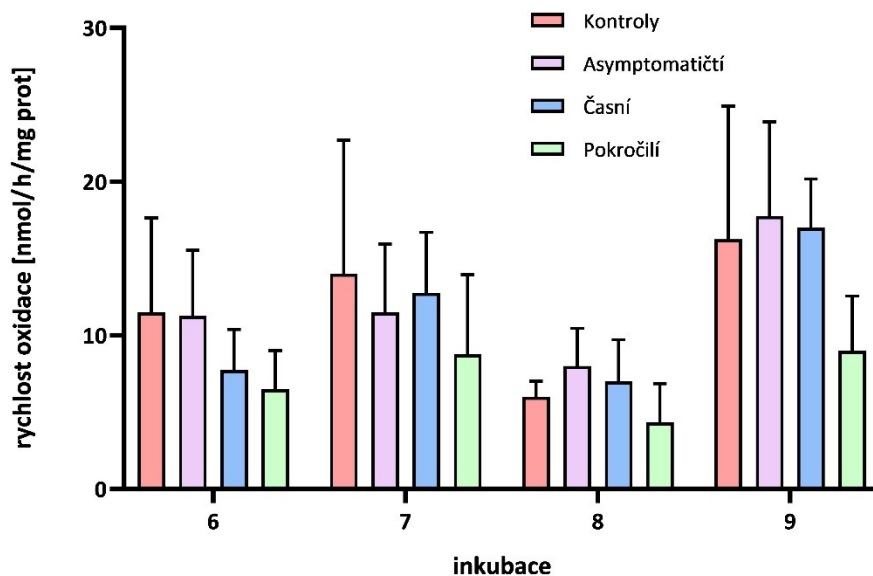
Pro bližší charakterizaci poruch energetického metabolismu byly vyhodnoceny poměry jednotlivých inkubací. U pacientů v pokročilém stádiu HN byla snížená hodnota poměru inkubací 7/8, což by mohlo indikovat poruchy enzymů Krebsova cyklu. Nesignifikantně snížený poměr 6/1 by mohl naznačovat poruchu systému OXPHOS u pacientů v časném a pokročilém stádiu HN (**Obrázek 12**, str. 57).



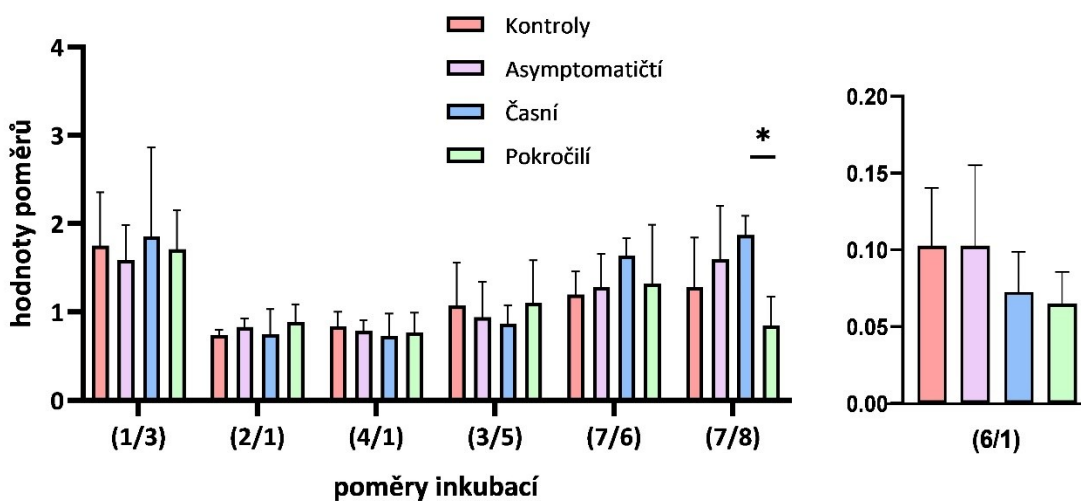
**Obrázek 10:** Rychlost oxidace  $[1-^{14}\text{C}]$ pyruvátu normalizovaná na množství proteinu v inkubacích 1–5 naměřená ve fibroblastech pacientů v asymptomatickém, časném a pokročilém stádiu HN a u kontrol. V každé skupině byly analyzovány vzorky odebrané od 4 osob.

**Složení inkubací:** 1  $[1-^{14}\text{C}]$ pyruvát + malát + ADP, 2  $[1-^{14}\text{C}]$ pyruvát + karnitin + ADP, 3  $[1-^{14}\text{C}]$ pyruvát + malát (–ADP), 4  $[1-^{14}\text{C}]$ pyruvát + malát (–ADP) + CCCP, 4a  $[1-^{14}\text{C}]$ pyruvát – karnitin + ADP, 5  $[1-^{14}\text{C}]$ pyruvát + malát + ADP + atraktylosid. Primární data jsou uvedena v příloze, Tabulka 8.1 (str. 78) a 8.3 (str. 79).





**Obrázek 11:** Rychlost oxidace  $[U-^{14}C]$ malátu a  $[1,4-^{14}C]$ sukcinátu normalizovaná na množství proteinu v inkubacích 6–9 naměřená ve fibroblastech pacientů v asymptomatickém, časném a pokročilém stádiu HN a kontrol. V každé skupině byly analyzovány vzorky odebrané od 4 osob. Složení inkubací: 6  $[U-^{14}C]$ malát + pyruvát + malonát + ADP, 7  $[U-^{14}C]$ malát + acetylkarnitin + malonát + ADP, 8  $[U-^{14}C]$ malát + acetylkarnitin + arsenit + ADP, 9  $[1,4-^{14}C]$ sukcinát + acetylkarnitin + ADP. Primární data jsou uvedena v příloze, Tabulka 8.1 (str. 78) a 8.3 (str. 79).

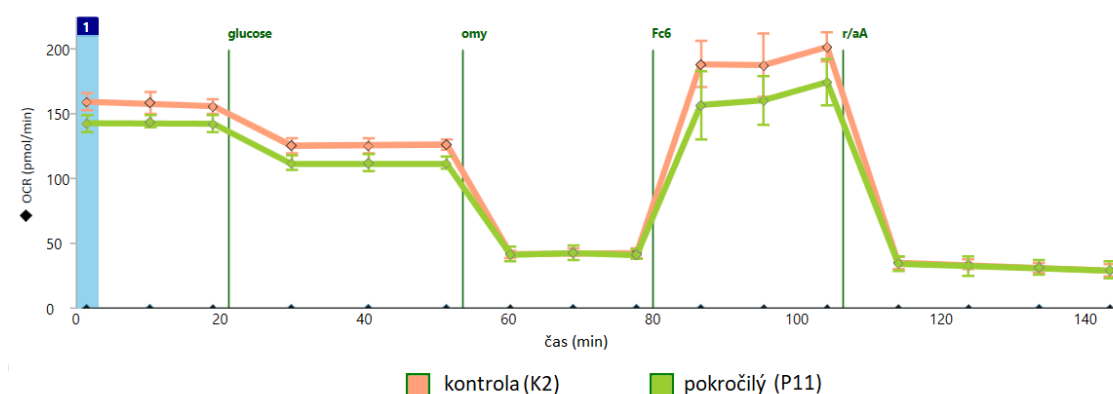


**Obrázek 12:** Poměry jednotlivých inkubací analýzy KMEM naměřené ve fibroblastech pacientů v asymptomatickém, časném a pokročilém stádiu HN a kontrol. V každé skupině byly analyzovány vzorky odebrané od 4 osob. Statistická analýza byla provedena použitím ANOVA testu s Tukeyho testem vícenásobného porovnání (\* $P < 0,05$ ).

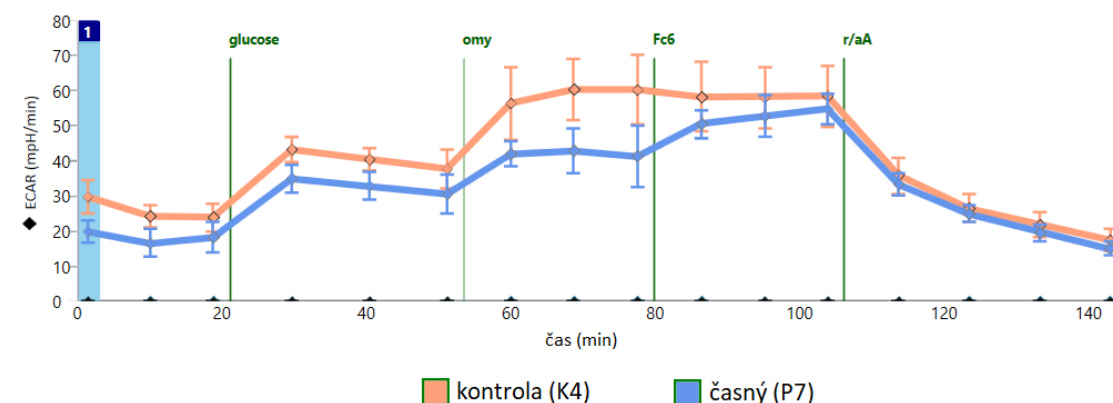
**Složení inkubací:** 1  $[1-^{14}C]$ pyruvát + malát + ADP, 2  $[1-^{14}C]$ pyruvát + karnitin + ADP, 3  $[1-^{14}C]$ pyruvát + malát (–ADP), 4  $[1-^{14}C]$ pyruvát + malát (–ADP) + CCCP, 5  $[1-^{14}C]$ pyruvát + malát + ADP + atraktylosid. 6  $[U-^{14}C]$ malát + pyruvát + malonát + ADP, 7  $[U-^{14}C]$ malát + acetylkarnitin + malonát + ADP, 8  $[U-^{14}C]$ malát + acetylkarnitin + arsenit + ADP. Primární data jsou uvedena v příloze, Tabulka 8.2 (str. 78) a 8.4 (str. 79).

## 4.2 Analýza na přístroji Seahorse XFe24

Pro analýzu respirace buněk na přístroji Seahorse XFe24 (Agilent) byly použity dvě linie kultivovaných kožních fibroblastů z každé skupiny pacientů s HN a tři linie od zdravých osob. Vzorky byly měřeny v pentaplikátech. Naměřené hodnoty jsou uvedeny příloze (Tabulka 8.5 a 8.6, str. 80). Z analýzy respirace buněk byly získány grafy závislosti OCR a ECAR na čase. Pro ukázkou jsou níže znázorněny křivky závislosti OCR na čase u pacienta P11 v pokročilém stádiu HN a kontroly K2 (Obrázek 13) a závislosti ECAR na čase u pacienta P7 v časném stádiu HN a kontroly K4 (Obrázek 14).

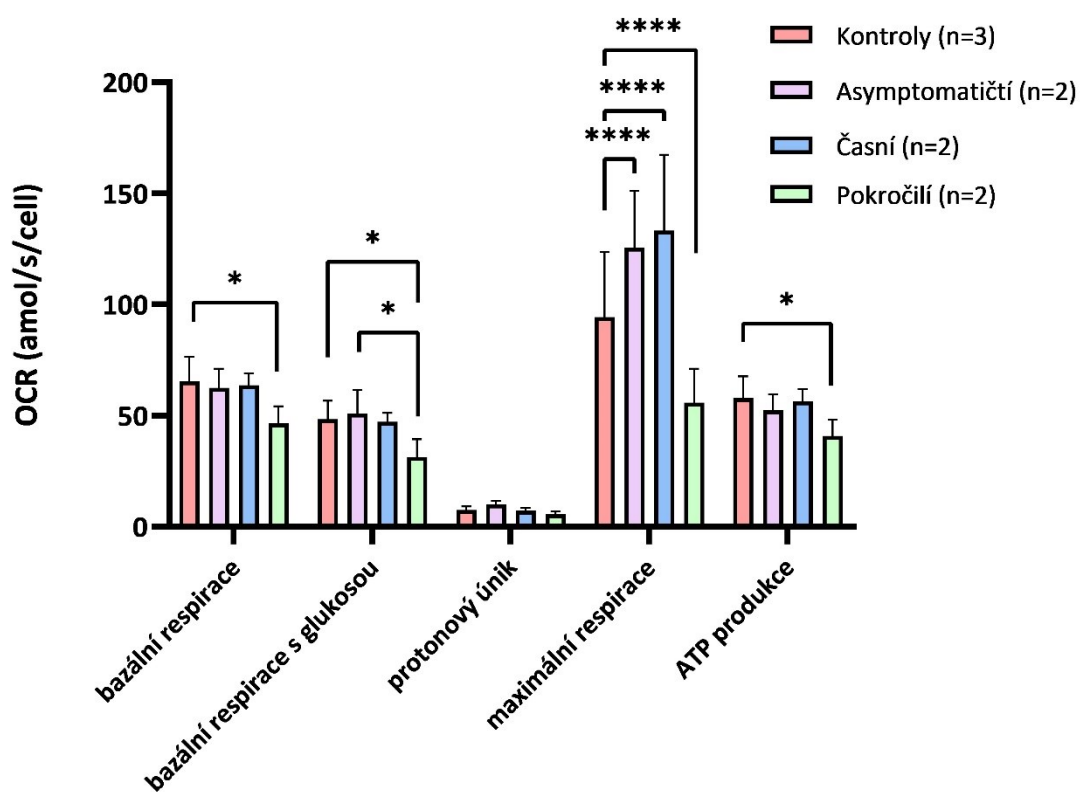


**Obrázek 13:** Míra spotřeby kyslíku (OCR) buňkami kultivovaných kožních fibroblastů od pacienta v pokročilém stádiu HN (P3) a kontroly (K2). Křivky byly získané v programu Wave 2.4 při analýze na přístroji Seahorse XFe24. **Glucose** – přidavek 10mM glukosy, **omy** – přidavek 1,5μM oligomycinu, **Fc6** – přidavek 0,6μM karbonylkyanid-p-trifluoromethoxyfenylhydrazonu, **r/aA** – přidavek 2μM rotenonu, 1μM antimycinu A a 100mM 2-deoxy-D-glukosy.



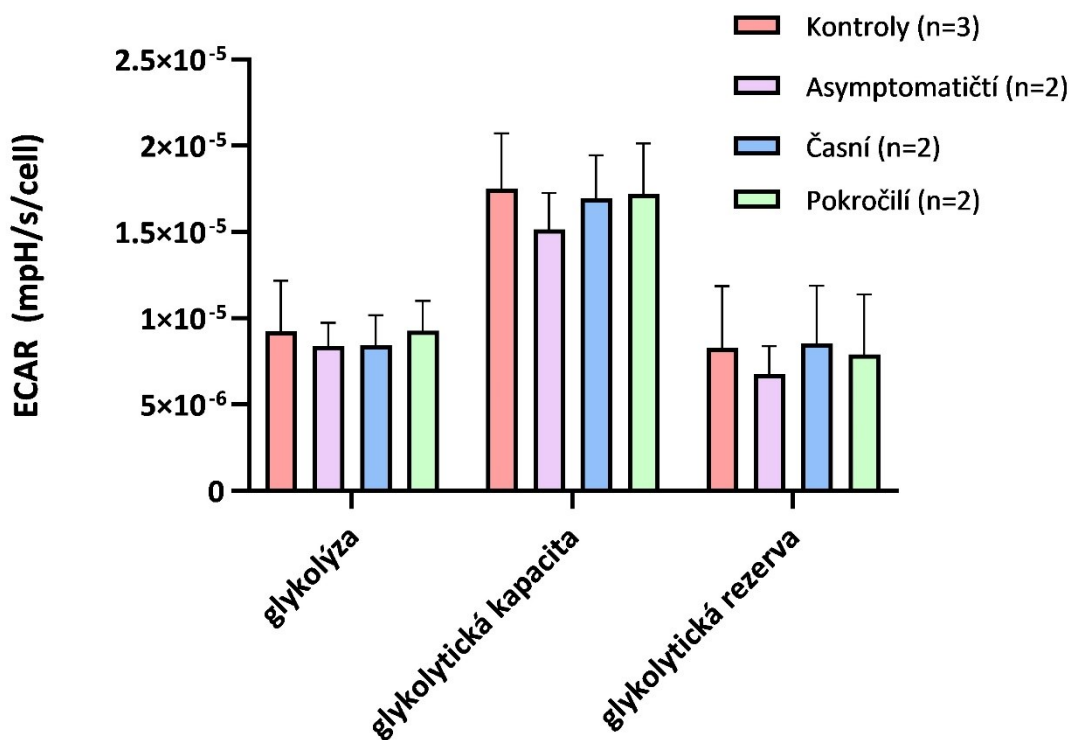
**Obrázek 14:** Míra extracelulární acidifikace prostředí (ECAR) buňkami kultivovaných kožních fibroblastů od pacienta v časném stádiu HN (P7) a kontroly (K4). Křivky byly získané v programu Wave 2.4 při analýze na přístroji Seahorse XFe24. **Glucose** – přidavek 10mM glukosy, **omy** – přidavek 1,5μM oligomycinu, **Fc6** – přidavek 0,6μM karbonylkyanid-p-trifluoromethoxyfenylhydrazonu, **r/aA** – přidavek 2μM rotenonu, 1μM antimycinu A a 100mM 2-deoxy-D-glukosy.

Data získaná měřením míry spotřeby kyslíku buněk na přístroji *Seahorse XFe24* byla vyhodnocena a byly z nich vypočteny následující parametry mitochondriální respirace: bazální respirace, bazální respirace s glukosou, protonový únik, maximální respirace a míra ATP produkce (**Obrázek 15**). Kvantifikace získaných dat odhalila zvýšení maximální respirace u pacientů v asymptomatickém a časném období HN ve srovnání s kontrolami. Pacienti v pokročilém stádiu HN měli sníženou bazální respiraci, bazální respirace s glukosou, maximální respiraci i ATP produkci.



**Obrázek 15:** Parametry mitochondriální respirace fibroblastů pacientů s HN a kontrol měřené na přístroji *Seahorse XFe24*. Statistická analýza byla provedena použitím ANOVA testu s Tukeyho testem vícenásobného porovnání (\* $P < 0.05$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ ).  $n$  – počet analyzovaných vzorků v dané skupině. Primární data jsou uvedena v příloze, Tabulka 8.5 (str. 80).

Parametry glykolytické aktivity fibroblastů pacientů s HN a kontrol byly analyzovány z hodnot ECAR, měřené simultánně s OCR. Vyhodnoceny byly tyto parametry: glykolýza, glykolytická kapacita a glykolytická rezerva buněk (**Obrázek 16**, str. 60). Kvantifikace získaných dat neodhalila žádné signifikantné rozdíly v glykolytické aktivitě fibroblastů pacientů a kontrol.

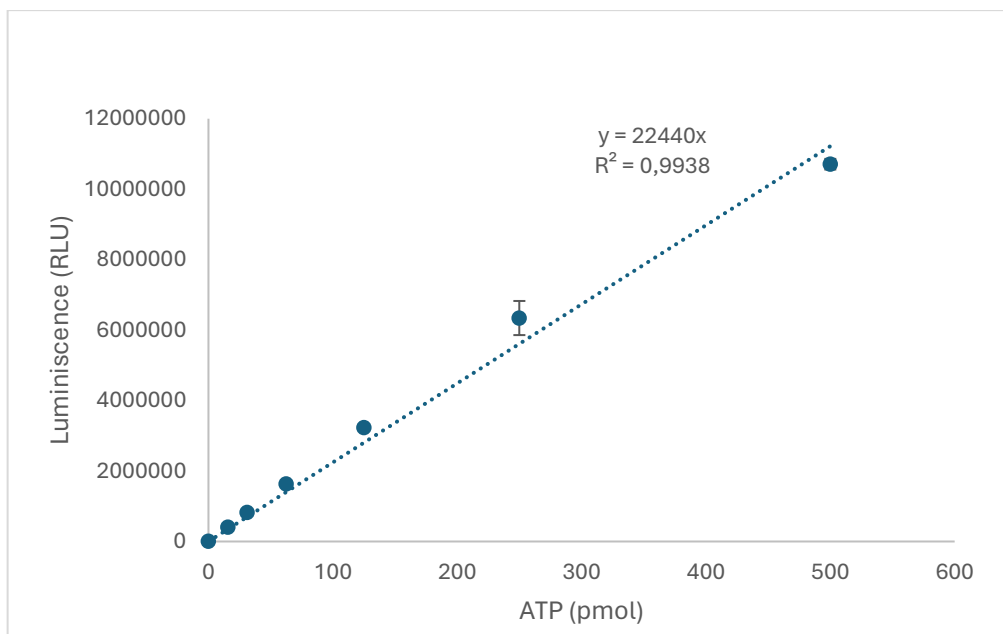


**Obrázek 16:** Parametry glykolytické aktivity fibroblastů pacientů s HN a kontrol měřené na přístroji Seahorse XFe24. *n* – počet analyzovaných vzorků v dané skupině. Primární data jsou uvedena v příloze, Tabulka 8.6 (str. 80).

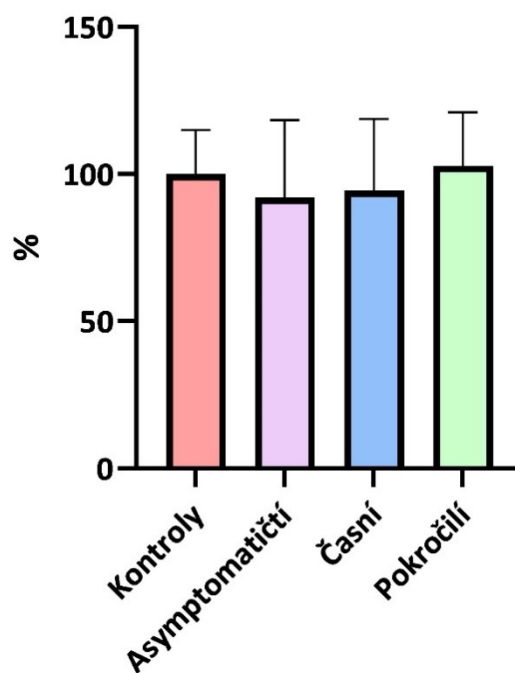
#### 4.3 Analýza ATP produkce pomocí luminiscence

Na luminometru *GloMax-Multi+* (Promega) byla analyzována míra ATP produkce kožních fibroblastů od 12 pacientů s HN: 4 pacienti byli v asymptomatickém, 4 v časném a 4 v pokročilém stádiu nemoci. Jako kontrola byly použity 4 linie fibroblastů od zdravých osob. Každá buněčná linie byla měřena v tetraplikátech na čtyřech různých 96jamkových mikroděstičkách. Získané hodnoty množství ATP jsou uvedeny v příloze (**Tabulka 8.7**, str. 80).

Získané hodnoty luminiscence byly přepočteny na množství ATP podle kalibrační křivky zvlášť pro každou mikroděstičku (**Obrázek 17**, str. 61). Získaná data byla zpracována, pro každou skupinu pacientů zprůměrována a vztažena k průměrné hodnotě množství ATP kontrol, která v grafu (**Obrázek 18**, str. 61) reprezentuje 100 %. Mezi skupinami pacientů a kontrolami nebyly pozorovány žádné signifikantní rozdíly v ATP produkci.



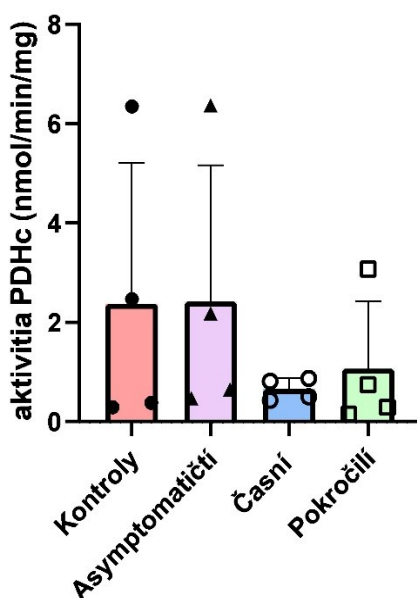
**Obrázek 17:** Kalibrační křivka pro analýzu ATP produkce: závislost luminiscence na množství ATP. RLU – relativní světelné jednotky (z angl. relative light units).



**Obrázek 18:** Míra ATP produkce měřená v kožních fibroblastech pacientů s HN a kontrol na luminometru GloMax-Multi+ (Promega). Hodnota 100 % na ose x představuje průměrné množství ATP vyprodukované buňkami kontrol. N=16. Primární data jsou uvedena v příloze, Tabulka 8.7 (str. 80).

#### 4.4 Stanovení katalytické aktivity pyruvátdehydrogenasového komplexu

Katalytická aktivita PDHc byla stanovena měřením radioaktivního  $^{14}\text{CO}_2$ , jako produktu vzniklého z  $[1-^{14}\text{C}]$ pyruvátu. Analyzovány byly vzorky fibroblastů od dvou kontrol (K1, K2) a od pěti pacientů (P3, P4, P9, P10, P11). Katalytická aktivita PDHc ve fibroblastech zbylých kontrol (K3, K4) a pacientů (P1, P2, P5, P6, P7, P8, P12) byla stanovena pracovníkem laboratoře před třemi lety. Primární data jsou uvedena v příloze (**Tabulka 8.8 a 8.9**, str. 81). Výsledky ze stanovení byly navzájem porovnány mezi jednotlivými skupinami pacientů (asymptomatictí, časní, pokročilí) a kontrolní skupinou. Nebyly pozorovány žádné signifikantní rozdíly v katalytické aktivitě PDHc v analyzovaném souboru (**Obrázek 19**).



**Obrázek 19:** Katalytická aktivita pyruvátdehydrogenasového komplexu (PDHc) měřená v kožních fibroblastech pacientů s HN a kontrol. V každé skupině byly měřeny 4 buněčné linie, každá v tetraplikátu,  $N = 4$ . Primární data jsou uvedena v příloze, Tabulka 8.8 a 8.9 (str. 81).

Korelace naměřených dat s klinickými parametry neukázala žádné významné rozdíly a trendy. Katalytickou aktivitu PDHc jsme u pacientů korelovali s délkou trvání nemoci. Porovnávali jsme i skupinu pacientů s TFC hodnotou 13 oproti pacientům s TFC méně než 13. V našem analyzovaném souboru nebyly nalezeny žádné korelace.

## 5 Diskuze

Huntingtonova nemoc je závažné onemocnění, které je doposud neléčitelné. Stejně jako jiné neurodegenerativní onemocnění, i HN doprovází mitochondriální poškození v neuronálních a periferních tkáních. Poškození mitochondriální funkce bylo potvrzeno na zvířecích i buněčných modelech HN. U symptomatických pacientů byl prokázán pokles mitochondriálního energetického metabolismu, snížená aktivita komplexů dýchacího řetězce a strukturální poškození mitochondrií<sup>21,70</sup>.

Nástupu prvních symptomů HN předchází 15–20leté presymptomatické období. Na presymptomatických transgenních ovčích modelech HN bylo nalezeno několik metabolitů, včetně sfingolipidů, biogenních aminů, aminokyselin a močoviny, jejichž hladiny byly zvýšeny, resp. sníženy ve srovnání s kontrolami. Změny vykazovaly i větvené aminokyseliny (valin, leucin, izoleucin), které byly už dříve identifikovány jako potenciální biomarkery HN. Hladiny biomarkerů byly stanovovány v plazmě, což otevřelo nové neinvazivní možnosti pro monitorování progresu onemocnění ještě před nástupem prvních symptomů u pacientů s HN<sup>96</sup>. Valná většina dosud publikovaných studií se věnuje charakterizaci buněčného metabolismu u symptomatických pacientů. Pro objasnění metabolických změn v průběhu HN a nalezení vhodných biomarkerů pro sledování progresu této choroby je však potřeba sledovat tyto změny už v období presymptomatickém.

Předkládaná práce se věnuje charakterizaci energetického metabolismu a jeho změn u pacientů ve třech různých stádiích HN: asymptomatickém, časném a pokročilém. Na analýzu byly zvoleny kultivované kožní fibroblasty jako snadno dostupný a kultivovatelný materiál. Zjištěné rozdíly v metabolismu by mohly vést k objasnění patobiochemických mechanismů rozvoje této smrtelné nemoci, a také připravit podmínky pro nalezení potenciální terapie.

První metodou použitou pro charakterizaci mitochondriálního metabolismu byla analýza KMEM. V rychlostech oxidace pyruvátu (**Obrázek 10**, str. 56) nepozorujeme žádné signifikantní rozdíly mezi analyzovanými skupinami pacientů a kontrolní skupinou. Staticky významné nebyly ani rozdíly v rychlostech oxidace malátu a sukcinátu (**Obrázek 11**, str. 57) mezi pacienty a kontrolami. V inkubacích 6–9 však převládá podobný trend, kdy pacienti v pokročilém stádiu HN mají nižší hodnoty rychlosti oxidace těchto substrátů ve srovnání s kontrolami, což by mohlo naznačovat mitochondriální

deficit v této skupině pacientů. U všech analyzovaných skupin je poměrně velká biologická variabilita, proto by pro získání přesnějších výsledků bylo potřeba mít širší soubor pacientů a kontrol.

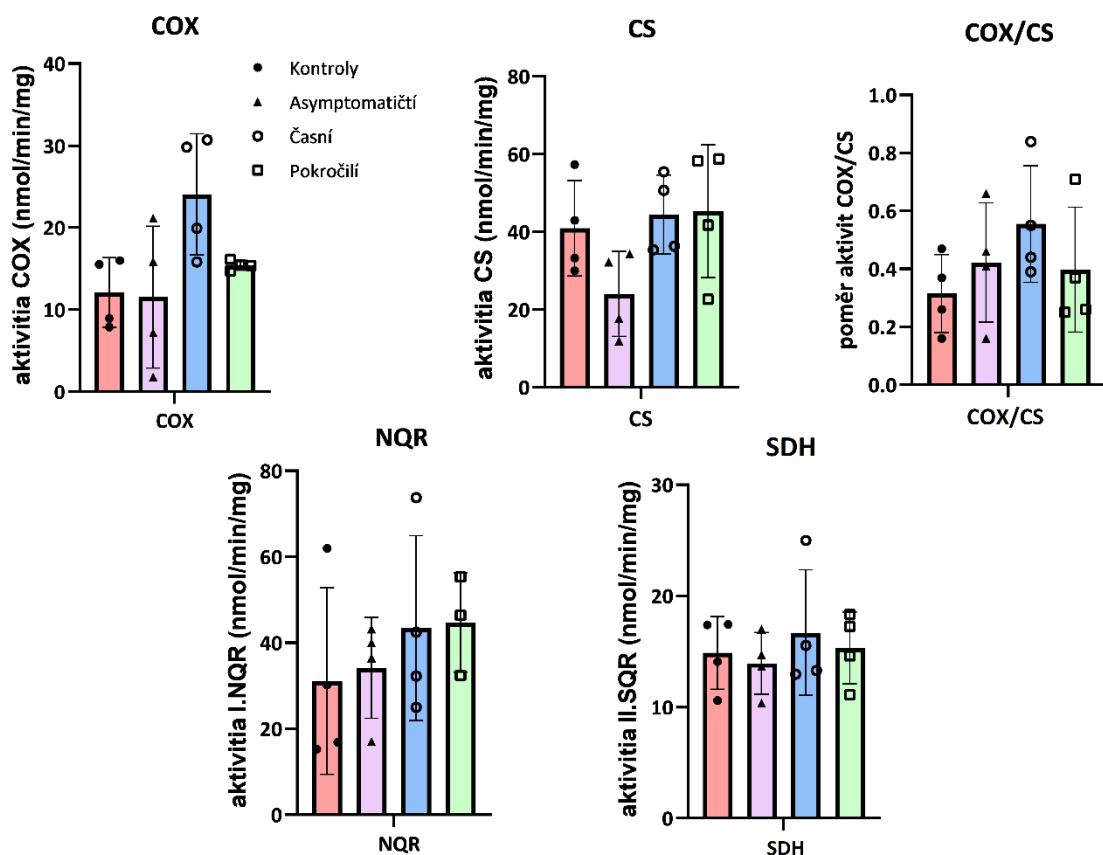
U pacientů v pokročilém stádiu HN byl ve srovnání s pacienty v časném stádiu detekován snížený poměr inkubací 7/8 (**Obrázek 12**, str. 57). Snížení tohoto poměru by mohlo indikovat poruchy Krebsova cyklu. Nesignifikantně byla změněna i hodnota poměru inkubací 6/1, která klesala s progresí onemocnění. To by mohlo naznačovat poruchy systému OXPHOS u pacientů v pokročilém stádiu HN.

Dosud bylo publikováno mnoho studií popisujících defekty energetického metabolismu u pacientů s HN. Už v roce 1974 byl pozorován deficit komplexu II, společného enzymu Krebsova cyklu a systému OXPHOS, v mozku pacientů s HN<sup>97</sup>. Pozdější studie toto zjištění potvrdily a zaznamenaly též pokles v aktivitě komplexu III a komplexu IV<sup>98,99</sup>. Na R6/2 myším modelu byl potvrzen signifikantní defekt akonitasy, enzymu, který je součástí Krebsova cyklu<sup>100</sup>. Studie na transgenních myších modelech v presymptomatickém období však neodhalila žádné poruchy aktivity mitochondriálních komplexů I–IV, což koreluje s našimi výsledky<sup>101</sup>.

Poruchy Krebsova cyklu a systému OXPHOS u pacientů v pokročilém stádiu HN by mohly být příčinou zvýšené mitochondriální fragmentace popisované u HN. C. Lopes a kol. zjistili, že heterozygotní lidské indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSCs, z angl. *induced pluripotent stem cells*) a z nich derivované neuronální kmenové buňky (NSCs, z angl. *neural stem cells*) s rozšířeným počtem CAG repetice uvolňují mitochondriální proteiny Krebsova cyklu (PDHc, CS) a systému OXPHOS (komplex I, III a IV) v exozomech. Toto zvýšené exozomální uvolňování metabolických enzymů naznačuje proces, při kterém se mitochondrie u pacientů s HN stávají nefunkčními<sup>102</sup>.

Pracovníci v Laboratoři pro studium mitochondriálních poruch spektrofotometricky stanovili aktivity vybraných komplexů systému OXPHOS (komplex I, II a IV) a citrátsyntasy ve fibroblastech analyzovaného souboru pacientů s HN a kontrol. Jak je patrné z grafů (**Obrázek 20**, str. 65), mezi jednotlivými skupinami pacientů a kontrolní skupinou nepozorujeme žádné rozdíly v hodnotách aktivit analyzovaných enzymů. Hodnoty jsou v rámci skupin poměrně hodně variabilní, proto by pro získání přesnějších výsledků bylo potřeba analyzovat širší soubor pacientů.





**Obrázek 20:** Aktivity vybraných komplexů systému OXPHOS a citrát syntasy stanovené spektrofotometricky ve fibroblastech pacientů v různých fázích rozvoje HN a kontrol.  $N = 4$ . **Vysvětlivky:** **COX** – cytochrom *c* oxidasa (komplex IV), **CS** – citrát syntasa, **NQR** – NADH:ubichinon oxidoreduktasa (komplex I), **SDH** – sukcinátdehydrogenasa (komplex II). Primární data jsou uvedena v příloze, Tabulka 8.10 (str. 82). Data byla získána ve spolupráci s pracovníky Laboratoře pro studium mitochondriálních poruch.

Většina doposud provedených studií zaznamenala pokles aktivity komplexu II<sup>97</sup> a komplexu IV<sup>98,99</sup> u pacientů v pokročilém stádiu HN. Tyto studie však byly prováděny na buňkách izolovaných z mozků pacientů, kde může být defekt těchto enzymů výraznější. Kožní fibroblasty jakožto periferní tkáň s nízkou energetickou náročností nemusí mít deficit komplexů II a IV systému OXPHOS tak výrazný. Analýza aktivity komplexů systému OXPHOS neodhalila žádné abnormality u transgenních myší v asymptomatickém a časném období HN<sup>101</sup>. Co se týče komplexu I, jeho aktivita byla nezměněna v bazálních gangliích pacientů s HN<sup>98</sup>, což je v souladu s výsledky naší analýzy na fibroblastech. Aktivita citrát syntasy byla nezměněna i v mitochondriální frakci iPSCs a NSCs s rozšířeným počtem CAG repetice<sup>102</sup>, což je také v souladu s našimi výsledky.

Analýza aktivity PDHc ve fibroblastech pacientů s HN neodhalila žádné signifikantní rozdíly ve srovnání s kontrolní skupinou (**Obrázek 19**, str. 62). Jedna ze

studií pod vedením S. Sorbi, která zkoumala aktivitu PDHc v mozku (v oblasti *caudate* a *putamen*) pacientů s HN, zaznamenala sníženou aktivitu tohoto enzymového komplexu. V té samé studii však analýza katalytické aktivity PDHc ve fibroblastech pacientů s HN neodhalila žádné abnormality<sup>56</sup>. Předpokládáme, že deficiencie PDHc může hrát roli v patofyziologii HN, nelze ji však zachytit v periferní tkáni jakou jsou kožní fibroblasty.

Analýza mitochondriální respirace buněk měřená na přístroji *Seahorse XFe24* (Aglient) odhalila, že pacienti v asymptomatickém a časném stádiu HN mají zvýšenou maximální respiraci oproti kontrolní skupině (**Obrázek 15**, str. 59). To naznačuje, že v počátku rozvoje nemoci dochází k aktivaci procesů, které vedou ke zvýšenému energetickému metabolismu. Bližší charakterizace toho, o jaké procesy se jedná, vyžaduje další studie. Domníváme se však, že vyšší mitochondriální respirace odráží kompenzační mechanismus pro vyrovnání se s HN a jejími důsledky. Zachování tohoto stavu kompenzace by mohlo být cílem pro prevenci nebo oddálení přechodu z presymptomatického do symptomatického stádia HN.

Pacienti v pokročilém stádiu HN mají oproti kontrolní skupině sníženou bazální respiraci, bazální respiraci s glukosou, maximální respiraci i ATP produkci (**Obrázek 15**, str. 59). Snížení hodnot těchto parametrů mitochondriální respirace může být důsledkem poškození mitochondriální membrány či sníženého membránového potenciálu. Mitochondrie pacientů v pokročilém stádiu HN jsou tedy méně závislé od systému OXPHOS a ve srovnání s kontrolami mají nižší biometabolickou rezervu v podmínkách zvýšené potřeby ATP. Snížení bazální, maximální respirace a ATP produkce bylo potvrzeno i ve výše zmíněné studii na heterozygotních lidských iPSCs s rozšířeným počtem CAG repetit. K ještě výraznějšímu poklesu hodnot těchto parametrů mitochondriální respirace došlo po neurální diferenciaci buněk<sup>102</sup>.

Analýza glykolytické aktivity na iPSCs a NSCs jako buněčných modelech HN odhalila zvýšení bazální hladiny ECAR a glykolytické kapacity stanovené po přidání glukosy. Tyto výsledky naznačují, že mozkové buňky jsou méně závislé na systému OXPHOS a více využívají glykolýzu<sup>102</sup>. Zvýšení glykolytické kapacity se však nepotvrdilo v naší analýze na fibroblastech pacientů s HN. Ve zkoumaných parametrech glykolytické aktivity fibroblastů analyzovaných pacientů a kontrol nebyly zaznamenány žádné rozdíly (**Obrázek 16**, str. 60). Ke stejným výsledkům dospěla i naše předchozí

studie na fibroblastech pacientů s rozvinutou HN<sup>103</sup>. Nezměněná glykolytická aktivita ve fibroblastech pacientů též koreluje se studií na myším modelu YAC128, který exprimuje mHTT s polyQ sekvencí obsahující 128 glutaminů. Autoři této studie analyzovali na přístroji *Seahorse Xfe24* glykolytickou aktivitu kortikálních a striatálních neuronů myšího modelu HN a porovnávali ji s WT (wild type) myším modelem. Glykolytická aktivita myši YAC128 se ve srovnání s WT myši nezměnila<sup>104</sup>.

Analýza ATP produkce měřená na luminometru *GloMax-Multi+* (Promega) neodhalila ve fibroblastech zkoumaného souboru pacientů signifikantní rozdíly v hladině ATP (**Obrázek 18**, str. 61). Tyto výsledky jsou ve shodě se studií na synaptických i nesynaptických mitochondriích izolovaných z mozků a striatálních neuronů myšího modelu YAC128, kde nebyly zjištěny žádné rozdíly v hladinách ATP a ADP ve srovnání s WT modelem<sup>104</sup>. Jiná studie na striatálních neuronech exprimujících mHTT však dospěla k odlišným výsledkům. ATP produkce stejně jako mitochondriální respirace v této tkáni byla signifikantně porušena<sup>105</sup>.

Analýza mitochondriálního energetického metabolismu na kožních fibroblastech pacientů s HN v předkládané práci přinesla několik významných zjištění. Pacienti v asymptomatickém a časném období nemoci vykazovali zvýšenou maximální respiraci, což by mohlo znamenat, že u nich dochází k aktivaci procesů, které vedou k stimulaci energetického metabolismu. Pacienti v pokročilém stádiu HN naopak měli sníženou maximální i bazální respiraci. Získané výsledky též poukazyvaly na poruchy Krebsova cyklu a systému OXPHOS v této skupině pacientů, což je ve shodě s publikovanými studiemi<sup>97-100</sup>. Lze tedy říct, že s postupnou progresí onemocnění se objevují poruchy na úrovni mitochondriální respirace. ATP produkce, katalytická aktivita PDHc a glykolytická aktivita kožních fibroblastů v analyzovaných skupinách pacientů však zůstává neporušena. Pro získání přesnějších výsledků jsou potřebné další studie na širším souboru pacientů a kontrol.

## 6 Závěr

V této diplomové práci byl paletou funkčních metod analyzován mitochondriální energetický metabolismus fibroblastů pacientů v asymptomatickém, časném a pokročilém stádiu Huntingtonovy nemoci. Cíle diplomové práce byly splněny, což potvrzují získané výsledky:

- Metoda kapacity mitochondriálního energetického metabolismu (KMEM) odhalila poruchy Krebsova cyklu a systému oxidační fosforylace u pacientů v pokročilém stádiu HN.
- Analýza mitochondriální respirace (Seahorse) odhalila u pacientů v asymptomatickém a časném období HN zvýšenou maximální respiraci. Pacienti v pokročilém stádiu HN měli sníženou bazální i maximální respiraci. V glykolytické aktivitě buněk nebyly zjištěny signifikantní rozdíly.
- Míra ATP produkce měřená pomocí luminiscence se mezi jednotlivými skupinami pacientů a kontrol nelišila.
- Katalytická aktivita pyruvátdehydrogenasového komplexu mezi skupinami pacientů a kontrolní skupinou nevykazovala signifikantní rozdíly.
- Získaná data byla korelována s aktivitami jednotlivých komplexů OXPHOS a klinickými daty. Nebyly nalezeny žádné rozdíly či trendy.

Výsledky této práce jsou základem pro další výzkum mitochondriální role u Huntingtonovy nemoci na širším souboru vzorků a na jiných typech neinvazivního biologického materiálu.

## 7 Seznam použité literatury

1. Novak, M. J. U.; Tabrizi, S. J.: Huntington's Disease: Clinical Presentation and Treatment. *Int Rev Neurobiol.* **98**, 297–323 (2011).
2. Harper, P. S.: The epidemiology of Huntington's disease. *Hum Genet.* **89**:4, 365–376 (1992).
3. Bates G. P.; Dorsey R.; Gusella J. F.; Hayden M. R.; Kay C.; Leavitt B. R.; Nance M.; Ross C. A.; Scahill R. I.; Wetzel R.; Wild E. J.; Tabrizi S. J.: Huntington disease. *Nat Rev Dis Primers* **1**:15005, (2015).
4. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* **72**:6, 971–983 (1993).
5. Rubinsztein D.C.; Leggo J.; Coles R.; Almqvist E.; Biancalana V.; Cassiman J. J.; Chotai K.; Connarty M.; Crauford D.; Curtis A.; Curtis D.; Davidson M. J.; Differ A. M.; Dode C.; Dodge A.; Frontali M.; Ranen N. G.; Stine O. C.; Sherr M.; Abbott M. H.; Franz M. L.; Graham C. A.; Harper P. S.; Hedreen J. C.; Hayden M. R.; *et al.*: Phenotypic characterization of individuals with 30-40 CAG repeats in the Huntington disease (HD) gene reveals HD cases with 36 repeats and apparently normal elderly individuals with 36-39 repeats. *Am J Hum Genet.* **59**:1, 16–22 (1996).
6. McColgan, P.; Tabrizi, S. J.: Huntington's disease: a clinical review. *Eur J Neurol.* **25**:1, 24–34 (2018).
7. Almqvist, E. W.; Elterman, D. S.; MacLeod, P. M.; Hayden, M. R.: High incidence rate and absent family histories in one quarter of patients newly diagnosed with Huntington disease in British Columbia. *Clin Genet.* **60**:3, 198–205 (2001).
8. Duyao, M.; Ambrose, C.; Myers, R.; Novelletto, A.; Persichetti, F.; Frontali, M.; Folstein, S.; Ross, C.; Franz, M.; Abbott, M.; *et al.*: Trinucleotide repeat length instability and age of onset in Huntington's disease. *Nat Genet.* **4**:4, 387–392 (1993).
9. Telenius, H.; Kremer, B.; Goldberg, Y. P.; Theilmann, J.; Andrew, S. E.; Zeisler, J.; Adam, S.; Greenberg, C.; Ives, E. J.; Clarke, L. A.; Hayden M. R.: Somatic and gonadal mosaicism of the Huntington disease gene CAG repeat in brain and sperm. *Nat Genet.* **6**:4, 409–414 (1994).
10. Nance, M. A.; Myers, R. H.: Juvenile onset Huntington's disease – Clinical and research perspectives. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* **7**:3, 153–157 (2001).
11. Roos, R. A.: Huntington's disease: A clinical review. *Orphanet J Rare Dis.* **5**:40 (2010).

12. Huntington Study Group. Unified Huntington's Disease Rating Scale: reliability and consistency. *Mov Disord.* **11**, 136–142 (1996).
13. Papoutsis, M.; Labuschagne, I.; Tabrizi, S. J.; Stout, J. C.: The cognitive burden in Huntington's disease: pathology, phenotype, and mechanisms of compensation. *Mov Disord.* **29**:5, 673–683 (2014).
14. Nance, M. A.: Genetic testing of children at risk for Huntington's disease. US Huntington Disease Genetic Testing Group. *Neurology* **49**:4, 1048–1053 (1997).
15. Shoulson, I.; Fahn, S.: Huntington disease: clinical care and evaluation. *Neurology* **29**:1, 1–3 (1979).
16. Marder, K.; Zhao, H.; Myers, R. H.; Cudkovicz, M.; Kayson, E.; Kieburtz, K.; Orme, C.; Paulsen, J.; Penney, J. B.; Siemers, E.; Shoulson, I.: Rate of functional decline in Huntington's disease. Huntington Study Group. *Neurology* **54**:2, 452–458 (2000).
17. Stoker, T. B.; Mason, S. L.; Greenland, J. C.; Holden, S. T.; Santini, H.; Barker, R. A.: Huntington's disease: diagnosis and management. *Pract Neurol.* **22**:1, 32–41 (2022).
18. Townhill, J.; McLean, T.: Update: Clinical Trial Developments. *EHDN News* **51**, 9–10 (2024).
19. Kremer, B.; Goldberg, P.; Andrew, S. E.; Theilmann, J.; Telenius, H.; Zeisler, J.; Squitieri, F.; Lin, B.; Bassett, A.; Almqvist, E.; Bird, T. D.; Hayden, M.R.: A worldwide study of the Huntington's disease mutation. The sensitivity and specificity of measuring CAG repeats. *N Engl J Med.* **330**:20, 1401–1406 (1994).
20. Saudou, F.; Humbert, S.: The Biology of Huntingtin. *Neuron* **89**:5, 910–926 (2016).
21. Zheng, Z.; Diamond, M. I.: Huntington Disease and the Huntingtin Protein. *Prog Mol Biol Transl Sci.* **107**, 189–214 (2012).
22. Williams, A. J.; Paulson, H. L.: Polyglutamine neurodegeneration: protein misfolding revisited. *Trends Neurosci.* **31**:10, 521–528 (2008).
23. Soto, C.: Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci.* **4**:1, 49–60 (2003).
24. Bates, G. P.: History of genetic disease: the molecular genetics of Huntington disease – a history. *Nat Rev Genet.* **6**:10, 766–773 (2005).
25. Ross, C. A.; Tabrizi, S. J.: Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment. *Lancet Neurol.* **10**:1, 83–98 (2011).

26. Shirasaki, D. I.; Greiner, E. R.; Al-Ramahi, I.; Gray, M.; Boonthung, P.; Geschwind, D. H.; Botas, J.; Coppola, G.; Horvath, S.; Loo, J. A.; Yang, X. W.: Network organization of the huntingtin proteomic interactome in mammalian brain. *Neuron* **75**:1, 41–57 (2012).
27. Walker, F. O.: Huntington's disease. *Lancet* **369**:9557, 218–228 (2007).
28. Habbane, M.; Montoya, J.; Rhouda, T.; Sbaoui, Y.; Radallah, D.; Emperador, S.: Human Mitochondrial DNA: Particularities and Diseases. *Biomedicines* **9**:10, (2021).
29. Zalman, L. S.; Nikaido, H.; Kagawa, Y.: Mitochondrial outer membrane contains a protein producing nonspecific diffusion channels. *J Biol Chem.* **255**:5, 1771–1774 (1980).
30. Scheffler, I. E.: Structure and Morphology. Integration into the Cell. In: *Mitochondria*. New Jersey: John Wiley & Sons, 2007, p. 18–59. ISBN 9780470040737.
31. Koopman, W. J.; Visch, H. J.; Verkaart, S.; van den Heuvel, L. W.; Smeitink, J. A.; Willems, P. H.: Mitochondrial network complexity and pathological decrease in complex I activity are tightly correlated in isolated human complex I deficiency. *Am J Physiol Cell Physiol.* **289**:4, 881–890 (2005).
32. Jodeiri Farshbaf, M.; Ghaedi, K.: Huntington's Disease and Mitochondria. *Neurotox Res.* **32**:3, 518–529 (2017).
33. Lionaki, E.; Markaki, M.; Palikaras, K.; Tavernarakis, N.: Mitochondria, autophagy and age-associated neurodegenerative diseases: New insights into a complex interplay. *Biochim Biophys Acta.* **1847**:11, 1412–1423 (2015).
34. Vanišová, M.: Studium změn struktury a energetického metabolismu mitochondrií u pacientů s Huntingtonovou chorobou a u transgenního modelu miniprasete. Dizertační práce, vedoucí Hansíková, H. Praha: Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Klinika pediatrie a dědičných poruch metabolismu 1. LF UK a VFN, 2023.
35. Nolfi-Donagan, D.; Braganza, A.; Shiva, S.: Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement. *Redox Biol.* **37**:101674, (2020).
36. Chaban, Y.; Boekema, E. J.; Dudkina, N. V.: Structures of mitochondrial oxidative phosphorylation supercomplexes and mechanisms for their stabilisation. *Biochim Biophys Acta.* **1837**:4, 418–426 (2014).
37. Carroll, J.; Fearnley, I. M.; Skehel, J. M.; Shannon, R. J.; Hirst, J.; Walker, J. E.: Bovine complex I is a complex of 45 different subunits. *J Biol Chem.* **281**:43, 32724–32727 (2006).
38. Wirth, C.; Brandt, U.; Hunte, C.; Zickermann, V.: Structure and function of mitochondrial complex I. *Biochim Biophys Acta* **1857**:7, 902–914 (2016).

39. Efremov, R. G.; Baradaran, R.; Sazanov, L. A.: The architecture of respiratory complex I. *Nature* **465**:7297, 441–445 (2010).
40. Schapira, A. H.: Human Complex I Defects in Neurodegenerative Diseases. *Biochim Biophys Acta* **1364**:2, 261–270 (1998).
41. Du, Z.; Zhou, X.; Lai, Y.; Xu, J.; Zhang, Y.; Zhou, S.; Feng, Z.; Yu, L.; Tang, Y.; Wang, W.; Yu, L.; Tian, C.; Ran, T.; Chen, H.; Guddat, L. W.; Liu, F.; Gao, Y.; Rao, Z.; Gong, H.: Structure of the human respiratory complex II. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **120**:18 (2023).
42. Fernandez-Vizarra, E.; Zeviani, M.: Mitochondrial complex III Rieske Fe-S protein processing and assembly. *Cell Cycle* **17**:6, 681–687 (2018).
43. Kadenbach, B.: Complex IV – The regulatory center of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Mitochondrion* **58**, 296–302 (2021).
44. Watt, I. N.; Montgomery, M. G.; Runswick, M. J.; Leslie, A. G. W.; Walker, J. E.: Bioenergetic cost of making an adenosine triphosphate molecule in animal mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **107**:39, 16823–16827 (2010).
45. Jonckheere, A. I.; Smeitink, J. A.; Rodenburg, R. J.: Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology. *J Inherit Metab Dis.* **35**:2, 211–225 (2012).
46. Xu, T.; Pagadala, V.; Mueller, D. M.: Understanding structure, function, and mutations in the mitochondrial ATP synthase. *Microbial Cell* **2**:4, 105–125 (2015).
47. Devenish, R. J.; Prescott, M.; Rodgers, A. J.: The structure and function of mitochondrial F1F0-ATP synthases. *Int Rev Cell Mol Biol.* **267**, 1–58 (2008).
48. Signes, A.; Fernandez-Vizarra, E.: Assembly of mammalian oxidative phosphorylation complexes I-V and supercomplexes. *Essays Biochem.* **62**:3, 255–270 (2018).
49. Nesterov, S.; Chesnokov, Y.; Kamyshinsky, R.; Panteleeva, A.; Lyamzaev, K.; Vasilov, R.; Yaguzhinsky, L.: Ordered Clusters of the Complete Oxidative Phosphorylation System in Cardiac Mitochondria. *Int J Mol Sci.* **22**:3, 1–10 (2021).
50. Strauss, M.; Hofhaus, G.; Schröder, R. R.; Kühlbrandt, W.: Dimer ribbons of ATP synthase shape the inner mitochondrial membrane. *EMBO J.* **27**:7, 1154–1160 (2008).
51. CUSABIO: *Oxidative Phosphorylation*. Dostupné z URL: <<https://www.cusabio.com/pathway/Oxidative-Phosphorylation.html>> [cit. 31. 1. 2024].
52. Stacpoole, P. W.; McCall, C. E.: The pyruvate dehydrogenase complex: Life's essential, vulnerable and druggable energy homeostat. *Mitochondrion* **70**, 59–102 (2023).



53. Reisch, A. S.; Elpeleg, O.: Biochemical Assays for Mitochondrial Activity: Assays of TCA Cycle Enzymes and PDHc. *Methods Cell Biol.* **80**, 199–222 (2007).
54. Nelson, D. L.; Cox, M. M.: *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4th ed. New York: W. H. Freeman & Co., 2004, p. 605–607.
55. Jelinek, B. A.; Moxley, M. A.: Detailed evaluation of pyruvate dehydrogenase complex inhibition in simulated exercise conditions. *Biophys J.* **120**:5, 936–949 (2021).
56. Sorbi, S.; Bird, E. D.; Blass, J. P.: Decreased pyruvate dehydrogenase complex activity in Huntington and Alzheimer brain. *Ann Neurol.* **13**:1, 72–78 (1983).
57. Naseri, N. N.; Bonica, J.; Xu, H.; Park, L. C.; Arjomand, J.; Chen, Z.; Gibson, G. E.: Novel Metabolic Abnormalities in the Tricarboxylic Acid Cycle in Peripheral Cells From Huntington’s Disease Patients. *PLoS One* **11**:9, (2016).
58. Vélot, C.; Srere, P. A.: Reversible Transdominant Inhibition of a Metabolic Pathway. *J Biol Chem.* **275**:17, 12926–12933 (2000).
59. Kispal, G.; Evans, C. T.; Malloy, C.; Srere, P. A.: Metabolic studies on citrate synthase mutants of yeast. A change in phenotype following transformation with an inactive enzyme. *J Biol Chem.* **264**:19, 11204–11210 (1989).
60. Reichmann, H.; Hoppeler, H.; Mathieu-Costello, O.; von Bergen, F.; Pette, D.: Biochemical and ultrastructural changes of skeletal muscle mitochondria after chronic electrical stimulation in rabbits. *Pflugers Arch.* **404**:1, 1–9 (1985).
61. Sumi, K.; Hatanaka, Y.; Takahashi, R.; Wada, N.; Ono, C.; Sakamoto, Y.; Sone, H.; Iida, K.: Citrate Synthase Insufficiency Leads to Specific Metabolic Adaptations in the Heart and Skeletal Muscles Upon Low-Carbohydrate Diet Feeding in Mice. *Front Nutr.* **9**:925908 (2022).
62. Fontán-Lozano, A.; López-Lluch, G.; Delgado-García, J. M.; Navas, P.; Carrión, A. M.: Molecular bases of caloric restriction regulation of neuronal synaptic plasticity. *Mol Neurobiol.* **38**:2, 167–177 (2008).
63. McCormack, J. G.; Denton, R. M.: Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> transport and the role of intramitochondrial Ca<sup>2+</sup> in the regulation of energy metabolism. *Dev Neurosci.* **15**:3-5, 165–173 (1993).
64. Brookes, P. S.; Yoon, Y.; Robotham, J. L.; Anders, M. W.; Sheu, S. S.: Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol.* **287**:4, 817–833 (2004).
65. Gomes, L. C.; Di Benedetto, G.; Scorrano, L.: During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nat Cell Biol.* **13**:5, 589–598 (2011).

66. Elgass, K.; Pakay, J.; Ryan, M. T.; Palmer, C. S.: Recent advances into the understanding of mitochondrial fission. *Biochim Biophys Acta* **1833**:1, 150–161 (2013).
67. Escobar-Henriques, M.; Anton, F.: Mechanistic perspective of mitochondrial fusion: Tubulation vs. fragmentation. *Biochim Biophys Acta* **1833**:1, 162–175 (2013).
68. Fischer, F.; Hamann, A.; Osiewacz, H. D.: Mitochondrial quality control: an integrated network of pathways. *Trends Biochem Sci.* **37**:7, 284–292 (2012).
69. Reddy, P. H.; Reddy, T. P.: Mitochondria as a therapeutic target for aging and neurodegenerative diseases. *Curr Alzheimer Res.* **8**:4, 393–409 (2011).
70. 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.* **46**:5, 462–475 (2022).
71. Kim, J.; Moody, J. P.; Edgerly, C. K.; Bordiuk, O. L.; Cormier, K.; Smith, K.; Beal, M. F.; Ferrante, R. J.: Mitochondrial loss, dysfunction and altered dynamics in Huntington's disease. *Hum Mol Genet.* **19**:20, 3919–3935 (2010).
72. Song, W.; Chen, J.; Petrilli, A.; Liot, G.; Klingmayr, E.; Zhou, Y.; Poquiz, P.; Tjong, J.; Pouladi, M. A.; Hayden, M. R.; Masliah, E.; Ellisman, M.; Rouiller, I.; Schwarzenbacher, R.; Bossy, B.; Perkins, G.; Bossy-Wetzel, E.: Mutant huntingtin binds the mitochondrial fission GTPase dynamin-related protein-1 and increases its enzymatic activity. *Nat Med.* **17**:3, 377–382 (2011).
73. Martinez-Vicente, M.; Talloczy, Z.; Wong, E.; Tang, G.; Koga, H.; Kaushik, S.; de Vries, R.; Arias, E.; Harris, S.; Sulzer, D.; Cuervo, A. M.: Cargo recognition failure is responsible for inefficient autophagy in Huntington's disease. *Nat Neurosci.* **13**:5, 567–576 (2010).
74. Youle, R. J.; Strasser, A.: The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **9**:1, 47–59 (2008).
75. Slee, E. A.; Harte, M. T.; Kluck, R. M.; Wolf, B. B.; Casiano, C. A.; Newmeyer, D. D.; Wang, H. G.; Reed, J. C.; Nicholson, D. W.; Alnemri, E. S.; Green, D. R.; Martin, S. J.: Ordering the Cytochrome c-initiated Caspase Cascade: Hierarchical Activation of Caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a Caspase-9-dependent Manner. *J Cell Biol.* **144**:2, 281–292 (1999).
76. Martin, E.; Betuing, S.; Pagès, C.; Cambon, K.; Auregan, G.; Deglon, N.; Roze, E.; Caboche, J.: Mitogen- and stress-activated protein kinase 1-induced neuroprotection in Huntington's disease: role on chromatin remodeling at the PGC-1-alpha promoter. *Hum Mol Genet.* **20**:12, 2422–2434 (2011).

77. Ismailoglu, I.; Chen, Q.; Popowski, M.; Yang, L.; Gross, S. S.; Brivanlou, A. H.: Huntingtin protein is essential for mitochondrial metabolism, bioenergetics and structure in murine embryonic stem cells. *Dev Biol.* **391**:2, 230–240 (2014).
78. Panov, A. V.; Gutekunst, C. A.; Leavitt, B. R.; Hayden, M. R.; Burke, J. R.; Strittmatter, W. J.; Greenamyre, J. T.: Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines. *Nat Neurosci.* **5**:8, 731–736 (2002).
79. Šonský, I.; Vodička, P.; Vodičková Kepková, K.; Hansíková, H.: Mitophagy in Huntington's disease. *Neurochem Int.* **149**:105147 (2021).
80. Dai, Y.; Wang H.; Lian A.; Li J.; Zhao G.; Hu S.; Li B.: A comprehensive perspective of Huntington's disease and mitochondrial dysfunction. *Mitochondrion* **70**, 8–19 (2023).
81. 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.: Myopathy as a first symptom of Huntington's disease in a marathon runner. *J Mov Disord.* **22**:11, 1637–1640 (2007).
82. Ribchester, R. R.; Thomson, D.; Wood, N. I.; Hinks, T.; Gillingwater, T. H.; Wishart, T. M.; Court, F. A.; Morton, A. J.: Progressive abnormalities in skeletal muscle and neuromuscular junctions of transgenic mice expressing the Huntington's disease mutation. *Eur J Neurosci.* **20**:11, 3092–3114 (2004).
83. 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.* **12**:7, (2019).
84. Almeida, S.; Sarmiento-Ribeiro, A. B.; Januário, C.; Rego, A. C.; Oliveira, C. R.: Evidence of apoptosis and mitochondrial abnormalities in peripheral blood cells of Huntington's disease patients. *Biochem Biophys Res Commun.* **374**:4, 599–603 (2008).
85. 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.: Severe ultrastructural mitochondrial changes in lymphoblasts homozygous for Huntington disease mutation. *Mech Ageing Dev.* **127**:2, 217–220 (2006).
86. Jędrak, P.; Mozolewski, P.; Węgrzyn, G.; Więckowski, M. R.: Mitochondrial alterations accompanied by oxidative stress conditions in skin fibroblasts of Huntington's disease patients. *Metab Brain Dis.* **33**:6, 2005–2017 (2018).

87. 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.: Bioenergetics in fibroblasts of patients with Huntington disease are associated with age at onset. *Neurol Genet.* **4**:5, (2018).
88. Janssen, A. J.; Trijbels, F. J.; Sengers, R. C.; Wintjes, L. T.; Ruitenbeek, W.; Smeitink, J. A.; Morava, E.; van Engelen, B. G.; van den Heuvel, L. P.; Rodenburg, R. J.: Measurement of the energy-generating capacity of human muscle mitochondria: diagnostic procedure and application to human pathology. *Clin Chem.* **52**:5, 860–871 (2006).
89. Daňhelovská, T.: Kapacita mitochondriálního energetického metabolismu v kultivovaných kožních fibroblastech. Diplomová práce, vedoucí Tesařová, M. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra buněčné biologie, 2016.
90. Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J.: *PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT\**. *J Biol Chem.* **193**:1, 265–275 (1951).
91. Srere, P. A.: [1] Citrate synthase: [EC 4.1.3.7. Citrate oxaloacetate-lyase (CoA-acetylating)]. *Methods Enzymol.* **13**, 3–11 (1969).
92. Agilent Technologies: Agilent Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit User Guide (2019). Dostupné z URL: <[https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/XF\\_Cell\\_Mito\\_Stress\\_Test\\_Kit\\_User\\_Guide.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/XF_Cell_Mito_Stress_Test_Kit_User_Guide.pdf)> [cit. 16. 3. 2024]
93. Agilent Technologies: Agilent Seahorse XF Glycolysis Stress Test Kit User Guide (2019). Dostupné z URL: <[https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/XF\\_Glycolysis\\_Stress\\_Test\\_Kit\\_User\\_Guide.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/XF_Glycolysis_Stress_Test_Kit_User_Guide.pdf)> [cit. 16. 3. 2024]
94. Agilent Technologies: Mitochondrial Respiration XF Cell Mito Stress Test. Dostupné z URL: <<https://www.agilent.com/en/support/cell-analysis/mitochondrial-respiration-xf-cell-mito-stress-test>> [cit. 16. 3. 2024]
95. Promega Corporation: CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay. Dostupné z URL: <<https://ch.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/0/celltiter-glo-luminescent-cell-viability-assay-protocol.pdf>> [cit. 17. 3. 2024]
96. Skene, D. J.; Middleton, B.; Fraser, C. K.; Pennings, J. L.; Kuchel, T. R.; Rudiger, S. R.; Bawden, C. S.; Morton, A. J.: Metabolic profiling of presymptomatic Huntington's disease sheep reveals novel biomarkers. *Sci Rep.* **7**:43030 (2017).
97. Stahl, W. L.; Swanson, P. D.: Biochemical abnormalities in Huntington's chorea brains. *Neurology* **24**:9, 813–9 (1974).

98. Browne, S. E.; Bowling, A. C.; MacGarvey, U.; Baik, M. J.; Berger, S. C.; Muqit, M. M.; Bird, E. D.: Beal MFOxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia. *Ann Neurol.* **41**:5, 646–53 (1997).
99. Gu, M.; Gash, M. T.; Mann, V. M.; Javoy-Agid, F.; Cooper, J. M.; Schapira, A. H.: Mitochondrial defect in Huntington's disease caudate nucleus. *Ann Neurol.* **39**:3, 385–389 (1996).
100. Tabrizi, S. J.; Workman, J.; Hart, P. E.; Mangiarini, L.; Mahal, A.; Bates, G.; Cooper, J. M.; Schapira, A. H.: Mitochondrial dysfunction and free radical damage in the Huntington R6/2 transgenic mouse. *Ann Neurol.* **47**:1, 80–86 (2000).
101. Guidetti, P.; Charles, V.; Chen, E. Y.; Reddy, P. H.; Kordower, J. H.; Whetsell, W. O.; Schwarcz, R.; Tagle, D. A.: Early degenerative changes in transgenic mice expressing mutant huntingtin involve dendritic abnormalities but no impairment of mitochondrial energy production. *Exp Neurol.* **169**:2, 340–350 (2001).
102. Lopes, C.; Tang, Y.; Anjo, S. I.; Manadas, B.; Onofre, I.; de Almeida, L. P.; Daley, G. Q.; Schlaeger, T. M.; Rego, A. C. C.: Mitochondrial and Redox Modifications in Huntington Disease Induced Pluripotent Stem Cells Rescued by CRISPR/Cas9 CAGs Targeting. *Front Cell Dev Biol.* **8**:576592 (2020).
103. Šonský, I.: Modulation of Mitophagy in Huntington Disease. Diplomová práce, vedoucí Hansíková, H. Praha: Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra buněčné biologie, 2022.
104. Hamilton, J.; Pellman, J. J.; Brustovetsky, T.; Harris, R. A.; Brustovetsky, N.: Oxidative metabolism in YAC128 mouse model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet.* **24**:17, 4862–78 (2015).
105. Milakovic, T.; Johnson, G. V.: Mitochondrial respiration and ATP production are significantly impaired in striatal cells expressing mutant huntingtin. *J Biol Chem.* **280**:35, 30773–82 (2005).

## 8 Přílohy

**Tabulka 8.1: Hodnoty získané z analýzy KMEM (kapacity mitochondriální energetického metabolismu) fibroblastů kontrol (K1–K4) a pacientů v asymptomatickém stádiu HN (P1–P4) normalizované na množství proteinu a aktivitu citrát syntasy.**

kontrola/pacient	KONTROLY				ASYMPTOMATIČTÍ				
	K1	K2	K3	K4	P1	P2	P3	P4	
pasáž	11	8	18	16	13	11	13	14	
koncentrace proteinu (mg/ml)	4,62	3,39	4,46	4,86	4,93	4,29	5,64	4,98	
aktivita CS (nmol/min/mg)	66,7	44,1	38,0	38,7	39,8	44,0	29,7	33,1	
KMEM inkubace (nmol/h/mg)	1	153	95	150	70	73	76	76	130
	2	110	76	118	47	66	57	57	98
	3	92	71	57	51	57	46	46	61
	4	95	76	142	69	61	70	70	83
	4a	102	66	81	36	49	45	45	62
	5	66	46	117	59	39	71	71	100
	6	7	12	20	7	5	14	14	12
	7	10	10	27	9	8	10	10	18
	8	6	5	55	7	9	6	6	11
normalizace KMEM inkubací na CS	1/CS	2,29	2,16	3,96	1,80	1,83	1,62	2,57	3,93
	2/CS	1,65	1,73	3,09	1,22	1,67	1,49	1,93	2,96
	3/CS	1,37	1,62	1,50	1,31	1,44	1,25	1,55	1,85
	4/CS	1,43	1,73	3,73	1,79	1,54	1,20	2,37	2,52
	4a/CS	1,53	1,49	2,14	0,94	1,23	1,02	1,52	1,86
	5/CS	1,00	1,04	3,09	1,51	0,97	1,22	2,38	3,01
	6/CS	0,11	0,28	0,51	0,18	0,13	0,11	0,46	0,35
	7/CS	0,14	0,22	0,71	0,23	0,20	0,14	0,34	0,54
	8/CS	0,10	0,12	1,44	0,18	0,22	0,06	0,21	0,34
9/CS	0,25	0,17	0,73	0,31	0,26	0,23	0,60	0,74	

**Vysvětlivky:** K – kontrola, P – pacient, CS – citrát syntasa.

**Složení inkubací:** 1 [1-<sup>14</sup>C]pyruvát + malát + ADP, 2 [1-<sup>14</sup>C]pyruvát + karnitin + ADP, 3 [1-<sup>14</sup>C]pyruvát + malát (–ADP), 4 [1-<sup>14</sup>C]pyruvát + malát (–ADP) + CCCP, 4a [1-<sup>14</sup>C]pyruvát – karnitin + ADP, 5 [1-<sup>14</sup>C]pyruvát + malát + ADP + atraktylosid, 6 [U-<sup>14</sup>C]malát + pyruvát + malonát + ADP, 7 [U-<sup>14</sup>C]malát + acetylkarnitin + malonát + ADP, 8 [U-<sup>14</sup>C]malát + acetylkarnitin + arsenit + ADP, 9 [1,4-<sup>14</sup>C]sukcinát + acetylkarnitin + ADP.

**Tabulka 8.2: Získané hodnoty poměrů inkubací analýzy KMEM fibroblastů kontrol (K1–K4) a pacientů v asymptomatickém stádiu HN (P1–P4).**

kontrola/pacient	KONTROLY				ASYMPTOMATIČTÍ				
	K1	K2	K3	K4	P1	P2	P3	P4	
poměry inkubací KMEM	(1/3)	1,67	1,33	2,63	1,38	1,27	1,30	1,66	2,12
	(2/1)	0,72	0,80	0,78	0,67	0,91	0,92	0,75	0,75
	(4/1)	0,62	0,80	0,94	0,99	0,84	0,74	0,92	0,64
	(3/5)	1,38	1,56	0,49	0,86	1,48	1,02	0,65	0,62
	(6/1)	0,05	0,13	0,13	0,10	0,07	0,07	0,18	0,09
	(7/6)	1,31	0,81	1,39	1,28	1,53	1,31	0,74	1,54
	(7/8)	1,52	1,81	0,50	1,29	0,89	2,35	1,60	1,57

**Vysvětlivky:** K – kontrola, P – pacient.

**Složení inkubací:** 1 [1-<sup>14</sup>C]pyruvát + malát + ADP, 2 [1-<sup>14</sup>C]pyruvát + karnitin + ADP, 3 [1-<sup>14</sup>C]pyruvát + malát (–ADP), 4 [1-<sup>14</sup>C]pyruvát + malát (–ADP) + CCCP, 5 [1-<sup>14</sup>C]pyruvát + malát + ADP + atraktylosid, 6 [U-<sup>14</sup>C]malát + pyruvát + malonát + ADP, 7 [U-<sup>14</sup>C]malát + acetylkarnitin + malonát + ADP, 8 [U-<sup>14</sup>C]malát + acetylkarnitin + arsenit + ADP.

**Tabulka 8.3: Hodnoty získané z analýzy KMEM fibroblastů pacientů v časném stádiu HN (P5–P8) a pacientů v pokročilém stádiu HN (P9–P11) normalizované na množství proteinu a aktivitu citrátsyntasy.**

kontrola/pacient	ČASNÍ				POKROČILÍ				
	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	
pasáž	10	9	15	14	8	9	8	12	
koncentrace proteinu (mg/ml)	2,82	3,14	4,44	4,80	5,60	4,39	4,49	5,61	
aktivita CS (nmol/min/mg)	75,1	24,7	45,4	36,8	48,4	57,9	30,6	48,3	
KMEM inkubace (nmol/h/mg)	1	92	89	115	150	104	103	69	144
	2	101	53	100	69	117	72	67	106
	3	118	49	70	47	77	76	37	63
	4	101	59	76	75	84	54	73	99
	4a	92	47	59	55	70	54	34	99
	5	100	61	95	62	99	70	21	85
	6	4	9	10	8	4	6	6	10
	7	7	16	14	14	9	5	5	16
	8	3	9	8	8	2	7	4	25
9	14	18	21	15	12	4	9	11	
normalizace KMEM inkubací na CS	1/CS	1,23	3,59	2,54	4,06	2,15	1,79	2,26	2,97
	2/CS	1,34	2,15	2,19	1,86	2,43	1,24	2,18	2,20
	3/CS	1,57	1,99	1,55	1,27	1,58	1,31	1,22	1,30
	4/CS	1,35	2,38	1,68	2,04	1,73	0,94	2,38	2,04
	4a/CS	1,22	1,88	1,29	1,49	1,45	0,93	1,12	2,05
	5/CS	1,33	2,49	2,09	1,70	2,04	1,20	0,68	1,76
	6/CS	0,06	0,35	0,22	0,22	0,09	0,11	0,20	0,21
	7/CS	0,10	0,63	0,30	0,38	0,19	0,09	0,15	0,33
	8/CS	0,05	0,36	0,18	0,21	0,04	0,13	0,12	0,53
9/CS	0,19	0,75	0,46	0,41	0,25	0,08	0,30	0,23	

**Vysvětlivky:** P – pacient, CS – citrátsyntasa.

**Složení inkubací:** 1  $[1-^{14}C]$ pyruvát + malát + ADP, 2  $[1-^{14}C]$ pyruvát + karnitin + ADP, 3  $[1-^{14}C]$ pyruvát + malát (–ADP), 4  $[1-^{14}C]$ pyruvát + malát (–ADP) + CCCP, 4a  $[1-^{14}C]$ pyruvát – karnitin + ADP, 5  $[1-^{14}C]$ pyruvát + malát + ADP + atraktylosid, 6  $[U-^{14}C]$ malát + pyruvát + malonát + ADP, 7  $[U-^{14}C]$ malát + acetylkarnitin + malonát + ADP, 8  $[U-^{14}C]$ malát + acetylkarnitin + arsenit + ADP, 9  $[1,4-^{14}C]$ sukcinát + acetylkarnitin + ADP.

**Tabulka 8.4: Získané hodnoty poměrů inkubací analýzy KMEM fibroblastů pacientů v časném stádiu HN (P5–P8) a pacientů v pokročilém stádiu HN (P9–P11).**

kontrola/pacient	ČASNÍ				POKROČILÍ				
	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	
poměry inkubací KMEM	(1/3)	0,78	1,80	1,64	3,21	1,36	1,36	1,85	2,28
	(2/1)	1,09	0,60	0,86	0,46	1,13	0,70	0,97	0,74
	(4/1)	1,09	0,66	0,66	0,50	0,81	0,52	1,05	0,69
	(3/5)	1,18	0,80	0,74	0,75	0,78	1,09	1,79	0,74
	(6/1)	0,05	0,10	0,09	0,05	0,04	0,06	0,09	0,07
	(7/6)	1,67	1,79	1,35	1,75	2,17	0,84	0,75	1,54
	(7/8)	2,18	1,74	1,70	1,86	4,34	0,69	1,22	0,63

**Vysvětlivky:** P – pacient.

**Složení inkubací:** 1  $[1-^{14}C]$ pyruvát + malát + ADP, 2  $[1-^{14}C]$ pyruvát + karnitin + ADP, 3  $[1-^{14}C]$ pyruvát + malát (–ADP), 4  $[1-^{14}C]$ pyruvát + malát (–ADP) + CCCP, 5  $[1-^{14}C]$ pyruvát + malát + ADP + atraktylosid, 6  $[U-^{14}C]$ malát + pyruvát + malonát + ADP, 7  $[U-^{14}C]$ malát + acetylkarnitin + malonát + ADP, 8  $[U-^{14}C]$ malát + acetylkarnitin + arsenit + ADP.

**Tabulka 8.5: Hodnoty parametrů mitochondriální respirace získané z analýzy míry spotřeby kyslíku (OCR) fibroblastů kontrol a pacientů s HN měřené na přístroji Seahorse Xfe24.**

pacient/kontrola		OCR (amol/s/buňku)				
		bazální respirace	bazální respirace s glukosou	protonový únik	maximální respirace	ATP produkce
KONTROLY	K1	65,64	47,22	7,27	94,77	58,37
	K2	60,26	46,23	6,46	81,97	53,80
	K3	67,82	51,92	8,33	100,88	59,49
ASYMPTOMATIČTÍ	P2	69,51	60,62	11,31	149,00	58,20
	P4	55,24	41,01	8,70	101,98	46,54
ČASNÍ	P7	65,45	50,36	6,65	164,22	58,80
	P8	61,68	44,07	7,68	102,35	53,99
POKROČILÍ	P9	40,87	25,31	5,56	45,76	35,31
	P11	53,71	39,20	5,70	68,98	48,02

Vysvětlivky: K – kontrola, P – pacient. Hodnoty uvedené v tabulce jsou průměrem z pěti měření.

**Tabulka 8.6: Hodnoty parametrů glykolytické aktivity získané z analýzy míry extracelulární acidifikace prostředí (ECAR) fibroblastů kontrol a pacientů s HN měřené na přístroji Seahorse XFe24.**

pacient/kontrola		ECAR (mpH/s/buňku)		
		glykolýza	glykolytická kapacita	glykolytická rezerva
KONTROLY	K1	8,94E-06	1,59E-05	6,98E-06
	K2	9,37E-06	1,85E-05	9,09E-06
	K3	9,68E-06	1,98E-05	1,01E-05
ASYMPTOMATIČTÍ	P2	7,81E-06	1,38E-05	6,00E-06
	P4	9,29E-06	1,72E-05	7,91E-06
ČASNÍ	P7	7,46E-06	1,89E-05	1,15E-05
	P8	9,45E-06	1,50E-05	5,59E-06
POKROČILÍ	P9	1,02E-05	1,61E-05	5,93E-06
	P11	8,11E-06	1,86E-05	1,05E-05

Vysvětlivky: K – kontrola, P – pacient. Hodnoty uvedené v tabulce jsou průměrem z pěti měření.

**Tabulka 8.7: Získané hodnoty množství ATP ve fibroblastech pacientů s HN a kontrol měřené pomocí luminiscence (Promega).**

pacient/kontrola		ATP/buňku (fmol)			
		1	2	3	4
KONTROLY	K1	14,77	15,10	14,57	14,08
	K2	13,69	14,58	ns	ns
	K3	9,54	10,47	9,85	10,67
	K4	12,34	12,59	10,48	10,76
ASYMPTOMATIČTÍ	P1	ns	ns	11,68	12,03
	P2	7,80	9,23	8,25	8,96
	P3	9,99	9,15	11,33	9,31
	P4	15,70	20,87	12,52	12,17
ČASNÍ	P5	11,66	16,93	6,81	6,99
	P6	10,71	11,02	11,39	11,30
	P7	9,56	9,55	ns	ns
	P8	15,29	14,06	13,44	16,18
POKROČILÍ	P9	13,61	13,88	13,14	13,64
	P10	15,17	15,36	15,28	15,58
	P11	9,81	9,73	10,13	10,73
	P12	10,59	11,41	12,35	12,96

Vysvětlivky: K – kontrola, P – pacient, ns – odlehle hodnoty, které nebyly zahrnuty do výpočtu. Hodnoty uvedené v tabulce jsou průměrem ze čtyř měření.



**Tabulka 8.8: Hodnoty získané při stanovení katalytické aktivity pyruvátdehydrogenasového komplexu ve fibroblastech kontrol (K1, K2) a pacientů s HN (P3, P4, P9, P10, P11).**

Kontrola/ pacient	Koncentrace proteinu (mg/ml)	Specifická aktivita PDHc (nmol/min/mg prot)				
		1	2	3	4	průměr
K1	2,71	9,7058	6,3165	7,1458	2,2188	<b>6,35</b>
K2	4,25	3,8062	1,1308	ns	ns	<b>2,47</b>
P3	2,62	1,8074	0,6116	ns	4,1159	<b>2,18</b>
P4	2,26	7,0542	2,5888	ns	9,4597	<b>6,37</b>
P9	2,39	ns	0,2633	0,0203	0,1607	<b>0,15</b>
P10	2,40	1,0225	0,5214	ns	0,6905	<b>0,74</b>
P11	2,38	0,1232	0,0906	0,6651	ns	<b>0,29</b>

*Vysvětlivky: K – kontrola, P – pacient, ns – odlehlé hodnoty, které nebyly zahrnuty do výpočtu.*

**Tabulka 8.9: Aktivita pyruvátdehydrogenasového komplexu (PDHc) ve fibroblastech kontrol a pacientů s HN měřená pracovníkem Laboratoře pro studium mitochondriálních poruch.**

Kontrola/ pacient	Specifická aktivita PDHc (nmol/min/mg prot)
K3	0,38
K4	0,29
P1	0,65
P2	0,47
P5	0,81
P6	0,5
P7	0,43
P8	0,87
P12	3,07

*Vysvětlivky: K – kontrola, P – pacient. Hodnoty v tabulce jsou průměrem ze čtyř měření (N = 4).*

**Tabulka 8.10: Aktivity vybraných komplexů systému OXPHOS a citrát syntasy stanovené spektrofotometricky ve fibroblastech kontrol a pacientů. Stanovení bylo provedeno pracovníky Laboratoře pro studium mitochondriálních poruch.**

Pacient/kontrola		Aktivita enzymů (nmol/min/mg)				
		COX	CS	COX/CS	NQR	SDH
KONTROLY	K1	15,56	33,27	0,47	30,18	14,08
	K2	8,95	57,37	0,16	62,01	17,45
	K3	7,9	30,0	0,26	15,3	10,6
	K4	16,0	43,0	0,37	16,9	17,4
ASYMPTOMATIČTÍ	P1	1,86	11,88	0,16	17,06	14,72
	P2	15,89	34,34	0,46	40,04	10,36
	P3	7,24	17,72	0,41	43,22	13,65
	P4	21,16	32,26	0,66	36,47	17,02
ČASNÍ	P5	29,86	35,42	0,84	32,28	15,55
	P6	30,74	55,45	0,55	73,8	25
	P7	15,83	36,36	0,44	25,05	13,29
	P8	19,92	50,71	0,39	42,51	12,96
POKROČILÍ	P9	15,44	58,76	0,26	55,35	17,26
	P10	14,69	58,28	0,25	32,43	18,35
	P11	15,37	41,71	0,37	46,46	14,62
	P12	16,16	22,64	0,71	nd	11,11

**Vysvětlivky:** *K* – kontrola, *P* – pacient, *COX* – cytochrom *c* oxidasa (komplex IV), *CS* – citrát syntasa, *NQR* – NADH:ubichinon oxidoreduktasa (komplex I), *SDH* – sukcinátdehydrogenasa (komplex II), *nd* – neměřeno.

***Příloha 1: Abstrakt příspěvku předneseného na 25. Studentské vědecké konferenci  
1. LF UK***

**MITOCHONDRIÁLNÍ BIOMARKERY V RŮZNÝCH FÁZÍCH ROZVOJE  
HUNTINGTONOVY NEMOCI**

Katarína Ďurčková<sup>1</sup>, Lucie Rychtářová<sup>1</sup>, Jana Křížová<sup>1</sup>, Jan Roth<sup>2</sup>, Jiří Klempíř<sup>2</sup>, Hana Hansíková<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Klinika pediatrie a dědičných poruch metabolismu, 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy a Všeobecná fakultní nemocnice v Praze, Praha, Česká republika

<sup>2</sup>Neurologická klinika, 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy a Všeobecná fakultní nemocnice v Praze, Praha, Česká republika

**Úvod:** Huntingtonova nemoc (HN) je autozomálně dominantní neurodegenerativní onemocnění. Naše předchozí studie prokázaly poškození mitochondriálních (mito) parametrů v lymfocytech a v kultivovaných fibroblastech (F) pacientů (P) s rozvinutou HN.

Cílem bylo otestovat, zda by vybrané mito parametry ve F mohly být použity k monitorování progresu v počátečních stádiích HN.

**Materiál a metody:** Soubor tvořily F od 12 P s geneticky prokázanou HN: 4P v bezpříznakovém (1-HN), 4P v časném (2-HN) a 4P v rozvinutém stádiu (3-HN) nemoci, a F od 4 zdravých osob (K). Mitochondriální respirace (RE) a glykolytická aktivita (GA) byla analyzována pomocí sledování spotřeby kyslíku v reálném čase (Seahorse), produkce ATP pomocí luminiscence (Promega), metabolický obrat pomocí oxidace substrátů (OS). Aktivity komplexů dýchacího řetězce (KDR) a citrátsyntázy byly sledovány spektrofotometricky.

**Výsledky:** P v 3-HN měli sníženou bazální i maximální RE oproti K, zatímco P v 1-HN a v 2-HN měli maximální RE zvýšenou. OS naznačila u P v 3-HN možný defekt na úrovni Krebsova cyklu. U P v 1-HN byl pozorován pokles míry oxidace pyruvátu a P v 3-HN vykazovaly sníženou míru oxidace malátu a sukcinátu. V našem souboru nebyly zjištěny signifikantní rozdíly v GA buněk, v aktivitách jednotlivých KDR a v produkci ATP.

**Závěr:** Tato pilotní studie je základem pro další výzkum mito role u HN na širším souboru vzorků a na jiných typech neinvazivního biologického materiálu.

Podporováno AZV MZ ČR NU21-04-00136.

**Citace:** Ďurčková K. (2024). Mitochondriální biomarkery v různých fázích rozvoje Huntingtonovy nemoci. In: Malý, L. (Ed.) *Sborník 25. Studentské vědecké konference*, Praha 7. 5. 2024. Dostupné z URL: <<https://www.lf1.cuni.cz/file/103877/06-zlomnahled-svk-2024.pdf?version=202405071805>> [cit. 10. 5. 2024]

**Příloha 2: Příspěvek přednesený na 25. Studentské vědecké konferenci 1. LF UK ve formě vědeckého posteru.**

**MITOCHONDRIÁLNÍ BIOMARKERY V RŮZNÝCH FÁZÍCH ROZVOJE HUNTINGTONOVY NEMOCI**



1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA  
Univerzita Karlova

Katarína Ďurčeková<sup>1</sup>, Lucie Rychtářová<sup>1</sup>, Jana Křížová<sup>1</sup>, Jan Roth<sup>2</sup>, Jiří Klempíř<sup>2</sup>, Hana Hansíková<sup>1</sup>

1 Klinika pediatrie a dědičných poruch metabolismu, 1. LF UK a VFN Praha, 2 Neurologická klinika, 1. LF UK a VFN Praha

**ÚVOD**

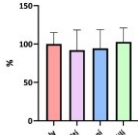
Huntingtonova nemoc (HN) je závažně autozomálně dominantní neurodegenerativní onemocnění. Klinickému projevu HN předchází asymptomatické období, kdy již probíhají kontinuitní biochemické, strukturální a funkční změny na buněčné úrovni. Naše předchozí studie prokázaly poškození mitochondriálních parametrů v lymfocytech a v kultivovaných fibroblastech pacientů s rozvinutou HN (1,2). Cílem studie bylo otestovat, zda by vybrané mitochondriální parametry ve fibroblastech mohly být použity k monitorování progresu v počátečních stádiích HN.

**MATERIÁL A METODY**

Soubor tvořily fibroblasty od 12 pacientů s geneticky prokázanou HN: 4 pacienti v asymptomatickém, 4 v časném a 4 v rozvinutém stádiu nemoci, a fibroblasty od 4 zdravých osob (Tab. 1). Mitochondriální respirace a glykolytická aktivita byla analyzována pomocí sledování spotřeby kyslíku a změn pH v reálném čase (Seahorse), produkce ATP pomocí luminiscence (Promega), metabolický obrat a katalytická aktivita pyruvátdehydrogenosového komplexu pomocí oxidace substrátů. Aktivity komplexů dýchacího řetězce a citrát syntasy byly sledovány spektrofotometricky.

**Tabulka 1. Soubor**

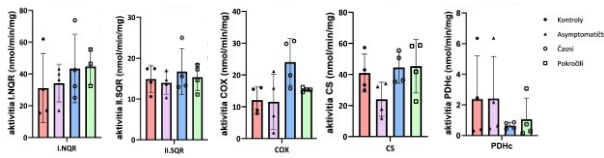
Stadium	Pohlaví	Věk	Počet CAG tripletů	Délka trvání nemoci (roky)	TFC	Klinické příznaky
KONTROLY	Ž	33	nd	0	13	0
	Ž	47	nd	0	13	0
	M	29	18/19	0	13	0
	M	36	20/20	0	13	0
ASYMPTOMATIČTÍ	M	48	41	0	13	0
	M	31	44	0	13	0
	Ž	41	40	0	13	0
	Ž	50	41	0	13	0
ČASNÍ	Ž	38	46	7	12	inic. změny chování
	M	25	45	4	10	změny chování
	Ž	48	49	8	12	motorika
	M	45	43	5	13	deprese
POKROČILÍ	Ž	29	52	2	13	motorika, ztráta náhledu
	M	50	45	11	8	inic. motorika, exekutivní deficit
	M	47	45	5	12	inic. motorika
	Ž	61	43	4	12	motorika



**Obrázek 3. ATP produkce měřená ve fibroblastech pacientů s HN a kontrol pomocí luminometru GloMax-Multi+ (Promega).**

Hodnota 100 % na ose x představuje průměrné množství ATP vyprodukované buňkami kontrol. Je uvedena hodnota průměru od 4 linií, počet měření v každé linii N=16.

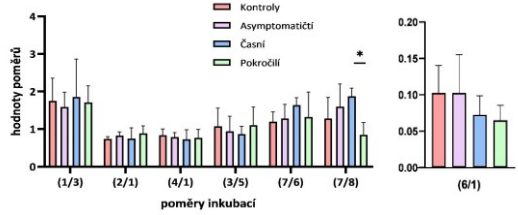
**Aktivita enzymů dýchacího řetězce, CS a PDHc**



**Obrázek 5. Aktivita komplexů dýchacího řetězce (komplex I, II a IV), citrát syntasy (CS) a pyruvátdehydrogenosového komplexu (PDHc) v kultivovaných kožních fibroblastech pacientů s HN a kontrol měřená spektrofotometricky. Nebyly zjištěny signifikantní rozdíly mezi skupinami. N=4**

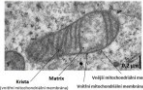
**VÝSLEDKY**

**Kapacita mitochondriálního energetického metabolismu**

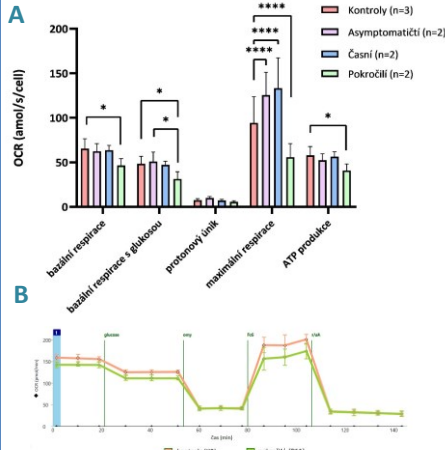


**Obrázek 1. Analýza kapacity mitochondriálního energetického metabolismu ve fibroblastech pacientů v asymptomatickém, časném a pokročilém stádiu HN a kontrol. Jsou uvedeny poměry jednotlivých inkubací. V každé skupině je uvedena hodnota průměru od 4 linií. Statistická analýza byla provedena použitím ANOVA testu s Tukeyho testem vícenásobného porovnání (\*P<0,05). Snížený poměr 7/8 indikuje dysfunkci Krebsova cyklu a snížený poměr 6/1 poruchy OXPHOS. Složení inkubací: 1 [1-<sup>14</sup>C]pyruvát + malát + ADP, 2 [1-<sup>14</sup>C]pyruvát + karnitin + ADP, 3 [1-<sup>14</sup>C]pyruvát + malát (- ADP), 4 [1-<sup>14</sup>C]pyruvát + malát (- ADP) + CCCP, 5 [1-<sup>14</sup>C]pyruvát + malát + ADP + atraktolyd, 6 [U-<sup>14</sup>C]malát + pyruvát + malonát + ADP, 7 [U-<sup>14</sup>C]malát + acetylkarntin + malonát + ADP, 8 [U-<sup>14</sup>C]malát + acetylkarntin + arsenit + ADP.**

**Obrázek 2. Ultrastruktura mitochondrie (elektronmikroskopický snímek). Zdroj: referenze3.**

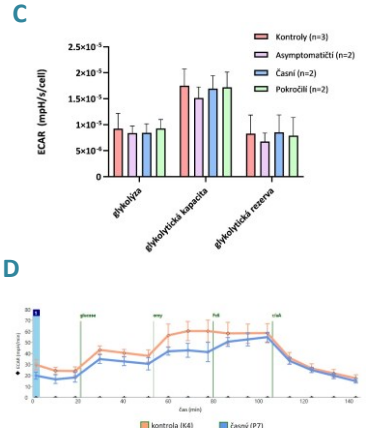


**Míra spotřeby kyslíku (Seahorse)**



**Obrázek 4. A. Parametry mitochondriální respirace fibroblastů pacientů s HN a kontrol měřené na přístroji Seahorse Xfe24. Statistická analýza byla provedena použitím ANOVA testu s Tukeyho testem vícenásobného porovnání (\*P<0,05, \*\*\*\*P<0,0001). B. Ukázka křivky míry spotřeby kyslíku (OCR) buňkami kultivovaných kožních fibroblastů od pacienta v pokročilém stádiu HN (P3) a kontroly (K2). C. Parametry glykolytické aktivity fibroblastů pacientů s HN a kontrol měřené na přístroji Seahorse Xfe24. D. Ukázka křivky míry extracelulární acidifikace prostředí (ECAR) buňkami kultivovaných kožních fibroblastů od pacienta v časném stádiu HN (P7) a kontroly (K4). OCR - míra spotřeby kyslíku (z angl. oxygen consumption rate), ECAR - míra extracelulární acidifikace prostředí (z angl. extracellular acidification rate), n - počet analyzovaných buněčných linií v dané skupině, každá linie byla měřena v tetraplátkách.**

**Glykolytická aktivita (Seahorse)**



**SHRNUTÍ**

**ASYMPTOMATIČTÍ PACIENTI S HN:** zvýšená maximální respirace  
**ČASNÍ PACIENTI S HN:** zvýšená maximální respirace  
**POKROČILÍ PACIENTI S HN:** snížená bazální a maximální respirace, poruchy Krebsova cyklu, poruchy systému OXPHOS  
 Žádné signifikantní rozdíly v ATP produkci, glykolytické aktivitě, aktivitě komplexů dýchacího řetězce (KI, KII, KIV), citrát syntasy a pyruvátdehydrogenasy nebyly zjištěny.  
 Tato pilotní studie je základem pro další výzkum mitochondriální role u HN na širším souboru vzorků a na jiných typech neinvazivního biologického materiálu.

Tato práce byla finančně podpořena výzkumným projektem NU20-04-00136.

Reference: 1. Askeland G et al. Increased nuclear DNA damage precedes mitochondrial dysfunction in peripheral blood mononuclear cells from Huntington's disease patients. *Sci Rep*. 2018; 29:8(1):1-17. doi: 10.1038/s41598-018-27985-y. PMID: 29959348; PMCID: PMC6026140.  
 2. Vaniova M et al. 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.  
 3. Vaniova M. Studium změn struktury a energetického metabolismu mitochondrií u pacientů s Huntingtonovou chorobou a u transgenního modelu minipřasete. *Dizertační práce*, vedoucí Hansíková, H. Praha: Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Klinika pediatrie a dědičných poruch metabolismu 1. LF UK a VFN, 2023.

