

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BIOCHEMIE**

**PROTEINOVÁ ANALÝZA ASEMBLAČNÍCH
INTERMEDIÁTŮ SAVČÍ CYTOCHROM C OXIDASY**

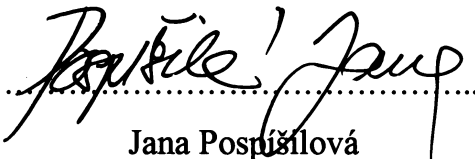
**Diplomová práce
studijního oboru Klinická a toxikologická analýza**

**Vedoucí diplomové práce:
MUDr. Josef Houštěk, DrSc.
(oddělení Bioenergetiky, Fyziologický ústav AV ČR)
Doc. RNDr. Jiří Hudeček, CSc.
(interní školitel, Katedra biochemie PŘF UK)**

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením svého školitele MUDr. Josefa Houšťka, DrSc., odborného konzultanta Mgr. Petra Peciny, Ph.D. a Doc. RNDr. Jiřího Hudečka, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne


.....
Jana Pospíšilová

Ráda bych poděkovala svému školiteli doktoru Josefu Houšťkovi za možnost pracovat v laboratoři Bioenergetiky a celému oddělení laboratoře za pomoc, cenné rady a přátelský přístup – jmenovitě doktoru Zdenku Drahotovi, Věře Fialové, Vladěce Brožkové, Marku Vrbackému, Vilmě Kaplanové, Janu Paulovi, Andree Potocké, Pavlu Ješinovi, Vendule Havlíčkové, Nikole Kovářové, Katce Hejzlarové a Hance Nůskové, a také svému odbornému konzultantovi Petru Pecinovi a Aleně Pecinové, kteří odjeli do Ameriky moc brzy.

Svým nejbližším, rodině a přátelům, děkuji za všestrannou podporu při studiích a za to, že mi dosud tolik fandí.

Tato diplomová práce byla podporována Grantovou Agenturou České republiky (303/07/0781).

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK	6
VYSVĚTLIVKY	8
ÚVOD.....	9
1 PŘEHLED PROBLEMATIKY	10
1.1 MITOCHONDRIE	10
1.2 OXIDAČNÍ FOSFORYLACE A KOMPLEXY DÝCHACÍHO ŘETĚZCE	11
1.3 MITOCHONDRIÁLNÍ BIOGENEZE A GENETIKA.....	13
1.4 STRUKTURA A FUNKCE MITOCHONDRIÁLNÍCH KOMPLEXŮ OXPHOS.....	15
1.4.1 Komplex I.....	15
1.4.2 Komplex II.....	16
1.4.3 Komplex III	16
1.4.4 Komplex IV – cytochrom <i>c</i> oxidasa	17
1.4.4.1 Struktura COX.....	17
1.4.4.2 Katalytický cyklus COX.....	19
1.4.4.3 Protonová translokace.....	21
1.4.4.4 Biogeneze holoenzymu COX.....	22
1.4.5 Komplex V – F ₀ F ₁ ATP synthasa	26
1.4.5.1 Struktura ATP synthasy.....	26
1.4.5.2 Funkce ATP synthasy.....	27
1.4.5.3 Biogeneze ATP synthasy.....	29
1.5 REGULACE SYSTÉMU OXPHOS	31
1.6 MITOCHONDRIÁLNÍ CHOROBY	32
1.6.1 Mitochondriální choroby na podkladě dysfunkce COX.....	34
1.6.2 Leighův syndrom spojený s izolovanou poruchou COX	34
1.6.2.1 Surf1 exprese a funkce	35
1.6.2.2 Surf1 mutace a změny ve struktuře a funkci COX.....	36
1.6.3 Mutace v mtDNA úseku kódujícím podjednotku Atp6 ATP synthasy a podjednotku Cox3 cytochrom <i>c</i> oxidasy	37
2 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE.....	38
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	39
3.1 MATERIÁL	39
3.1.1 Přístroje a pomůcky	39
3.1.2 Chemikálie.....	40

3.1.3 Experimentální modely	42
3.2 METODY	42
3.2.1 Sklizení buněk a izolace mitochondrií z fibroblastů	42
3.2.2 Stanovení koncentrace proteinů.....	43
3.2.3 Vzorky myších tkání.....	44
3.2.4 Solubilizace mitochondrií.....	44
3.2.5 Příprava vzorků na elektroforézy	45
3.2.6 Elektroforetické metody	45
3.2.7 Western blot na PVDF membrány	48
3.2.8 Imunodetekce specifickými protilátkami	49
3.2.9 Detekce signálu rozpoznávaného antigenu pomocí systému Odyssey	53
3.2.10 Barvení gelů.....	53
3.2.11 Stripování membrán	53
3.2.12 Vyhodnocování výsledků	54
4 VÝSLEDKY	55
4.1 COX DEFICIENCE NA PODKLADĚ VYŘAZENÍ GENU <i>SURF1</i>	55
4.1.1 Kvantitativní analýza myších tkání	55
4.1.2 Analýza myších tkání dvourozměrnou analýzou.....	56
4.2 COX DEFICIENCE NA PODKLADĚ mtDNA MIKRODELECE V GENU <i>ATP6/COX3</i>	62
4.2.1 Imunodetekce podjednotky Cox3	62
4.2.2 Detekce množství podjednotky Cox3 u pacienta	63
4.2.3 Analýza kultivovaných fibroblastů pacienta dvourozměrnou elektroforézou.....	64
5 DISKUZE	67
6 ZÁVĚR.....	70
SEZNAM LITERATURY	71

Příloha

SEZNAM ZKRATEK

AB	roztok akrylamidu a bisakrylamidu
ADP	adenosindifosfát
AP	peroxosíran amonný
ATP	adenosintrifosfát
A6L	podjednotka mitochondriální F ₀ F ₁ ATP synthasy
AU	arbitrární jednotka, bez vazby na jednotku systému SI
Å	angström, 1 Å = 10 ⁻¹⁰ metru
Bisakrylamid	N, N'-metylenbisakrylamid
Bis-Tris	bis-(2-hydroxyethyl)-imino-tris-(hydroxymethyl)-methan
BN vzorek	vzorek upravený pro analýzu metodou BN-PAGE
BSA	hovězí sérový albumin
cm	centimetr
cm ²	centimetr čtvereční
COX	cytochrom <i>c</i> oxidasa
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EGTA	kyselina ethylenglykol-bis-(2-aminoethylether)-tetraoctová
FADH ₂	flavinadenindinukleotid, redukovaná forma
Fe-S	klastr železo-síra (z anglického „iron-sulfur“ cluster)
g	gram
g	gravitační zrychlení, 9,81 m s ⁻²
GB	gelový pufr
HCl	kyselina chlorovodíková
HHM	Human Heart Mitochondria, lidské srdeční mitochondrie
hod	hodina
H ₂ O	voda, čistota – deionizovaná
IF ₁	regulační podjednotka mitochondriální F ₀ F ₁ ATP synthasy
KCl	chlorid draselný
kDa	kilodalton, 1 dalton = 1 Da = 1 u (atomová hmotnostní jednotka) = 1,661 .10 ⁻²⁷ kilogramu
KH ₂ PO ₄	dihydrogenfosforečnan draselný
l	litr
LM	dodecyl-β-D-maltosid, lauroylmaltosid

LM1	solubilizace mitochondrií 10% lauroylmaltosidem v poměru 1 mg detergentu na 1 mg proteinu
LM4	solubilizace mitochondrií 10% lauroylmaltosidem v poměru 4 mg detergentu na 1 mg proteinu
M	molární koncentrace mol dm ⁻³
mA	miliampér
μl	mikrolitr
μm	mikrometr
μM	molární koncentrace μmol dm ⁻³
mg	miligram
mGPDH	mitochondriální glycerol-3-fosfátdehydrogenasa
min	minuta
ml	mililitr
mM	molární koncentrace mmol dm ⁻³
mRNA	mediátorová (messengerová) ribonukleová kyselina
mtDNA	mitochondriální deoxyribonukleová kyselina
NaCl	chlorid sodný
NADH	nikotinamidadeninukleotid, redukovaná forma
NaOH	hydroxid sodný
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného
nDNA	jaderná deoxyribonukleová kyselina
nm	nanometr
OSCP	protein citlivý na oligomycin (z anglického „Oligomycin Sensitivity Conferring Protein“)
OXPHOS	oxidační fosforylace
PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
PBS	fosfátem pufovaný fyziologický roztok
PBST	fosfátem pufovaný fyziologický roztok s Tween 20
<i>pet</i>	kvasinkový mutant s defektem respiračního řetězce
PIC	směs proteasových inhibitorů pro užití se savčími buňkami a tkáňovými extrakty (viz. VYSVĚTLIVKY)
PVDF	polyvinyliden difluorid
RHM	Rat Heart Mitochondria, krysí srdeční mitochondrie
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní formy kyslíku
rpm	počet otáček za minutu

rRNA	ribozomální ribonukleová kyselina
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
s	sekunda
SB	solubilizační pufr
SBG	vzorkový pufr s barvivem Serva Blue G – Coomassie Brilliant Blue G
Sdh	sukcinátdehydrogenasa
SDS	dodecylsírán sodný
SDS vzorek	vzorek upravený pro analýzu metodou SDS-PAGE
SLB 3x	vzorkový lyzační pufr s 2-merkptoethanolem a barvivem Coomassie Brilliant Blue R250, 3x koncentrovaný
SLB 2x, 1x	vzorkové lyzační pufry naředěné z SLB 3x
SLB _{DTT}	vzorkový lyzační pufr s dithiothreitem a bromfenolovou modří
SLB	vzorkový lyzační pufr bez dithiothreitolu i 2-merkptoethanolu
Surf1 -/-	myš s vyřazeným (knock-outovaným) genem <i>SURF1</i>
T+E	roztok Tris s EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
Tricin	N-tris-(hydroxymethyl)-methylglycin
Tris	tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
V	Volt
°C	stupně Celsia

VYSVĚTLIVKY

PIC – z angl. „Protease Inhibitor Cocktail“, směs proteasových inhibitorů s širším účinkem; roztok obsahuje 4-(2-aminoethyl)-benzensulfonylfluorid (AEBSF), pepstatin A, E-64, bestatin, leupeptin a aprotinin (rozpuštěno v dimethylsulfoxidu)

HMW kalibrační kit pro nativní elektroforézu – 10 µg standardu obsahujícího thyroglobulin (669 kDa), ferritin (440 kDa), katalasu (232 kDa), laktátdehydrogenasu (140 kDa) a hovězí sérový albumin (67 kDa) je rozpuštěno ve 200 µl SB, 15 µl 10% LM a 14 µl SBG

ÚVOD

Metabolickou dráhou zvanou oxidační fosforylace (OXPHOS) vzniká 15krát více molekul ATP oproti glykolýze a na mitochondriální syntéze ATP je energeticky závislá většina mnohobuněčných organismů.

System oxidační fosforylace je lokalizován na vnitřní mitochondriální membráně a skládá se ze čtyř komplexů dýchacího řetězce a mitochondriální F_0F_1 ATP synthasy. Poslední komplex dýchacího řetězce – cytochrom *c* oxidasa (COX) – redukuje molekulu kyslíku na vodu bez vzniku reaktivních forem kyslíku a na jeho funkci závisí celý systém OXPHOS. Podjednotky COX jsou kódovány jadernou i mitochondriální DNA, sestavení funkčního enzymu proto vyžaduje koordinovanou spolupráci jaderného i mitochondriálního genomu, a navíc přítomnost jaderně kódovaných pomocných faktorů.

K nejčastějším příčinám mitochondriálních onemocnění patří právě defekty COX. Mohou být izolované, nebo spojené s poruchou dalších komplexů OXPHOS a vyvolány jsou jak mutacemi v mtDNA, tak poškozením jaderných genů. Zatímco mutace mtDNA postihují vlastní podjednotky enzymu (Cox1, Cox2 a Cox3), doposud odhalené mutace v jaderných genech se týkají pouze pomocných faktorů, jaderně kódovaných podjednotek enzymu nikoli. Cílem této diplomové práce byla charakterizace procesu sestavování enzymu z podjednotek pomocí jednorozměrných a dvourozměrných elektroforetických metod spojených s imunodetekcí specifickými protilátkami u genetických poruch biogeneze enzymu a kontrolních vzorků. Modelem ke studiu asemblace enzymu byly tkáně myši s vyřazeným (knock-outovaným) jaderným genem *SURF1*, který je esenciální pro sestavení enzymu, a kultivované fibroblasty pacienta s mutací 9205delTA v mitochondriálním genomu způsobující závažné mitochondriální onemocnění na podkladě nízké exprese genů *ATP6* a *COX3*.

Obsah COX byl ve všech studovaných vzorcích snížený oproti kontrole. Hromadění intermediátů asemblačního procesu COX bylo u analyzovaných modelů odlišné a výsledky ukazují na tkáňové rozdíly ve stabilitě asemblačních intermediátů.

Klíčová slova

oxidační fosforylace, cytochrom *c* oxidasa, mtDNA, nDNA, *SURF1*, mikrodelece 9205delTA, asemblační intermediáty COX

1 PŘEHLED PROBLEMATIKY

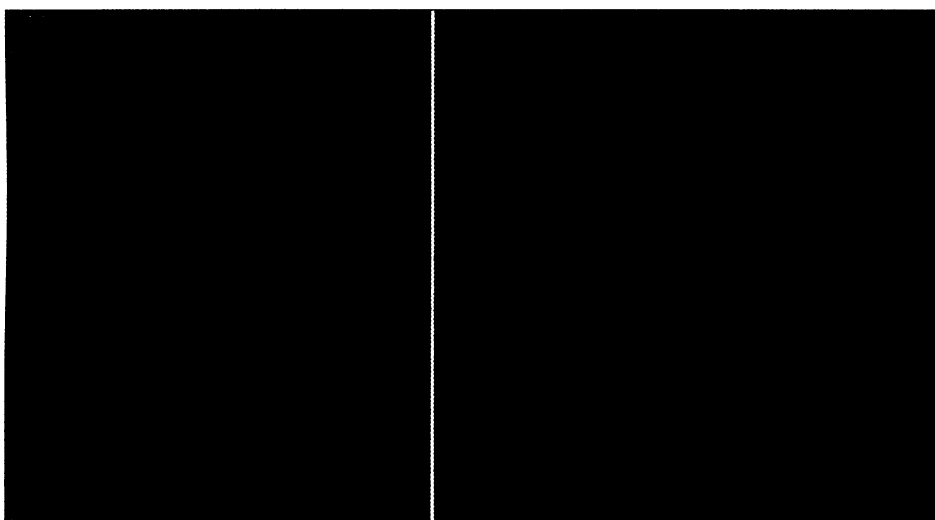
1.1 MITOCHONDRIE

Mitochondrie jsou organely přítomné v cytoplazmě všech eukaryotních buněk. Obsahují svou vlastní DNA a RNA a uskutečňují transkripci a translaci pomocí vlastních ribozomů, které jim umožňují syntetizovat některé z proteinů OXPHOS.

Jsou místem velkého počtu metabolických drah a slouží jako hlavní producenti ATP – univerzálního energetického paliva. Bez nich by byly eukaryotické buňky závislé na relativně neefektivním procesu glykolýzy, který poskytuje pouze 2 molekuly ATP na molekulu glukózy ve srovnání s 30 molekulami ATP získanými oxidací glukózy v mitochondriích.

Obvykle jsou zobrazovány jako protáhlé válce o průměru 0,5 – 1 μm . Zrychlené záběry živých buněk však ukazují mitochondrie jako pozoruhodně pohyblivé organely, které neustále mění tvar i polohu. Svou velikostí i tvarem se podobají bakteriím, obojí mohou měnit v závislosti na typu buňky [1].

Podle endosymbiotické teorie vznikly mitochondrie před více než miliardou let při pohlcení (endocytózou) aerobní bakterie primitivní anaerobní eukaryotickou buňkou. Ustavení symbiotického vztahu vedlo ke ztrátě přebytečných genů, k přenosu genů z bakterie do jádra a k následné distribuci genů mezi dva genomy [2].



Obr. 1: Model mitochondriální struktury. A – Trojrozměrný model z elektronového tomogramu. Vnější membrána je zobrazena průsvitnou tmavě modrou barvou, vnitřní světle modrou barvou a krysty barvou žlutou. B – Trojrozměrný tomografický model se čtyřmi oddělenými krystami zobrazenými různými barvami. Převzato z [3].

Každá mitochondrie má dvě membrány (Obr. 1), vnitřní a vnější, které vytvářejí dva mitochondriální kompartmenty – vnitřní prostor zvaný matrix a úzký mezimembránový prostor. Hladká vnější membrána obsahuje mnoho molekul transportního proteinu porinu, který tvoří transmembránové kanály napříč lipidovou dvouvrstvou, a tím zajišťuje permeabilitu membrány pro molekuly do 5 kDa. Vnější membrána dále obsahuje proteiny tvořící translokasu, která je nezbytná pro import jaderně kódovaných mitochondriálních proteinů.

Vnitřní membrána je poskládána do četných záhybů (krist), které zasahují do prostoru matrix a značně zvětšují povrch membrány. Má odlišné lipidové složení a obsahuje řadu specifických proteinových přenašečů, které umožňují vstup vybraných molekul (především ATP, ADP, pyruvátu, mastných kyselin, iontů atd.) do matrix. Volně dostupná je pouze pro O₂, CO₂ a hydrofóbní neionizované molekuly. Je místem přenosu elektronů a transportu protonů přes membránu. Většina proteinů zanořených ve vnitřní mitochondriální membráně tvoří části elektrontransportního řetězce potřebného k oxidační fosforylaci [3, 4].

Matrix je gelovité povahy, obsahuje 50 % vody, vysokou koncentraci rozpustných enzymů oxidačního metabolismu, substráty, nukleotidové kofaktory, anorganické ionty, mtDNA, RNA a ribozómy [4].

1.2 OXIDAČNÍ FOSFORYLACE A KOMPLEXY DÝCHACÍHO ŘETĚZCE

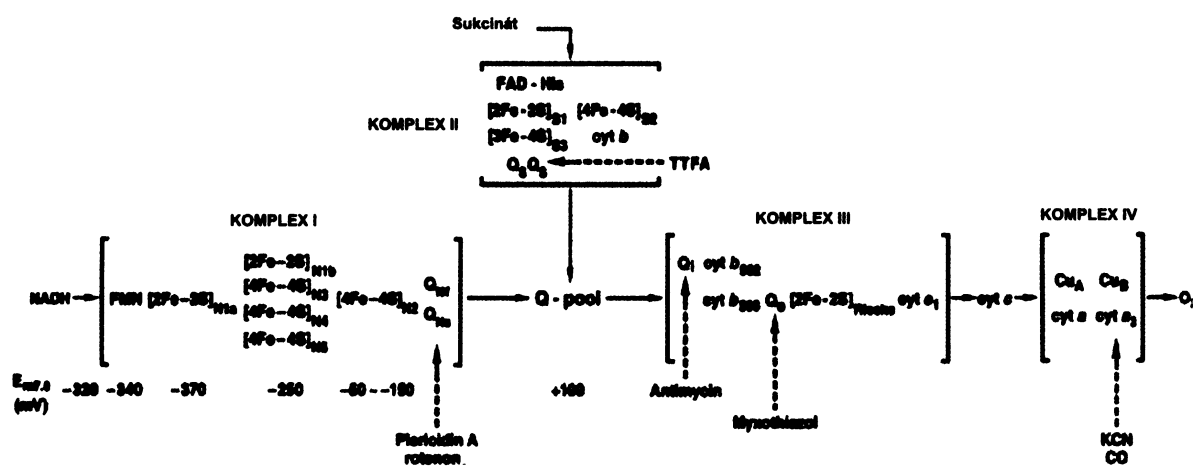
Mitochondriální dehydrogenasy oxidují živiny dehydrogenací. Redukované formy kofaktorů dehydrogenas předávají molekuly vodíku respiračnímu řetězci, kde dochází k disociaci vodíku na protony a elektrony. Ty jsou využity systémem oxidační fosforylace a přenášeny složkami dýchacího řetězce až na kyslík z míst s nižším redoxpotenciálem ve směru stoupajících kladných hodnot (Obr. 2). Tento elektrontransportní řetězec se nachází v mnoha kopiích ve vnitřní mitochondriální membráně a skládá se ze čtyř komplexů dýchacího řetězce, mobilních přenašečů elektronů (koenzym Q a cytochrom *c*), z mGPDH (mitochondriální glycerol-3-fosfátdehydrogenasy) [5] a acyl-koenzym A dehydrogenasy vázající flavoprotein [6]. Reakce komplexů I, III a IV jsou spojeny s přenosem protonů přes vnitřní mitochondriální membránu z matrix do mezimembránového prostoru, čímž vzniká elektrochemický protonový gradient. Ten je postupně využíván posledním komplexem systému OXPHOS, mitochondriální ATP synthasou, k syntéze ATP z ADP a zároveň představuje hnací sílu pro transport fosfátu (P_i-transportérem), iontů, adeninových nukleotidů,

metabolitů i makromolekul specifickými přenašeči do matrix mitochondrie. Protonový gradient může být disipován zkratováním rozpřahujícími (uncoupling) proteiny nebo toxickými protonofory. Celý systém OXPHOS se tedy skládá ze složek dýchacího řetězce a ATP synthasy, dále fosfátového přenašeče (30kDa transportní protein zajišťující transport fosfátu do mitochondrie – P_i-H^+ kontransport) a ATP/ADP přenašeče (30kDa protein zajišťující výměnný transport ATP a ADP). V hnědém tuku se nachází uncoupling protein UCP1 (30kDa rozpřahující protein) umožňující regulovaný transport H^+ iontů a disipaci energie protonového gradientu ve formě tepla (Obr. 3).

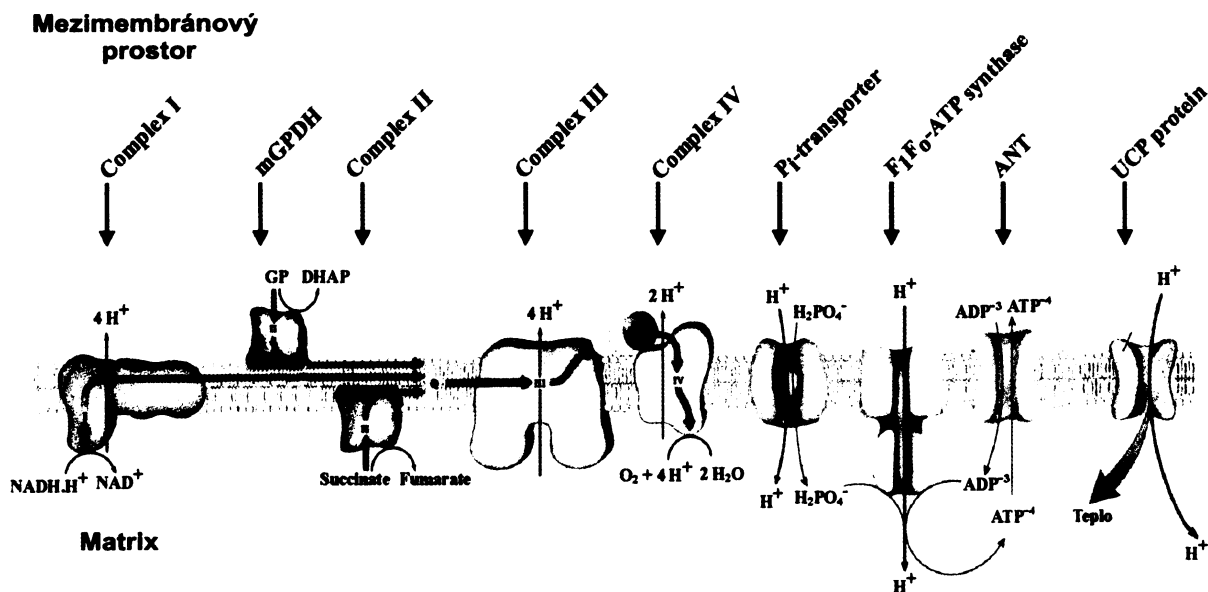
Původně se předpokládalo, že komplexy systému OXPHOS jsou ve fosfolipidové dvouvrstvě mobilní, ale recentní studie ukázaly, že komplexy jsou organizovány do supramolekulárních struktur – tzv. superkomplexů [7, 8].

Superkomplexy (respirazomy) představují regulační jednotky dýchacího řetězce a k jejich významné funkci patří řízení substrátového channelingu (přímý přenos substrátů k cílovému enzymu) – urychlují elektronový transport a zamezují úniku elektronů a vzniku ROS. Intermediáty dýchacího řetězce jsou tedy přímo směřovány ke specifickým enzymům a neuplatňují se zde možné kompetice s jinými enzymy. Předpokládá se, že „volné“ elektronové přenašeče koenzym Q a cytochrom *c* jsou právě řízeny tímto channelingem. Hlavní komponentou spojující komplexy do superkomplexů je fosfolipid kardiolipin [7, 8].

Systém oxidační fosforylace představuje přibližně 87 polypeptidů, které jsou unikátní tím, že jejich část, jako jediná výjimka v eukaryotické buňce, je kódována a syntetizována mitochondriálně. Systém OXPHOS je tak zcela závislý na genetické informaci obsažené v mitochondriální i jaderné DNA.



Obr. 2: Schéma redoxních složek respiračního řetězce. Fe-S klastry komplexu I a II jsou rozpoznány N_x (značené jako $N_1 - N_5$) a S_x (značené jako $S_1 - S_3$). Q_N , Q_S , a (Q_o a Q_i) označují specifická vazebná místa pro koenzym Q v komplexu I, II a III. Specifická inhibiční vazebná místa pro inhibitory jednotlivých komplexů jsou označena šipkami. Převzato z [9].

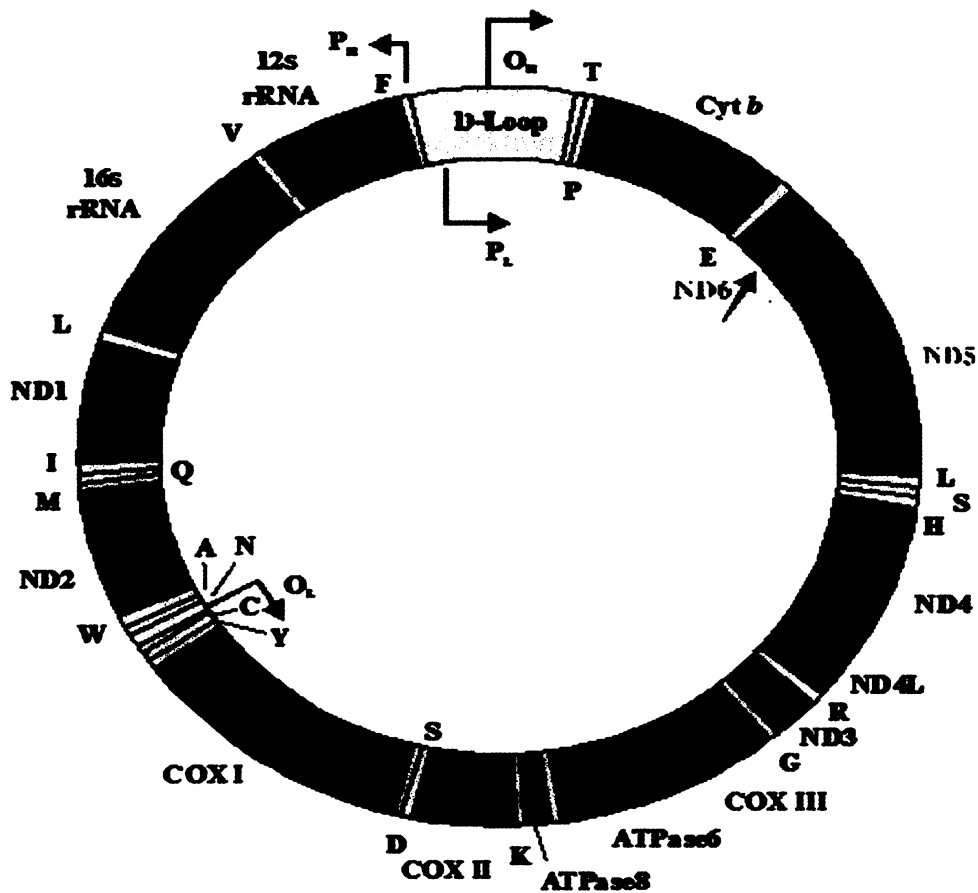


Obr. 3: Systém OXPHOS. Systém oxidační fosforylace zahrnuje enzymy dýchacího řetězce (komplexy I, II, III, IV a mGPDH), které přenášejí elektrony z NADH nebo FADH_2 na kyslík a současně tak vytváří protonový gradient přes vnitřní mitochondriální membránu. Ten je postupně využíván F_0F_1 ATP syntasou k fosforylaci ADP, transportu anorganického fosfátu (P_i -transportér), řady metabolitů, adeninových nukleotidů, iontů a makromolekul do mitochondrie, nebo může být disipován uncoupling proteinem (UCP protein). ANT – aniontový transport. GP – glycerol-3-fosfát. DHAP – dihydroxyacetonfosfát. Převzato z [10].

1.3 MITOCHONDRIÁLNÍ BIOGENEZE A GENETIKA

Biogeneze mitochondrií jako jediných organel savčích buněk závisí na koordinované expresi dvou genomů, jaderného a mitochondriálního. Lidský mitochondriální genom je kruhová molekula DNA dlouhá 16 569 párů bazí tvořená dvěma komplementárními řetězci – lehkým (L) a těžkým (H) (Obr. 4) [11]. mtDNA má prokaryotický charakter a dědí se maternálně. Je to vysoce kompaktní molekula menší než většina jaderných genů, neobsahuje introny a kromě dvou regulačních míst má pouze 37 genů: 2 geny kódují rRNA, 22 genů kóduje tRNA a 13 genů kóduje polypeptidy oxidační fosforylace. mtDNA kóduje 7 podjednotek komplexu I (ND1 – 6 a ND4L), apocytochrom *b* komplexu III, 3 podjednotky komplexu IV (Cox1 – 3) a 2 podjednotky komplexu V (Atp6 a Atp8). Savčí mtDNA je přítomna ve všech buňkách v počtu přibližně $10^3 - 10^4$ kopií [11, 12]. Replikace mtDNA je časově nezávislá na replikaci nDNA [13]. mtDNA je přepisována do primárních polycistronních transkriptů, které jsou po transkripci specificky štěpeny na jednotlivé RNA a polyadenylovány. K translaci dochází na mitochondriálních ribozomech.

Naprostá většina proteinů lokalizovaných v mitochondrii (> 98 %, což činí 10 – 20 % intracelulárních proteinů) je produktem jaderného genomu. Podjednotky kódované nDNA jsou translatovány na volných ribozomech v cytoplazmatické části eukaryotních buněk často jako prekurzory proteinů. Aby mohlo k importu z cytozolu do mitochondrie dojít musí proteinový prekurzor obsahovat cílovou sekvenci (ta se vyskytuje na N-terminálním konci proteinu, obsahuje 20 až 60 aminokyselinových zbytků bohatých na bazické a hydroxylované postranní řetězce), díky které je rozpoznán receptory na povrchu vnější membrány a faktory v cytozolu, které mohou proteiny do mitochondrie nasměrovat. Dále může být importován pouze nesbalený protein. Pomocí specifických proteinů – chaperonů – jsou translatované proteiny udrženy v konformaci vhodné pro transport do mitochondrií přes jednu či obě mitochondriální membrány, aby dosáhly místa svého konečného působení. K translokaci prekurzorů do mitochondrie dochází pouze v místě kde jsou vnitřní a vnější mitochondriální membrány velmi blízko u sebe (kontaktní místa) – pomocí TIM a TOM komplexů (translokasy vnitřní a vnější mitochondriální membrány). Proteiny směřující do vnitřní mitochondriální membrány obsahují odštěpované N-terminální sekvence nebo vnitřní (kryptické) cílové signály. Signální sekvence jsou rozpoznány TOM komplexem a následně je transport směřován k TIM komplexům – k TIM23 pokud prekurzory směřují do matrix nebo k TIM22 pokud směřují přímo do vnitřní membrány. Po transportu do matrix je signální sekvence odštěpena peptidasou a proteiny putují do příslušných částí mitochondrie [4].



Obr. 4: Lidská mapa mitochondriální DNA. Schéma ukazuje geny pro 12S a 16S rRNA, pro podjednotky komplexu I (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 a ND6), komplexu III (cyt *b*), komplexu IV (Cox1, Cox2 a Cox3), komplexu V (Atp6 a Atp8) a 22 genů kódujících tRNA. D-loop (displacement-loop) je 1 100 bází dlouhá regulační oblast obsahující promotory pro transkripci lehkého (P_L) a těžkého (P_H) řetězce a počátek replikace těžkého řetězce (O_H). Druhou oblastí s regulační funkcí je 30 nukleotidů dlouhý úsek obsahující počáteční sekvenci pro replikaci lehkého řetězce (O_L). Převzato z [14].

1.4 STRUKTURA A FUNKCE MITOCHONDRIÁLNÍCH KOMPLEXŮ OXPHOS

1.4.1 Komplex I – NADH:koenzym Q oxidoreduktasa

Komplex I je z komplexů dýchacího řetězce největší, nejkomplikovanější a nejméně probádaný. Jeho velikost se liší podle organismu, savčí komplex I je veliký 900 kDa. Je složen z nejméně 43 podjednotek, z toho 7 je kódováno mitochondriálně a zbytek jaderně [15].

Komplex I obsahuje elektronové transportéry, flavinmononukleotid (FMN), redoxně aktivní Fe-S klastry a také vázaný koenzym Q. Elektronový přenos probíhající v komplexu I není zcela jasný. Předpokládá se, že dva elektrony z NADH jsou nejprve přeneseny na FMN, dále z FMN na Fe-S klastry a nakonec na koenzym Q. Komplex I přeneše 4 až 5 protonů přes membránu na jeden elektronový pár předaný koenzymu Q [16].

1.4.2 Komplex II – sukcinát:koenzym Q oxidoreduktasa

Celý komplex II (také sukcinátdehydrogenasa, Sdh) je veliký 120 kDa a obsahuje čtyři jaderně kódované podjednotky – dvě malé hydrofóbní podjednotky (14kDa Sdh3, 10 kDa Sdh4) a dvě hydrofilní (70kDa Sdh1, 30kDa Sdh2) se sukcinátdehydrogenasovou aktivitou. Tento enzym přímo spojuje citrátový cyklus s cyklem oxidační fosforylace, katalyzuje oxidaci sukcinátu na fumarát a přenáší elektrony z této reakce na koenzym Q.

Největší podjednotka Sdh1 (flavoprotein) obsahuje vázaný koenzym FAD sukcinátdehydrogenasy, tři Fe-S klastry jsou lokalizovány v Fe-S proteinu Sdh2. Malé podjednotky Sdh3 a Sdh4 tvoří membránovou kotvu enzymu, obsahují vazebné místo pro koenzym Q a cytochrom b_{560} . Přesná funkce tohoto cytochromu není zcela jasná [17].

1.4.3 Komplex III – koenzym Q:cytochrom *c* oxidoreduktasa

Komplex III (také cytochrom bc_1) přenáší elektrony z redukovaného koenzymu Q na cytochrom *c*. Skládá se z 11 podjednotek a *in vivo* tvoří dimer o molekulární hmotnosti 480 kDa [18]. Savčí komplex obsahuje pouze jednu mitochondriálně kódovanou podjednotku – cytochrom *b*. Redoxní skupinu komplexu III tvoří Fe-S klastr, dva hemy cytochromu *b* (hem b_{562} s vysokým redoxním potenciálem a hem b_{566} s nízkým redoxním potenciálem) a hem cytochromu c_1 . Pouze tři podjednotky obsahující redoxní centra hrají roli v redukcii cytochromu. Dvě malé podjednotky Core 1 a Core 2 nemají redukční katalytickou aktivitu, ale peptidasovou [19].

Z celku pěti komplexů tvořících systém OXPHOS jsou komplexy IV a V popsány detailně vzhledem k jejich klíčovému významu v oxidačním metabolismu a vlastní tvorbě ATP a zaměření práce na jejich tvorbu v savčích mitochondriích.

1.4.4 Komplex IV – cytochrom *c* oxidasa

Cytochrom *c* oxidasa (COX; EC 1.9.3.1.) je posledním enzymem dýchacího řetězce lokalizovaným ve vnitřní mitochondriální membráně. Tento enzymový komplex katalyzuje konečnou oxidaci cytochromu *c* molekulárním kyslíkem a hraje klíčovou roli v regulaci aerobní produkce ATP [20]. Energie uvolněná při této reakci je použita k přenosu protonů přes vnitřní mitochondriální membránu. Aktivní místo komplexu IV tvoří hem a_3 s vysokým redoxním potenciálem a blízce asociovaný měďnatý iont (Cu_B) [21]. V membráně se COX může vyskytovat jako monomer nebo dimer a katalyzuje jedoelektronovou oxidaci čtyř po sobě následujících molekul cytochromu *c* s původní čtyřelektronovou redukcí jedné molekuly kyslíku. Tato exergonická reakce je spřažena s tvorbou elektrochemického potenciálu na vnitřní mitochondriální membráně, tvořeného gradientem pH a membránovým potenciálem protonů. Elektrochemický potenciál je vytvářen jak spotřebou protonů při redukcí molekuly kyslíku na vodu, tak i aktivním čerpáním protonů přes membránu [4].

1.4.4.1 Struktura COX

Savčí COX je složena ze 13 podjednotek (Obr. 5). Tři největší podjednotky (Cox1, 2 a 3) jsou kódovány mitochondriální DNA. Jsou homologní podjednotkám prokaryotické COX a formují katalytické jádro enzymu. Zbývajících 10 podjednotek (Cox4, 5a, 5b, 6a, 6b, 6c, 7a, 7b, 7c a 8) bylo zabudováno do struktury COX během eukaryotické evoluce a je kódováno jaderným genomem. Tyto podjednotky se přímo neúčastní elektronového transportu či přenosu protonů, většina studií na kvasinkových a savčích modelech uvádí, že jsou zapojeny do asemblačního procesu COX, regulace aktivity enzymu a fungují jako ochranný štít obklopující jádro enzymu [22, 23].

Strukturu COX pomohla objasnit rentgenová krystalografická analýza. Transmembránová část enzymu je tvořena 28 α -helixy. Podjednotka Cox1 obsahuje 12 pevně sbalených transmembránových helixů, N- i C-terminální konce podjednotky jsou lokalizovány na matrixové straně membrány. Dále je tvořena dvěma redoxními centry hemem *a* a hemem a_3 s Cu_B . Z hemu *a* jsou elektrony intramolekulárně přeneseny do binukleárního centra hem a_3 + Cu_B , kde je vázaný kyslík redukován na vodu [24].

Podjednotky Cox2 a Cox3 interagují s transmembránovou doménou podjednotky Cox1. Cox2 obsahuje dva transmembránové helixy pevně asociované s transmembránovou doménou

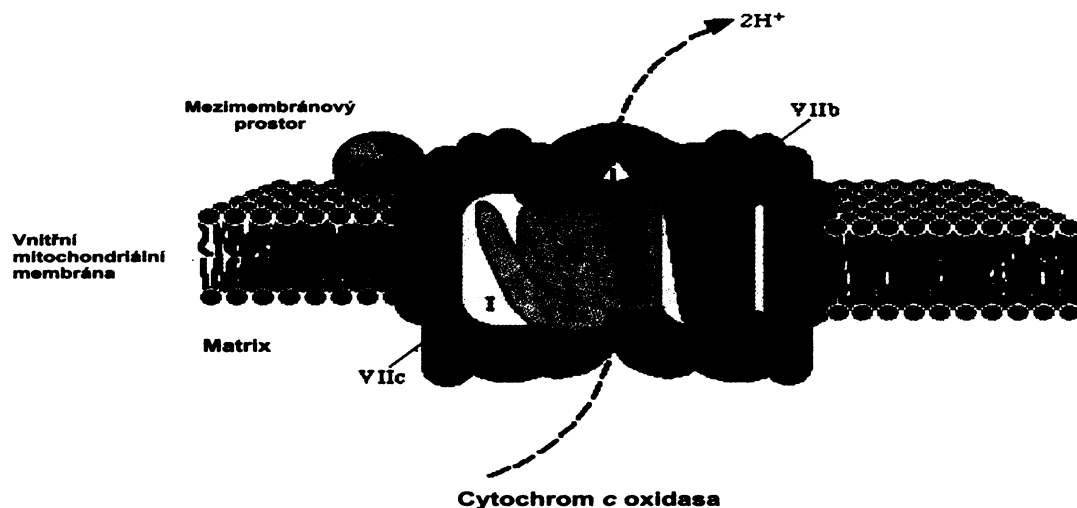
Cox1 a větší polární doménou na cytozolické straně membrány. Polární doména se skládá z 10-vláknové struktury β -soudku a váže Cu_A redoxní centrum tvořené dvěma měďnatými ionty. N- i C-terminální konce podjednotky Cox2 jsou na vnější straně membrány. Podjednotka Cox3 obsahuje sedm transmembránových helixů organizovaných do svazků (I, II a III, IV) tvořících štěrbinu ve tvaru písmene V. Helixy I a III tvoří spojení s podjednotkou Cox1. N-terminální konec podjednotky Cox2 je na vnitřní straně membrány. Transmembránové helixy podjednotky Cox3 jsou začleněny do katalytického centra enzymu.

Podjednotka Cox3 neobsahuje prostetické skupiny a její funkce není úplně jasná. Pravděpodobně je zapojena do assemblace a udržení stability podjednotky Cox1 a 2, nebo napomáhá přístupu kyslíku do binukleárního centra v enzymu [25]. Studie provedené na bakteriální cytochrom *c* oxidase tvořené pouze podjednotkami Cox1, 2 a 3 uvádějí, že Cox3 hraje roli v modulaci protonového přenosu přes podjednotky Cox1 a Cox2 [26].

Jaderně kódované podjednotky Cox4, 6a, 6c, 7a, 7b, 7c a 8 umístěné uvnitř membrány se na struktuře transmembránové části enzymu podílí jedním helixem. Extramembránová část na cytozolické straně membrány je dotvářena podjednotkou Cox7b, na straně matrix podjednotkami Cox5a a 5b (Obr. 5).

Na struktuře COX se také podílí fosfolipidy vázané prostřednictvím solných můstků a vodíkových vazeb. Jedním z těchto fosfolipidů je kardiolipin, jehož přítomnost je pro funkci cytochrom *c* oxidasy nezbytná. Spojuje dva monomery v dimer, což je aktivní forma enzymu. Udržuje fluiditu a osmotickou stabilitu vnitřní mitochondriální membrány a je potřebný pro správné strukturní uspořádání ostatních respiračních komplexů. Pro katalytickou funkci enzymu jsou také nezbytné ionty zinku, hořčíku a sodíku [23, 27, 28].

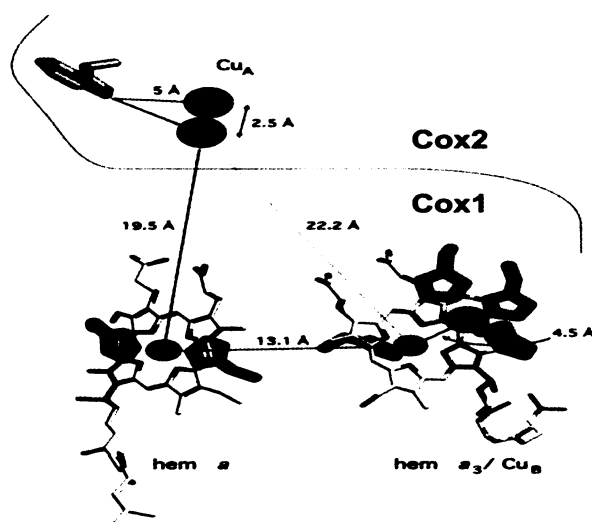
Krystalografickou studií dimeru enzymu hovězího srdce bylo zjištěno, že vazebné místo pro cytochrom *c* je umístěno ve štěrbině na povrchu mezi dvěma monomery COX [29]. Cytochrom *c* se s vysokou afinitou váže na extramembránovou doménu podjednotky Cox2. Vazba je zprostředkována elektrostatickými interakcemi mezi pozitivně nabitými lysinovými zbytky cytochromu a negativně nabitými aspartátovými a glutamátovými zbytky vazebného místa na doméně. Druhé vazebné místo s menší vazebnou afinitou váže druhou molekulu cytochromu *c* [30].



Obr. 5: Topologie podjednotek COX. Umístění podjednotek cytochrom *c* oxidasy v dimeru enzymu hovězího srdce. Převzato z [14].

1.4.4.2 Katalytický cyklus COX

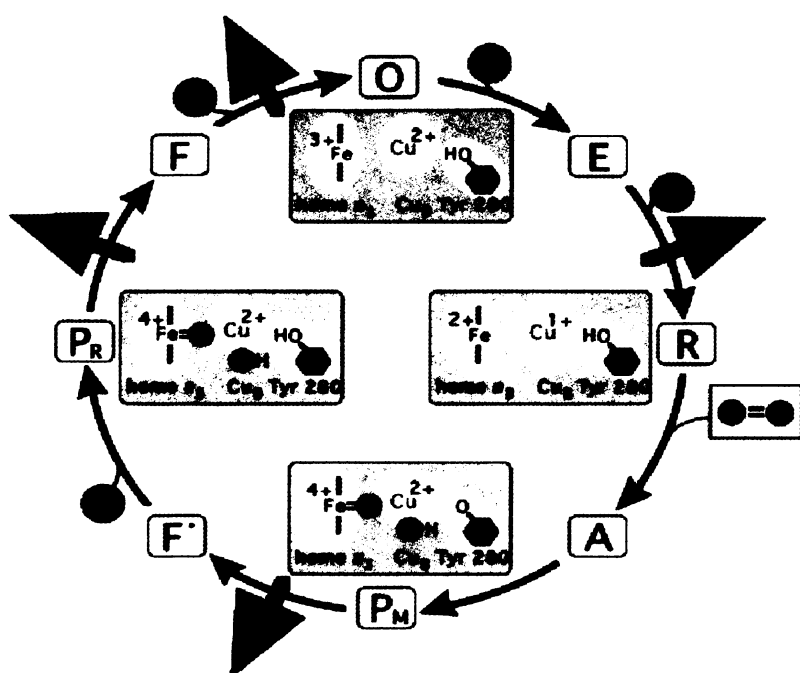
Elektrony získané z cytochromu *c* jsou přes čtyři vnitřní redoxní centra přeneseny na kyslík a redukují ho tak na vodu. Cu_A centrum tvořené dvěma ionty mědi ($\text{Cu}^I/\text{Cu}^{II}$) je umístěno v hydrofilní doméně na cytozolické straně podjednotky Cox2. Elektron je následně přenesen z Cu_A centra na hem *a* v podjednotce Cox1. Tento nízkospinový hem je blíže k Cu_A centru než hem a_3 , a proto hem *a* přednostně přijímá elektron (Obr. 6).



Obr. 6: Přenos elektronů přes čtyři redoxní centra cytochrom *c* oxidasy. Popis obrázku v textu. Převzato z [31].

Oba hemy jsou orientovány kolmo na membránu a svírají mezi sebou úhel 108° . Jejich kovová centra jsou od sebe vzdálena 13 \AA , ale jejich kraje jsou vzdálené pouze 5 \AA a dva z jejich histidinových ligandů (H411 a H413) jsou odděleny jednou aminokyselinou ve stejném transmembránovém helixu. Vysokospinový hem a_3 a elektronicky spřažený Cu_B ion tvoří binukleární centrum enzymu. Toto centrum, zanořené přibližně z jedné třetiny do membrány, je místem vazby kyslíku a tvorby vody, což vyžaduje volný přístup jeho substrátů (kyslíku a protonů).

V oxidovaném stavu („O“ viz Obr. 7) nesou kovové ionty binukleárního centra $+3$ (hemové železo) a $+2$ náboj (Cu). Vstupem prvních dvou elektronů do binukleárního místa jsou redukována obě kovová centra ($+2/+1$) ve dvou krocích („E“ na „R“). Kyslík je schopen se vázat s dvěma redoxními ekvivalenty dostupnými na binukleárním centru („R“), což vede ke vzniku formy „A“. Během krátkého časového úseku se z této sloučeniny tvoří forma „P_M“, ve které je dvojná vazba kyslíku již rozrušena a oba atomy kyslíku jsou v ní přítomny v oxidačním stavu vody. Dva další elektrony jsou poskytnuty dočasně z tohoto místa: hemové železo je oxidováno na ferrylformu ($+4$) a blízko vázaný tyrosin je schopný poskytnout čtvrtý elektron, což vede k tvorbě tyrosinového radikálu. Unikátní strukturní uspořádání v binukleárním místě včetně atypicky spojených postranních řetězců umožňuje enzymu – jakmile je kyslík navázán – okamžitě rozdělit O-O vazbu, i když je přísun dalších elektronů zastaven. Tímto se vyhýbá tvorbě reaktivních kyslíkových sloučenin (ROS) jako jsou superoxidový anion a peroxid vodíku. V druhé polovině cyklu je vyřešen neobvyklý stav binukleárního centra redukcí tyrosinového radikálu přenosem třetího elektronu a čtvrtý elektron je nutný k obnovení oxidovaného stavu železa v centru hemu a_3 ($+3$) [31].

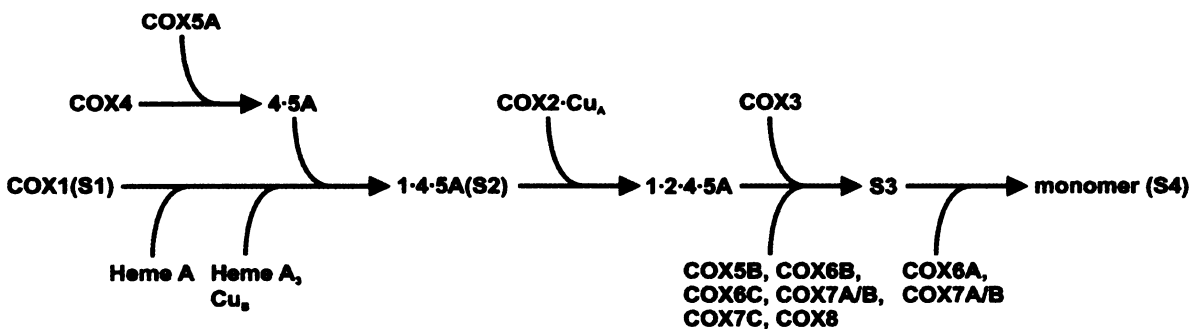


Obr. 7: Cyklus redukce kyslíku. Klíčové intermediáty (O, E, R, A, P_M atd.) jsou zapsány ve směru hodinových ručiček spolu se vstupy elektronů (šedá barva), vazbou molekulárního kyslíku (modrá barva) a s přenosy protonů (červená barva). Popis obrázku v textu. Převzato z [31].

1.4.4.4 Biogeneze holoenzymu COX

Sestavování funkčního enzymu cytochrom *c* oxidasy z jednotlivých podjednotek vyžaduje koordinovanou spolupráci jaderného a mitochondriálního genomu. Navíc kromě tří strukturálních podjednotek kódovaných mtDNA a deseti kódovaných nDNA je zapotřebí množství pomocných faktorů. Jaderně kódované podjednotky jsou syntetizovány v cytoplazmě a importovány do mitochondrií. Obklopují katalytické jádro enzymu, ale pro jeho katalytickou funkci nutné nejsou. Jejich specifické funkce jsou zřejmě spojené s regulací aktivity COX různými ligandy, včetně modulace poměru H^+/e^- u různých, tkáňově specifických forem COX [31]. Některé z jaderně kódovaných podjednotek jsou zapojené do sestavování, stability a dimerizace enzymu.

Dodnes je assemblační proces savčí cytochrom *c* oxidasy rozluštěn jen částečně, ale jisté je, že probíhá postupně a je spojen se vznikem tzv. assemblačních intermediátů (Obr. 9). Tento proces není spontánní a vyžaduje řadu pomocných faktorů, které hrají roli na všech úrovních assemblačního procesu, jako je exprese mitochondriálně kódovaných podjednotek, exprese a import jaderně kódovaných podjednotek do mitochondrie, inserce strukturálních podjednotek do vnitřní mitochondriální membrány, adice prostetických skupin, sestavení holoenzymu, maturace a formování dimeru a superkomplexů [20], kvalitativní kontrola a proteolytická degradace špatně sbalených proteinů.



Obr. 9: Schéma assemblace COX. S1, S2, S3 a S4 – assemblační intermediáty. Převzato z [12].

Podstatným zdrojem poznání biogeneze COX je kvasinkový model. Screening kvasinkových mutantů s defektem respiračního řetězce (*pet*) odhalil skupinu přibližně 30 genů, které selektivně ovlivňují expresi COX [35]. Absence těchto pomocných faktorů narušuje vznik enzymu, ale ve vlastním enzymu přítomny nejsou. Obecně jsou popisovány jako assemblační (sestavovací) faktory. Jejich molekulární funkce je v řadě případů neznámá. Přesné pořadí působení těchto faktorů a individuální funkce zůstává nejasná v důsledku řady technických problémů při jejich studiu: 1) umístění genů tří podjednotek tvořících katalytické jádro enzymu na mitochondriálním genomu brání manipulaci při standardních metodách

molekulární biologie; 2) Cox1 a Cox3 jsou vysoce hydrofóbní proteiny, jsou náchylné k agregaci po uvolnění z membrány pomocí detergentů a podléhají arteficiálním postlyzačním interakcím; 3) asemblační intermediáty COX jsou proteolyticky nestabilní, z toho důvodu komplexy izolované z asemblačních *pet* mutantů nemusí nutně představovat kumulující stavy v biogenezi enzymu, ale spíše částečně stabilní produkty degradace; 4) doposud nebyly vyvinuty metody, při kterých by bylo možné asemblaci komplexu indukovat a pozorovat *in vitro* nebo v izolovaných mitochondriích; 5) inserce kofaktorů vyžaduje mnoho různých genových produktů a experimentálních postupů ke sledování metabolismu a zabudování měďnatých iontů a hemových skupin, a ty do velké míry chybí; 6) ne všechny kvasinkové faktory jsou přítomné a funkční u vyšších eukaryotů, jejichž organizace mtDNA genů a jejich transkripce je od kvasinek odlišná [36].

Doposud byly nejlépe popsány funkce u faktorů *OXA1*, *COX10*, *11*, *15*, *17*, *SCO1* a *SCO2* jak u kvasinek, tak v savčích buňkách. Protein kódovaný genem *OXA1* napomáhá inserci podjednotek Cox1, 2 a 3 do membrány; proteiny kódované *COX10* a *15* jsou nutné pro biogenezi hemu *a*; *COX11* a *17* kódují proteiny hrající roli při inserci Cu do Cox1; proteiny kódované *SCO1*, *SCO2* a *COX 17* hrají roli při inserci Cu do Cox2. V kvasinkových mitochondriích (*Saccharomyces cerevisiae*) byla popsána funkce proteinů Mss51 a Cox14, které hrají důležitou roli při syntéze podjednotky Cox1 a v kontrolním mechanismu asemblace enzymu (Tab. 1) [20, 36].

Tab. 1: Jaderně kódované asemblační faktory COX. Převzato z [36].

<i>S. cerevisiae</i>	<i>H. sapiens</i>		
název	název ^a	funkce	lokalizace ^b
Cox10	Cox10	biosyntéza hemu <i>a</i>	VM (integrální)
Cox11	Cox11	donor mědi pro Cox1	VM (integrální)
Cox14	?	váže nově syntetizovanou Cox1	VM (integrální)
Cox15	Cox15-1 Cox15-2	biosyntéza hemu <i>a</i>	VM (integrální)
Cox16	<i>COX16</i>	přesná role neznámá	VM (integrální)
Cox17	Cox17	donor mědi pro Cox1 a Cox2	MMS, cytozol
Cox18	Cox18/Oxa2	přesná role neznámá	VM (integrální)
Cox19	<i>COX19</i>	přesná role neznámá	MMS, cytozol
Cox20	<i>COX20</i>	specifický chaperon pro Cox2	VM (integrální)
Cox23	<i>COX23</i>	přesná role neznámá	MMS, cytozol
Mba1	?	membránová inserce	VM (asociovaný)
Mss51	?	1. translační faktor pro Cox1 2. váže nově syntetizovanou Cox1	VM (asociovaný)
Pet100	?	přesná role neznámá	VM (integrální)
Pet117	<i>PET117</i>	přesná role neznámá	VM (integrální)
Pet191	<i>PET191</i>	přesná role neznámá	?
Oxa1	Oxa1	membránová inserce	VM (integrální)
Sco1	Sco1	donor mědi pro Cox2	VM (integrální)
Sco2	Sco2	donor mědi pro Cox2	VM (integrální)
Shy1	Surf1	přesná role neznámá	VM (integrální)

^a italikou – nepotvrzené lidské homology, které nebyly dříve publikovány; ? – homology nebyly nalezeny
^b VM – vnitřní membrána; MMS – mezimembránový prostor

Cox1, Cox2 a Cox3 jsou kódovány mitochondriálními geny a syntetizovány na mitochondriálních ribozomech. V mitochondriích kvasinek má pravděpodobně každý mitochondriální gen svou skupinu regulačních faktorů. Translační faktory jsou spojeny s matrixovou částí vnitřní mitochondriální membrány a interagují mezi sebou tak, aby usměrnily syntézu tří podjednotek – vymezují transkripci a syntézu proteinu do určitých částí mitochondrie a tím definují vyhrazená asemblační místa ve vnitřní mitochondriální membráně [37]. Inzerce podjednotek Cox1, Cox2 a Cox3 do membrány je řízena proteinem Oxa1, který tvoří homooligomerní komplex ve vnitřní mitochondriální membráně [38]. Bez přítomnosti Oxa1 je inzerce podjednotek nepřesná a dochází k jejich kumulaci v matrix a degradaci [39]. C-terminální doména proteinu Oxa1 se váže na mitochondriální ribozomy a tak spojuje mitochondriální membránu s translačním aparátem. Podjednotky interagují s Oxa1 ještě před dokončením své syntézy a kotranslačně jsou zabudovány do membrány [40].

Podjednotka Cox1 je vysoce hydrofóbní protein. Obsahuje 12 transmembránových domén spojených krátkou hydrofilní smyčkou. Hluboko do transmembránových domén jsou zanořeny dva hemové kofaktory a orientovány jsou kolmo k membráně v těsné blízkosti dvou Cu iontů v místě Cu_B [29]. Jakým způsobem jsou tyto kofaktory inkorporovány do apoformy Cox1 není dosud jasné. Inkorporace pravděpodobně nastává kotranslačně, tedy současně s inzercí Cox1 polypeptidu do vnitřní mitochondriální membrány. Za správnou inkorporaci hemových a měďnatých kofaktorů do Cox1 zodpovídá řada jaderných genových produktů. Cox1 se od jiných buněčných cytochromů liší tím, že obsahuje kofaktor hem *a*. Obvykle využívaný hem *b* je přeměněn na hem *a* v reakci, kterou katalyzuje Cox15 a farnesyltransferasa Cox10 [41]. Intracelulární transport Cu^{2+} iontů je zprostředkován skupinou malých rozpustných proteinů – tzv. měďnatých chaperonů. Jedněmi z nich jsou proteiny Cox17 a Cox11 [42]. Přenos mědi z Cox17 na Cox1 je usnadněn proteinem Cox11, který je spojený s vnitřní mitochondriální membránou přes svou N-terminální membránovou kotvu a „odkrývá“ měď-vázající doménu Cox1 do mezimembránového prostoru. Jakým způsobem spolu Cox11 a Cox17 interagují a jak dochází k přenosu mědi není přesně známo [43].

V kvasinkách je nově syntetizovaná Cox1 posttranslačně vázána matrixovým proteinem Mss51 (a Cox14) asociovaným s vnitřní mitochondriální membránou. Proteinový komplex Mss51-Cox14 je pravděpodobně zodpovědný za sestřih a translaci *COX1* mRNA [44, 45]. Mss51 má tedy dvě odlišné úlohy: reguluje syntézu Cox1 a váže nově syntetizovaný protein Cox1 (funguje jako chaperon) a brání jeho agregaci. Přesná funkce Cox14 není známá, pravděpodobně se podílí na koordinaci odlišných funkcí Mss51. V savčích buňkách k posttranslačním úpravám Cox1 proteinu nedochází a homology proteinů Mss51 a Cox14 nebyly nalezeny [46].

Podjednotka Cox2 je hydrofilnější než podjednotky Cox1 a Cox3. Zahrnuje dvě transmembránové domény a do mezimembránového prostoru vyčnívají malé N- a C-terminální domény. Obě vyčnívající domény jsou kyselé a exportované pomocí translokasy Oxa1 v reakci vyžadující membránový potenciál [47]. Membránový potenciál vytváří elektroforetický efekt, který řídí přenos negativně nabitých proteinových sekvencí do míst vnitřní membrány s pozitivním nábojem. V mitochondriích kvasinek je pro maturaci podjednotky Cox2 nutná interakce s proteinem Cox20, který funguje jako chaperon pro nově syntetizovanou Cox2 [48]. C-terminální doména Cox2 vyčnívající do mezimembránového prostoru řídí přenos dvou iontů mědi mezi Cu_A místem a cytochrom *c* oxidasou. Měďnaté ionty jsou získány z proteinu Cox17 a inkorporovány do Cu_A místa podjednotky Cox2 pomocí dvou jiných proteinů – Sco1 a Sco2. U savců jsou mutace v genech pro Sco1 a Sco2 protein letální [49]. Rostlinné, houbové a zvířecí mitochondrie obsahují homologní proteiny proteinu Oxa1 označované jako Cox18 a Oxa2. Od Oxa1 se liší absencí ribozom-vázajících domén [50]. Oxa1 kvasinkový mutanti vykazují defekt v biogenezi všech komplexů dýchacího řetězce, které obsahují mitochondriálně kódované podjednotky [51], kdežto Cox18/Oxa2 mutanti jsou charakterističtí specifickými defekty cytochrom *c* oxidasy [52]. Proteiny Cox18/Oxa2 jsou zapojené do translokačního procesu, ve kterém je velký C-terminální konec podjednotky Cox2 přenášen přes vnitřní mitochondriální membránu. Dále bylo prokázáno, že interagují s podjednotkami Cox2 a Cox3 a podílí se na sestavení celé cytochrom *c* oxidasy [50].

Savčí protein Surf1 je zanořený do vnitřní mitochondriální membrány dvěma transmembránovými segmenty. Přesná úloha v asemblačním procesu COX není známá. Pacienti nesoucí mutaci v genu kódujícím Surf1 vykazují nízké hodnoty asemblované cytochrom *c* oxidasy, ale určitou hladinu funkčního proteinu obsahují, stejně tak kvasinkový mutanti postrádající protein Shy1 (kvasinkový homolog Surf1). Doménová struktura tohoto proteinu je konzervovaná u eukaryotů i prokaryotů, což nasvědčuje jeho nezbytnost pro funkci respiračního řetězce [53].

Jakým způsobem se jednotlivé savčí podjednotky skládají do funkčního enzymu stále není jasné. Elektroforetickou analýzou lidského enzymu byly v devadesátých letech objeveny čtyři individuální asemblační stupně (intermediáty, Obr. 9), které pravděpodobně představují rychlost-limitující kroky procesu sestavování [54]. Prvním krokem asemblačního procesu je biogeneze podjednotky Cox1, její apofорма odpovídá prvnímu asemblačnímu intermediátu S1. Cox1 asociuje s jaderně kódovanými podjednotkami Cox4 a Cox5a a tvoří tak další intermediát S2. Třetí asemblační intermediát (S3) vzniká adicí Cox2, Cox3 a několika jaderně kódovaných podjednotek na S2, kromě Cox6a, 7a a 7b. To je vysvětlováno tím, že tyto

podjednotky jsou periferní polypeptidy a asociovány jsou až v pozdějších krocích assemblace a tvoří tak čtvrtý, poslední intermediát (S4), který představuje holoenzym cytochrom *c* oxidasy [54, 55].

Všechny faktory způsobující dimerizaci enzymu, nebo jeho asociaci s dalšími komplexy dýchacího řetězce při tvorbě superkomplexů, nejsou zatím známe [8, 56].

1.4.5 Komplex V – F₀F₁ ATP synthasa

Mitochondriální ATP synthasa (F₀F₁ ATP synthasa, ATPasa, EC 3.6.3.14) je veliký multipodjednotkový enzymový komplex vnitřní mitochondriální membrány využívající membránový potenciál protonů tvořený komplexy dýchacího řetězce k syntéze ATP. Skládá se z katalytické F₁ části spojené dvěma stonky s F₀ částí zanořenou do membrány.

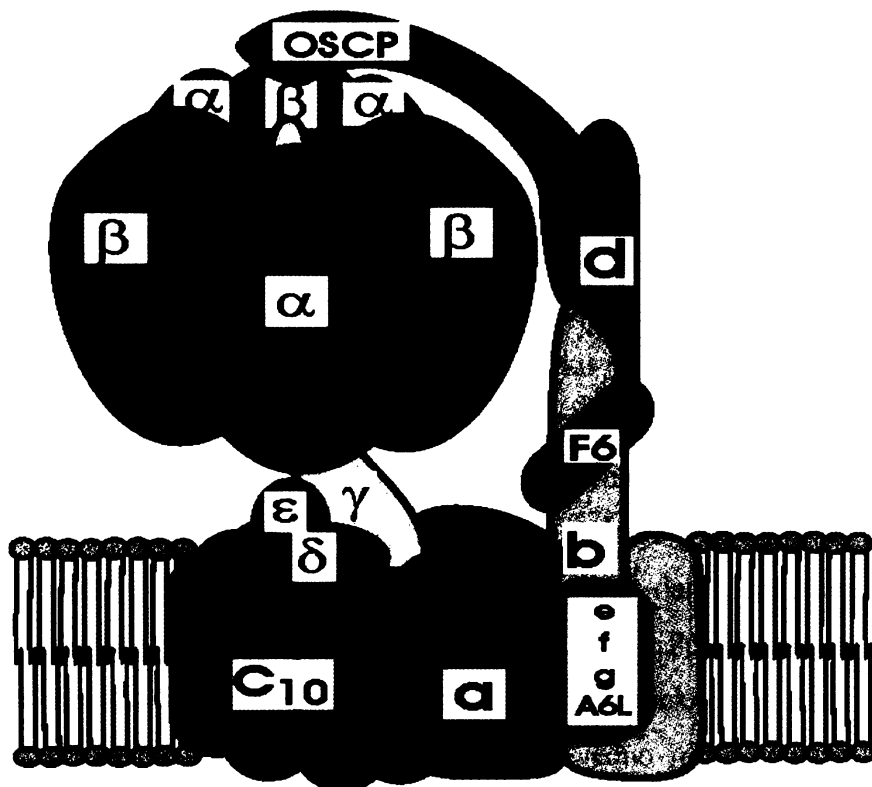
1.4.5.1 Struktura ATP synthasy

Mitochondriální savčí komplex je složený z 16 různých podjednotek o celkovém složení – F₁: $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon + IF_1$; F₀: Atp6-b-c₁₀-d-e-f-g + F₆ + A6L + OSCP [57, 58] (Obr. 10); veliký je přibližně 600 kDa [59]. Pět podjednotek tvoří katalytickou část F₁ [60] – místo syntézy a hydrolýzy ATP, zatímco zbylých 10 podjednotek tvoří F₀ část s proton-transportní funkcí. Extramembránový subkomplex F₁ je k membránovému subkomplexu F₀ vázán přes centrální a periferní stonek [61]. Přes periferní stonek jsou na sebe vázány statické, nerotující části F₁ a F₀. Podjednotky Atp6 a A6L jsou kódovány mtDNA, ostatní nDNA.

Enzym F₁ (370 kDa, EC 3.6.1.34) je rozpustný ve vodě a obsahuje aktivní místo ATP synthasy, sám bez F₀ pouze katalyzuje hydrolýzu ATP. Aktivní místo je tvořeno podjednotkami α a β a centrální stonek je složen z podjednotek γ , δ a ε . Heterohexamer $\alpha_3\beta_3$ je uspořádaný kolem γ podjednotky, čímž protahuje celkovou délku centrálního stonku [62]. Podjednotky γ a δ jsou vázány na c-prstenec F₀ části komplexu.

Periferní stonek je tvořen z jednotlivých kopií OSCP (protein citlivý na oligomycin) a podjednotek b, d a F₆ [63, 64]. N-terminální konec OSCP interaguje s N-terminální částí podjednotky α a s podjednotkou β blízko vrcholu F₁ a spouští se podél nekatalytického povrchu α - β na F₁ straně. C-terminální část OSCP interaguje s C-terminální doménou podjednotky b [65, 66]. Podjednotky d a F₆ interagují s podjednotkou b [64]. F₆ je malý, vysoce pohyblivý protein a subkomplex OSCP-b-d-F₆ tvoří stator enzymu [61].

F_0 část enzymu se skládá ze dvou domén. První je připojená k centrálnímu stonku a nachází se přesně v místě kde je c_{10} -prsteneček vázaný v subkomplexu F_1-c_{10} . F_1-c_{10} subkomplex obsahuje 6 z 16 podjednotek ATPasy a tvoří 75 % celkové hmoty. Druhá doména je stejně veliká jako c_{10} doména. Je připojena k c-prstenci, přesahuje membránově vázanou část komplexu a přechází v periferní stonku. Tato doména je pravděpodobně složena z membránově vázaných hydrofóbních podjednotek (kódovaných mtDNA) Atp6 (24,8 kDa), A6L (8 kDa) a pravděpodobně také e (8,2 kDa), f (10,2 kDa) a g (11,3 kDa) [57, 67].



Obr. 10: Podjednotkové uspořádání mitochondriální F_0F_1 ATPasy. F_1 je globulární katalytická doména tvořená podjednotkami α , β a třemi podjednotkami centrálního stonku γ , δ a ϵ . F_0 doména je tvořena c oligomerem (10 kopií), podjednotkou a (Atp6), a podjednotkami periferního stonku b, d, F_6 a OSCP. Tzv. minoritní podjednotky (e, f, g, a A6L) nejsou ukázány jednotlivě, všechny procházejí membránou a zastoupeny jsou pravděpodobně ve stechiometrickém poměru 1:1:1:1. Rotor je tvořen centrálním stonkem a c-prstencem. Zbylé podjednotky tvoří stator. Inhibiční protein (IF_1) není ukázán, je vázán na katalytickém povrchu α/β blízko spodní části $(\alpha\beta)_3$. Převzato z [68].

1.4.5.2 Funkce ATP synthasy

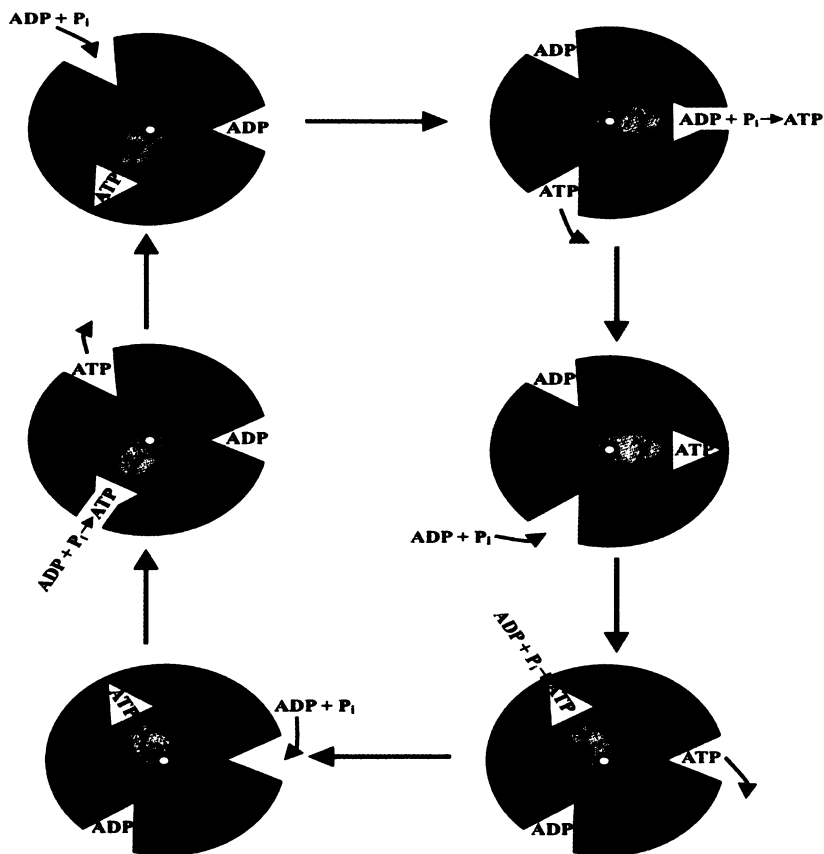
Mitochondriální F_0F_1 ATP synthasa je multipodjednotkový komplex schopný pracovat reverzibilně jako rotační nanomotor mechanickým otáčením centrálního stonku. Fosforylaci

ADP produkuje většinu buněčného ATP, který je zdrojem energie nutné pro mnoho energeticky náročných reakcí v živých buňkách. Na druhou stranu dokáže hydrolyticky štěpit fosfoanhydridovou vazbu ATP a energii tak uvolňovat.

ATP synthasa tedy může pracovat ve dvou funkčně i konformačně odlišných stavech. Při syntéze F_0 motor mění elektrochemický gradient protonů na točivou sílu nutící F_1 motor pracovat – pokud jsou přítomny substráty ADP a P_i – jako generátor ATP, což vede k tvorbě fosfoanhydridové vazby ATP. Na druhou stranu, při hydrolýze, F_1 přeměňuje chemickou energii z hydrolýzy ATP na točivou sílu způsobující, že v membráně zanořený F_0 motor funguje jako iontová pumpa. Komplex F_1 , skládající se z $\alpha_3\beta_3$ hexameru rozloženého kolem centrální dvojité vinuté podjednotky γ , je asymetrický vzhledem k různým interakcím centrální podjednotky γ s každou katalytickou podjednotkou β . Tím poskytuje různé konformace a nukleotidové afinity na jejich katalytickém místě. Při rotaci podjednotky γ se konformace tří podjednotek β postupně mění tak, že každá podjednotka β přijímá konformace různých afinit během jednoho rotačního cyklu. Obr. 6 ukazuje rotaci γ řetězce proti směru hodinových ručiček. Předpokládá se, že řetězce α a β jsou pevně drženy statorem.

Model funkce ATP synthasy se nazývá mechanismus vazebné změny [69]. Každý krok v cyklu popsaném na Obr. 6 zahrnuje vazebné změny řízené protonovou hybnou silou během syntézy ATP. Slabě vázané ADP a P_i jsou přeměněny na ATP jakmile nastane vazebná změna. V dalším kroku se vytvořený ATP stává volněji vázaným a jeho uvolnění pravděpodobně nastává po tomto kroku, nebo je podpořeno další vazebnou změnou, která vrací toto místo do pozice, ve které je podpořena adice ADP a P_i . Vazebné změny jsou mezi sebou provázané, v každém momentě je každé ze tří katalytických míst na enzymu v jiné konformaci. Předpokládá se, že v danou chvíli pouze jedno místo může přijmout těsnou konformaci, ve které nastává kovalentní přeměna. Každou koordinovanou změnou je uvolněna jedna molekula ATP na enzym, každé katalytické místo vyžaduje tři vazebné změny (otevřenou O, uvolněnou L a těsnou T konformaci) k tvorbě ATP (Obr. 11).

V F_0 komplexu je c-prsteneček lemovaný podjednotkou Atp6. Prsteneček interaguje s podjednotkovým komplexem $\gamma\delta\epsilon$ a tvoří tak rotor točící se proti statorovému stonku [70, 71]. Protonová translokace na povrchu Atp6/c podjednotek řízená protonovou hnací silou generuje točivou sílu, která je aplikována na rotorové podjednotky. Toho je využito k podpoře konformačních změn nutných pro syntézu ATP na F_1 katalytických místech. Mechanismus protonové translokace vyžaduje sofistikované interakce mezi podjednotkou Atp6 a rotujícím c-prstencem. Podjednotka Atp6 působí jako mediátor protonového transportu z mezimembránového prostoru do středu membrány, kde vstupující protony procházejí sousedním (blízkým) vazebným místem v c-prstenci. Proton zůstává vázaný téměř celou rotací a uvolněn je do matrix pokud znovu dosáhne povrchu Atp6/c.



Obr. 11: Mechanismus třímístného měnění se vazebného místa pro ATP synthasu. Začátek cyklu nahoře vlevo ukazuje navázání ADP a P_i na prázdné místo (β_E , O, open), zatímco ADP a P_i jsou již vázány na druhém místě (β_{ADP}); těsně vázaná ATP je na třetím místě (β_{ATP} , T). Rotace podjednotky γ způsobuje konformační změny v β_{ATP} místě čímž je ATP uvolněna a konformace se mění směrem k β_E . Původní β_E je přeměněno směrem k β_{ADP} a počáteční β_{ADP} na β_{ATP} . Takto se struktura navrácí do původní (vlevo nahoře) konformace mimo těch tří konformací migrujících kolem prstence z podjednotek α a β . Opakováním těchto kroků dochází k uvolňování ATP a k navrácení strukturního uspořádání do původního stavu (vlevo nahoře). Převzato z [72].

1.4.5.3 Biogeneze ATP synthasy

Mitochondriální ATP synthasa se skládá převážně z jaderně kódovaných podjednotek (kromě podjednotky Atp6 a A6L). Tento komplex je skládán postupně působením několika asemblačních faktorů, ale přesný mechanismus tohoto procesu u savčí ATPasy není zcela jasný. Ke studiu sestavování enzymu byly použity např. lidské Rho nula buňky (ρ^0), které obsahují mitochondrie, ale postrádají mtDNA, buňky jejichž mitochondriální translace byla inhibována působením doxycyklinu, nebo buňky pacientů s různými mitochondriálními onemocněními či syndromy deplece (úbytku) mtDNA.

Podobnost struktury F_1 části enzymu ve všech typech membrán nasvědčuje obdobnému mechanismu asemblace u savců, nižších eukaryot i prokaryot; pro F_0 část to neplatí. K sestavení F_1 části jsou nutné asemblační proteiny Atp11 a Atp12 [73]. Atp12 váže volně podjednotky α a Atp11 umožňuje navázání α s nesestavenou β podjednotkou. Složení celého $(\alpha\beta)_3$ hexameru je komplikovaný proces, při kterém dochází k nahrazení nesestavené podjednotky sousedící podjednotkou.

K vazbě F_1 s F_0 částí je nutná podjednotka δ – a naopak je tento klíčový krok sestavování ATPasového komplexu nezávislý na podjednotce γ . Jaderně kódované F_1 podjednotky mohou být pravděpodobně složeny bez exprese F_0 podjednotek. Je tedy možné, že se F_1 skládá jako samostatný celek, volně napojený na membránu.

Asemblace F_0 části je komplikovaný proces, vývojem od bakterie k člověku získala 7 nových podjednotek a vzhledem ke značným rozdílům mezi vyššími a nižšími eukaryoty v obsahu a umístění genů pro podjednotku c , v asemblačních faktorech specifických pro ATP syntasu, či ve faktorech regulujících transkripci genů mtDNA kódujících ATP syntasu, může být proces asemblace v savčích buňkách od kvasinek odlišný.

Na tvorbě kvasinkové F_0 části se podílí faktory Atp10, Atp22 a Atp23. Atp10 se účastní posledního kroku asemblace – inkorporace podjednotky Atp6; Atp22 hraje důležitou roli v posttranslačních změnách asemblace F_0 . Kvasinková metaloproteasa Atp23 je asociována s vnitřní mitochondriální membránou a zpracovává prekurzor podjednotky Atp6 na zralý protein, účinnost zpracování závisí na přítomnosti Atp10. Atp10 a Atp23 jsou faktory důležité pro posttranslační modifikaci podjednotky Atp6 a pro napojení zralé podjednotky na funkční F_0 část přes oligomer podjednotky c . V savčích buňkách existuje pouze homolog Atp23, ale chybí prekurzorová forma podjednotky Atp6. Proto může být funkce Atp23 u vyšších eukaryot spojená pouze se sestavením a nikoliv s modifikací podjednotky Atp6 [74].

Podjednotka c je u savců esenciální pro zformování celého ATP syntasového komplexu. Navázání c -prstence přitom značně mění fyzikálně-chemické vlastnosti F_1 domény. Vysoce hydrofóbní kruh má potenciál k zakotvení hydrofilní extramembránové F_1 domény do mitochondriální membrány. F_1 - c subkomplex může obsahovat některé další neidentifikované F_0 podjednotky, jelikož u hovězího komplexu ATP syntasy jsou pro spojení F_0 a F_1 vyžadovány i podjednotky OSCP, F_6 a b . F_1 doména a F_1 - c subkomplex jsou považovány za potenciální asemblační intermediáty [74].

V nepřítomnosti podjednotek Atp6 a A6L jsou podjednotky rotoru sestavené, včetně podjednotky c , a jsou přítomné i podjednotky druhého stonku, b a OSCP. Zabudování podjednotky Atp6 je ale závislé na přítomnosti OSCP, pro postupné sestavení OSCP a podjednotky d je důležitá asociace podjednotky b . U *E.coli* a kvasinek není podjednotka Atp6 nezbytná pro zabudování podjednotek b a c do membrány nebo pro fyzické připojení F_1

k membráně. Pro normální funkci komplexu je ale pochopitelně nezbytná. Pro sestavení samotné podjednotky Atp6 jsou nezbytné podjednotky d a c a podjednotka 8 (A6L) [75]. Z toho vyplývá, že podjednotka Atp6, důležitá součást protonového kanálu, musí být přidána až v posledním kroku sestavování F_0F_1 . Mutace v mtDNA zasahující do genu *ATP6* (gen pro podjednotku Atp6) jsou často spojeny s abnormálním hromaděním subkomplexů, podstatným vyčerpáním obsahu podjednotky Atp6 a b a s rostoucím množstvím podjednotky c [74].

1.5 REGULACE SYSTÉMU OXPHOS

Množství spotřebovaného kyslíku či vytvořeného ATP odráží funkci celého systému OXPHOS, nikoliv jednotlivých komplexů. Transkripční a posttranskripční mechanismy, které tvoří základ koordinované exprese jaderných a mitochondriálních genů pro komplexy OXPHOS, závisejí na typu buňky a jejích energetických požadavcích.

Kontrola celého respiračního řetězce je tvořena dvěma mechanismy. Původně byla kontrola respirace definována jako stimulace izolovaných mitochondrií přidáním ADP a postupná inhibice způsobená přeměnou ADP na ATP (primární mechanismus regulace systému OXPHOS). Aktivita mitochondriálního respiračního řetězce je tedy regulována protonovým gradientem na vnitřní mitochondriální membráně spřaženým s tvorbou ATP [76]. Rychlost tvorby ATP je koordinována a limitována dodáváním ADP a P_i a odčerpáváním vzniklého ATP. Pokud by došlo k vyčerpání ADP a membránový potenciál by nebyl využíván k syntéze ATP, došlo by k jeho velkému nárůstu, k zastavení oxidace NADH ($FADH_2$) a redukce kyslíku a buněčná respirace by se zastavila.

Sekundární mechanismus kontroly mitochondriální respirace byl objeven pouze u eukaryotních buněk. Je nezávislý na protonovém gradientu a funguje tak, že inhibuje aktivitu komplexu IV vysokým poměrem ATP/ADP uvnitř mitochondrie přes ATP vázaný na podjednotku Cox4 [23, 77]. Způsobuje tím snížení výkonnosti přeměny energie nebo snížení stechiometrie H^+/e^- protonového pumpování [78, 79].

Regulace funkce COX zahrnuje jak její akutní modulaci na podkladě působení různých ligandů, tak dlouhodobou regulaci na úrovni biogeneze enzymu ovlivňující jak jeho množství, tak podjednotkové složení a interakci s dalšími komplexy OXPHOS. Akutně je respirace v savčích buňkách regulována například koncentrací kyslíku [80], hladinami thyroïdních hormonů (aktivují celou řadu syntetických dějů, což vede ke zvýšené spotřebě ATP) [81] a svalovými kontrakcemi (vzestup hladiny cytozolického Ca^{2+} v buňce vede ke zvýšené oxidaci a produkci ATP u mnoha buněk) [82].

Evoluce vybavila savčí mitochondriální COX množstvím dodatečných podjednotek, které chybí v bakteriálním enzymu. Savčí COX obsahuje 13 podjednotek, což je největší doposud zjištěné množství. Navíc jsou některé z podjednotek exprimovány jako tkáňově specifické izoformy. Cytochrom *c* oxidasa pravděpodobně představuje jeden z nejvíce regulovaných enzymů respiračního řetězce.

V savčích buňkách jsou všechny jaderně kódované podjednotky cytochrom *c* oxidasy (Cox4, 5a, 6, 7, 8 a 9) vyjma Cox5b exprimovány za aerobních podmínek – při optimální koncentraci kyslíku (O_2) 200 μM . Za anaerobních podmínek jsou exprimovány méně, vyjma Cox4 klesá exprese těchto podjednotek až o 70 % mezi koncentrací kyslíku 200 – 100 μM [80, 83]. Koncentrace kyslíku ovlivňuje také mitochondriálně kódované podjednotky – hladiny *COX3* mRNA klesají za anaerobních podmínek až třikrát. Expres Cox1 a Cox2 jsou kyslíkem ovlivněny až na posttranskripční úrovni [22].

Na regulaci savčí COX mají vliv i jaderně kódované faktory hrající roli na všech úrovních její biogeneze (viz výše) – a to na úrovni transkripční, translační i asemblační a na úrovni komunikace mezi mitochondrií a jádrem buňky. Nesprávné sbalení cytochrom *c* oxidasy může mít těžké následky pro celou buňku. Neasemblované podjednotky nebo nefunkční subkomplexy mohou produkovat reaktivní formy kyslíku [84] a fatálně tak poškodit buňku. Asemblační proces musí mít tedy přesně regulovanou koordinaci syntézy potenciálně nebezpečných podjednotek, zejména Cox1, a jejich asemblaci do holoenzymu.

Poruchy asemblačního procesu v kvasinkách vedou ke kumulaci neasemblované Cox1. Tím je Mss51 zadržován v komplexu Cox1-Mss51-Cox14 a za těchto podmínek není protein Mss51 schopný interagovat s *COX1* mRNA, translace je zastavena a Cox1 se dále nesyntetizuje [46]. Asemblace Cox2 je také potenciálně nebezpečná a musí být kontrolována, ale mechanismus regulace její syntézy dosud nebyl objeven [85].

Buňky hnědé tukové tkáně obsahují specifický H^+ -přenašeč, tzv. uncoupling protein (UCP1), který přeměňuje protonmotivní sílu na teplo. Některé chemikálie mohou mít stejný efekt (toxické protonofory), zkratování a disipace protonového gradientu vede k rozptážení tvorby ATP a elektronového transportu [79, 86].

1.6 MITOCHONDRIÁLNÍ CHOROBY

Poruchy oxidační fosforylace jsou spojeny s multisystémovými onemocněními, které jsou často uváděny jako mitochondriální encefalomyopatie, protože významně ovlivňují nervový systém a příčně pruhované svalstvo. Primární defekty OXPHOS mohou být způsobeny mutacemi v mtDNA nebo nDNA.

mtDNA je k mutacím mnohem náchylnější než nDNA, protože se nachází v blízkosti vnitřní mitochondriální membrány, kde vznikají volné kyslíkové radikály, navíc není chráněna histony a v mitochondriích nejsou přítomny funkční mechanismy pro její opravu. Existence i funkce mtDNA jsou zcela závislé na jaderné DNA, která kóduje mitochondriální enzymy pro replikaci, opravy, transkripci a translaci mtDNA. Změny v sekvenci mtDNA mohou být dědičné nebo somatické (vytvořené *in situ*). Frekvence mutací mtDNA je 10 – 20krát vyšší než u nDNA. Identifikováno bylo již přes 150 patogenních bodových mutací a více než 200 delecí, inzercí a přeskupení, každý rok jsou popisovány mutace nové (viz www.mitomap.org). Popsány byly mutace ve všech mtDNA genech kódujících podjednotky komplexů OXPHOS. Například mutace v mtDNA genech kódujících podjednotky komplexu I jsou relativně časté. Oproti tomu mutace v mtDNA genech kódujících podjednotky Cox1, Cox2, Cox3 a genech kódujících podjednotky ATP synthasy jsou vzácné [87, 88].

Více jak 98 % genů pro mitochondriální proteiny je kódováno v jádře a poruchy způsobené mutacemi v nDNA jsou častou příčinou mitochondriálních chorob. Většina mutací genů nDNA kódujících mitochondriální proteiny je děděna jako autozomální recesivní znaky a tyto mutace jsou často příčinou vážných a většinou fatálních onemocnění u dětí. Byly identifikovány poruchy v různých jaderných genech kódujících strukturální složky a asambláčnické faktory komplexů OXPHOS (Sco1, Sco2, Cox10, Cox15, Surf1, Atp12, Atp23 atd.), časté jsou i poruchy jaderně kódovaných faktorů nezbytných k udržení integrity a k replikaci mtDNA. Ty vedou buď k celkovému snížení obsahu mtDNA, nebo k mnohačetným delecím. Mitochondriální onemocnění mohou způsobit i defekty v transportu metabolitů a adeninových nukleotidů (např. inhibice ATP/ADP transportu) [87, 88], nebo v transportu jaderně kódovaných proteinů z cytoplazmy do mitochondrie. Vnitřní mitochondriální membrána neslouží pouze jako „lešení“, složení lipidové dvouvrstvy je rovněž důležité pro funkci jednotlivých komplexů a poruchy funkce mitochondrií mohou být i výsledkem poruchy metabolismu kardiolipinu.

Pro pochopení etiologie a patogeneze mitochondriálních poruch jsou stěžejní tyto aspekty: mitochondriální DNA je děděna maternálně; buňky obsahují stovky organel a tisíce kopií mtDNA; mutace se může v mtDNA populaci vyskytovat jen v části mtDNA molekul, což má za následek koexistenci dvou i více mtDNA genotypů uvnitř jedné buňky, orgánu či v jednotlivci (heteroplazmie); pokud je mutace patogenní, poměr mutovaných molekul v heteroplazmické populaci (mutační zatížení) ovlivňuje vážnost biochemického defektu, ale ne nezbytně lineárním způsobem; replikace mtDNA a dědičnost po rodové linii je pravděpodobná a často má za následek změny v mutačním zatížení během pacientova života a rozdíly v mutačním zatížení v různých buňkách a tkáních (mitotická segregace); protože různé typy buněk mají jinou minimální potřebu oxidativní energie, stupeň heteroplazmie a

dynamika mitotické segregace hrají kritickou roli v určení klinického poškození pacienta (fenotypu) a závažnosti onemocnění.

1.6.1 Mitochondriální choroby na podkladě dysfunkce COX

Defekty COX patří k nejčastějším příčinám mitochondriálních onemocnění [87, 88]. Mohou být izolované, nebo spojené s poruchou dalších komplexů a jsou vyvolány jak mutacemi v mtDNA, tak poškozením jaderných genů. Zatímco mutace mtDNA postihují vlastní podjednotky COX (Cox1, Cox2 a Cox3), doposud odhalené mutace v jaderných genech se týkají pouze pomocných faktorů, nezbytných k biogenezi enzymu, které ale součástí enzymu nejsou. Je překvapující, že zatím nebyly nalezeny žádné mutace, které by vedly k mitochondriálnímu onemocnění na podkladě dysfunkce některé z deseti jaderně kódovaných podjednotek COX.

1.6.2 Leighův syndrom spojený s izolovanou poruchou COX

Leighův syndrom (LS, subakutní nekrotizující encefalomyopatie) je znám jako progresivní neurodegenerativní autozomálně recesivní onemocnění. Choroba nejčastěji propuká u dětí v prvním roce po narození a je charakteristická celkovou psychomotorickou retardací a bilaterálně symetrickými lézemi v podkorové oblasti mozku (bazální ganglia). Je spojena se zvýšeným množstvím laktátu v krvi a cerebrospinální tekutině (laktátová acidóza). Nemoc je fatální v naprosté většině případů, pacienti obvykle umírají před pátým rokem života na kardiopulmonální selhání po opakovaných respiračních infekcích [89, 90].

Leighův syndrom spojený s izolovanou deficiencí COX (LS^{COX}) představuje nejčastější anejvětší skupinu mitochondriálních onemocnění způsobených mutacemi v jaderném genomu [91]. Studie využívající fibroblasty a cybridové klony z LS^{COX} pacientů a kontrolních buněk ukázaly, že u většiny pacientů je za nemoc zodpovědný pouze jeden mutovaný lokus [92, 93]. V roce 1998 byla mutace identifikována v genu *SURF1* nezávisle dvěma skupinami [94, 95]. *SURF1* kóduje protein vnitřní mitochondriální membrány. Studie na kvasinkovém homologu Shy1 ukázaly, že je nezbytný pro správný přenos elektronů mezi respiračními komplexy III a IV [96].

1.6.2.1 Surf1 exprese a funkce

Gen *SURF1* o délce 4700 bazí je umístěný v kompaktním surfeit lokusu – genovém klastru šesti housekeepingových genů (udržovací geny nutné pro fungování organismu) na devátém chromozomu v oblasti 9q34 [97, 98]. Tento DNA úsek prakticky postrádá heterochromatin, obsahuje 9 exonů a nese zvláštní rysy jako je obousměrný promotor pro *SURF1* a *SURF2* geny [99]. *SURF1* kóduje protein Surf1 o délce 300 aminokyselin (přibližně 300 kDa), který je nezbytný pro asemblaci COX a funkci dýchacího řetězce.

Ve všech studovaných tkáních byly nalezeny stejné hladiny *SURF1* mRNA s výjimkou mozku, kde byly nižší. Gen je exprimován v substechiometrickém množství relativně k podjednotkám COX [100]. U pacientů s mutací vedoucí k předčasnému stop kodonu nebyla detekována žádná *SURF1* mRNA ani protein Surf1 [100, 101]. V pozdějších studiích byla detekována normální hladina *SURF1* mRNA u pacientů nesoucích missence bodovou mutaci, ale samotný Surf1 protein opět nebyl nalezen [102].

Predikce sekundární struktury proteinu Surf1 odhalila přítomnost dvou transmembránových domén spojených s centrální kličkou v mezimembránovém prostoru. K vyhodnocení, které části proteinu jsou nezbytné pro jeho funkci, byly použity cDNA konstrukty kódující několik zkrácených verzí proteinu k transfekci LS^{COX} fibroblastů. S výjimkou varianty kde chybělo pouze pět C-terminálních aminokyselin žádný z těchto konstruktů nekomplementoval deficienci COX [100, 101]. I přes vysokou konzervovanost Surf1 v evoluci (homology byly nalezeny ve všech skupinách eukaryotů a i některých prokaryotů) [53], *SURF1* cDNA konstrukt celé délky proteinu Surf1 nekomplementoval *pet* fenotyp kvasinkového kmene s delecí *SHY1* [101], což poukazuje na možnost vzniku rozdílů v jeho funkci během evoluce mnohabuněčných organismů.

Role Surf1 byly studovány na všech úrovních exprese COX. Změny v množství nebyly nalezeny u jaderně ani mitochondriálně kódovaných transkriptů COX, stejně tak nebyla nalezena změna v účinnosti jejich translace. Z toho vyplývá, že funkce Surf1 se projevuje až v pozdějších fázích exprese COX. Dvourozměrnou BN-PAGE/SDS-PAGE byly u LS^{COX} pacientů objeveny naakumulované intermediáty ze začátku asemblačního procesu. Sestavování enzymu bylo blokováno na úrovni intermediátu S2 (Cox1-4-5a). Pravděpodobně tedy izolované defekty COX způsobené absencí proteinu Surf1 ovlivňují navazování (spojení) podjednotky Cox2 a Cox3 s heterodimerem podjednotky Cox1 a Cox4 [54, 101, 103].

I přes absenci Surf1 vzniká v postižených buňkách a tkáních 20% množství holoenzymu oproti kontrole, což poukazuje na určitý stupeň spontánnosti asemblačního procesu, kde je Surf1 zásadně významný pro vznik dostatečného množství COX, ale pro samotné sestavení

enzymu z podjednotek absolutně esenciální není. Zhoršená COX asemblace u LS^{COX} pacientů byla potvrzena i jinými studiemi [103].

1.6.2.2 Surf1 mutace a změny ve struktuře a funkci COX

Od doby, kdy byl tento defekt určen jako primární příčina LS^{COX}, bylo popsáno již čtyřicet patogenních mutací *SURF1*. Většina z nich jsou nonsense mutace charakteristické vznikem předčasného stop kodonu. Popsány byly i missence mutace a splicing-site mutace, ale ty jsou méně časté. Mutace způsobují translaci nekompletních forem proteinu Surf1, které jsou rapidně degradovány, nebo nestabilitu *SURF1* mRNA, vedou k zamezení syntézy proteinu. Většina mutací *SURF1* je shrnuta v review [98, 104].

I přes to, že aktivita enzymu COX v LS^{COX} pacientech v různých tkáních je snižena na 5 – 40 % oproti kontrole, je nástup klinických symptomů zpožděn a během prvního měsíce života se pacienti jeví jako klinicky normální. Také asemblace COX není plně zastavena, zbytková množství normálního enzymu byla nalezena u pacientů, kterým Surf1 chyběl úplně. Kinetické analýzy odhalily nezměněnou hodnotu Michaelisovy konstanty, ale dramatický pokles maximální rychlosti enzymatické reakce tohoto enzymu. Komplexy cytochrom *c* oxidasy v LS^{COX} fibroblastech byly více citlivé na detergent laurylmaltosid a na stoupající teplotu [97, 101, 105-108].

Buňky LS^{COX} jsou charakteristické obecným snížením obsahu podjednotek COX [100, 102, 106, 108-110]. Tato skutečnost s největší pravděpodobností odráží sníženou stabilitu a rapidní degradaci neasemblovaných podjednotek, resp. subkomplexů. V buňkách LS^{COX} nebyly nalezeny větší rozdíly mezi množstvím mitochondriálně a jaderně kódovaných podjednotek.

U LS^{COX} fibroblastů byla nalezena abnormální vápníková homeostáza a bylo navrženo možné spojení s nízkým potenciálem mitochondriální membrány. V plazmatické membráně LS^{COX} fibroblastů je narušeno otevírání kanálu ovládajícího zásobu vápníku (SOC – store operated channels) a stejný efekt měl u kontrolních buněk uncoupler (rozpřahovač) mitochondriální membrány, což ukazuje že pro řádnou kontrolu otevírání SOC je potenciál mitochondriální membrány nezbytný. To s největší pravděpodobností prokazuje nízké hodnoty membránového potenciálu v LS^{COX} buňkách [111].

Možná role proteinu Surf1 ve vápníkové homeostáze byla navržena také skupinou Zevianiho (Miláno, Itálie) po studiích na modelu myši s vyřazeným (knock-outovaným) genem *SURF1*. Absence Surf1 v myších s knock-outem *SURF1* způsobovala lehčí COX deficienci než u lidí a chyběl i neurologický fenotyp typický pro člověka. Paradoxně, *SURF1*

knock-outovaná zvířata vykazovala významnou rezistenci vůči kainátem (kyselina kainová) vyvolané neurodegeneraci oproti kontrolním zvířatům. Zdá se tedy, že v neuronech postrádajících protein Surf1 nedochází k tak masivnímu odtoku vápníku, který vede k excitotoxicitě a buněčné smrti. Autoři tvrdí, že změna ve vápníkovém „řízení“ není způsobena změnami v potenciálu mitochondriální membrány [112], ale k objasnění těchto nálezů je nutné provést ještě řadu experimentů.

I téměř deset let po objevení faktu, že LS^{COX} je způsoben mutacemi v genu *SURF1*, je role tohoto proteinu stále neznámá.

1.6.3 Mutace v mtDNA úseku kódujícím podjednotku Atp6 ATP synthasy a podjednotku Cox3 cytochrom c oxidasy

Mutace mtDNA genů pro podjednotky Cox1, Cox2 a Cox3 jsou obecně záměnné mutace vedoucí ke změně aminokyselinové sekvence dané podjednotky. Výjimku tvoří mutace postihující úsek mezi geny pro ATPasovou podjednotku Atp6 a navazující podjednotku Cox3. V roce 1996 byla nalezena mikrolece 2 párů bazí na pozici 9205 a 9206 (9205delTA) u novorozence s přechodnou laktátovou acidózou [113]. V roce 2003 byl nalezen i druhý případ 9205delTA mikrolece, tentokrát u dítěte s těžkou encefalomyopatií a hyperlaktáacidemií [114].

Tato ojedinělá mtDNA mutace 9205delTA postihuje stop kodon genu *ATP6* a sestřihové místo mezi *ATP6* a *COX3* (Obr. 2). Northern blot a kvantitativní real-time reverzní transkripční-PCR analýzy ukázaly, že primární transkript *ATP6-COX3* je sestřižen na *ATP6* a *COX3* mRNAs méně efektivně. Strukturální studie nativní a dvourozměrnou elektroforézou odhalily pozměněný model assemblace COX a nestabilitu ATP synthasového komplexu, který disocioval v subkomplexy. mtDNA mutace 9205delTA brání syntéze ATPasové podjednotky Atp6 a způsobuje tvorbu nekompletních komplexů ATP synthasy, které jsou schopné hydrolyzovat ATP, ale již nejsou schopné ATP syntetizovat. Mutace postihuje i biogenezy COX komplexu, který je v postižených buňkách přítomen ve sníženém množství [115].

2 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem mé diplomové práce bylo pomocí elektroforetických metod a analýzou Western blotu spojeného s imunodetekcí specifickými protilátkami zjistit:

- 1) zda absence proteinu Surf1 v tkáních myši s (knock-outem) vyřazením genu *SURF1* ovlivňuje asamblaci COX na úrovni intermediátů, zda a v jakém množství se intermediáty hromadí a jaké je jejich složení a
- 2) zjištěné výsledky porovnat s publikovanými výsledky získanými analýzou mitochondrií pacientů s mutací *SURF1*,
- 3) jakým způsobem mtDNA mikrolece 9205delTA v genu *ATP6/COX3* postihuje tvorbu mitochondriálně kódované podjednotky Cox3 a jak ovlivňuje asamblaci cytochrom *c* oxidasy.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 MATERIÁL

3.1.1 Přístroje a pomůcky

AIDA (Advanced Image Data Analyzer, 3.21.001)	raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Německo
Adobe Photoshop Elements 5.0.2	Adobe Systems Incorporated, U.S.A.
Analytické váhy a předvážky AC ADAPTER	A&D Co., LTD., Japonsko
Automatické pipety (objem 2, 20, 200, 1000 µl)	Gilson, U.S.A.
Centrifuga CENTAUR 2 MSE	SANYO, Japonsko
Centrifuga 3K18	SIGMA, U.S.A.
CorelDRAW Graphics Suite X3	Corel Corporation, U.S.A.
Elektroforetické sady MiniProtean 2 a 3 systems	Bio-Rad, U.S.A.
Fluorescenční skener Odyssey Infrared Imaging System	LI-COR, U.S.A.
Homogenizátor skleněný s teflonovým pístem, vel. 19	KONTES GLASS Co., U.S.A.
Homogenizér RZR 2041	Heidolph Instruments GmbH, Německo
Chromatografický papír 3 MM chr	No 3030917, Whatman, Velká Británie
Laboratorní sklo	SIMAX, Česká republika
Magnetická míchačka H+P variomag mono	Labortechnik AG, Německo
Míchačka SSL4	Stuart scientific, Velká Británie
pHmetr HI 9024 s elektrodou HI 1230	HANNA instruments, Německo
Pipetovací špičky (objem 2, 20, 200, 1000 µl)	Sarstedt, Německo
Peristaltická pumpa a mísič gradientových gelů	Cole-Parmer Instruments, U.S.A.
PVDF transferová membrána Immobilon-P, póry 0,45 µm	Millipore Corporation, U.S.A.
Skener CanoScan 9950F	Canon, Kanada
Sonikátor BANDELIN	Sonoplus, Francie
Spektrofotometr BioPhotometr	Eppendorf, Německo
Termostat B15	Heraeus instruments, Německo
Ultracentrifuga RC M100	Sorvall, Velká Británie

Vodní lázeň s třepačkou MEMMERT	UNIMED, Česká republika
Vortex MS2 Minishaker	IKA Works, INC., Velká Británie
Western blotová aparatura	OMNI-BIO, Česká republika
Zdroje napětí a proudu POWER PAC 300 a model P1	Bio-Rad, U.S.A. OMNI BIO, Česká republika
Zkumavky centrifugové typu Sarstedt, 15 ml	TPP, Švýcarsko
Zkumavky polystyrenové 400948, 5 ml	GAMA GROUP a.s., Česká republika
Zkumavky umělohmotné typu Eppendorf (0,5; 1,5 a 2 ml)	Sarstedt, Německo

3.1.2 Chemikálie

Alexa Fluor 680 donkey anti-goat, sekundární protilátka	2 mg/ml, A21084, Molecular Probes, U.S.A.
Alexa Fluor 680 goat anti-mouse, sekundární protilátka	2 mg/ml, A21058, Molecular Probes, U.S.A.
Akrylamid	Serva, Německo
6-aminohexanová kyselina (aminokapronová kyselina, kyselina ϵ -aminokapronová)	99%, SIGMA, Německo
Anti-Cox1, monoklonální primární protilátka	1 mg/ml, MS404, Mitosciences, U.S.A.
Anti-Cox2, monoklonální primární protilátka	1 mg/ml, MS405, Mitosciences, U.S.A.
Anti-Cox4, monoklonální primární protilátka	1 mg/ml, MS407, Mitosciences, U.S.A.
Anti-Cox5a, monoklonální primární protilátka	1 mg/ml, MS409, Mitosciences, U.S.A.
Anti-Cox6c, monoklonální primární protilátka	1 mg/ml, MS414, Mitosciences, U.S.A.
Azid sodný	Avondale Laboratories, Velká Británie
Bis-Tris	98%, SIGMA, Německo
BSA	Bioveta, Česká republika
Bradfordovo činidlo	Bio-Rad, U.S.A.
Bromfenolová modř, sodná sůl	SIGMA, U.S.A.
Coomassie Brilliant Blue G250	Serva, Německo

Coomassie Brilliant Blue R250	Serva, Německo
Cytochrom <i>c</i> oxidasa III (N-20), polyklonální primární protilátka	200 µg/ml, SC-23986, Santa Cruz Biotechnology, U.S.A.
Dodecyl-β-D-maltosid (lauroylmaltosid)	≥ 99%, SIGMA, Německo
Dithiothreitol	99%, SIGMA, U.S.A.
EDTA	98%, SIGMA, Německo
EGTA	≥ 97%, SIGMA, Německo
Ethanol	99,8%, Lachema, Česká republika
Glycerol	99%, SIGMA, Německo
Glycin	99%, REANAL, Maďarsko
HCl	35%, Lach - Ner, s.r.o., Česká republika
HMW kalibrační kit pro nativní elektroforézu	17044501, GE Healthcare, Velká Británie
KH ₂ PO ₄	99%, Lachema, Česká republika
Kyselina octová	99%, Lach - Ner, s.r.o., Česká republika
Laktino sušené mléko (1,3 % tuku)	Promil, Slovenská republika
2-merkptoethanol	98%, SIGMA, Německo
Methylalkohol	99,8%, Penta, Česká republika
N,N'-methylenbisakrylamid	Serva, Německo
NaCl	Lach - Ner, s.r.o., Česká republika
NaOH	Lach - Ner, s.r.o., Česká republika
Na ₂ HPO ₄ .12 H ₂ O	98%, Penta, Česká republika
OXPHOS kit, směs monoklonálních primárních protilátek	MS 603, Mitosciences, U.S.A.
Peroxosíran amonný	Bio-Rad, U.S.A.
Sacharóza	SIGMA, Německo
SDS	Serva, Německo
Směs proteasových inhibitorů PIC	P8340, SIGMA, Německo
Standard molekulové hmotnosti pro SDS-PAGE	Prestained Protein Ladder, Fermentas, U.S.A.
TEMED	Serva, Německo
Tricin	SIGMA, Německo
Tris	SIGMA, Německo
Trypsin	SIGMA, Německo
Tween 20	SIGMA, Německo

3.1.3 Experimentální modely

Ke studiu procesu sestavování COX byly použity dva savčí modely – myší tkáň a lidské fibroblasty. Myši s vyřazeným (knock-outovaným) genem *SURF1* byly vytvořeny v laboratoři M. Zevianiho (Istituto Neurologico Carlo Besta, Miláno, Itálie), použity byly tkáň z těchto knock-outů a z kontrolních myší.

V laboratoři Bioenergetiky Fyziologického ústavu AV ČR byly kultivovány kultury kožních fibroblastů pacientů postižených mtDNA mutací genu *ATP6* (9205delTA) popsané v práci [115]. Jako kontrolní vzorky byly použity kožní fibroblasty od jednotlivců bez mitochondriálních onemocnění kultivované rovněž v této laboratoři.

3.2 METODY

3.2.1 Sklizení buněk a izolace mitochondrií z fibroblastů

Příprava roztoků

PBS 10x – fosfátem pufovaný fyziologický roztok: 24 g NaCl, 1,2 g KCl, 8,4 g

Na₂HPO₄ · 12H₂O, 0,6 g KH₂PO₄, doplněno do 300 ml H₂O; pH 7,2-7,3 / 1M NaOH

PBS 1x – 300 ml PBS 10x doplněných do 3 l H₂O, filtrováno přes filtr s póry 0,22 μm

Trypsin 2% – 20 g/l v PBS 1x, filtrováno přes filtr s póry 0,22 μm

EDTA 2% – 20 g/l v PBS 1x, filtrováno přes filtr s póry 0,22 μm

T+E – 5 ml 2% trypsinu, 2 ml 2% EDTA, 43 ml PBS 1x, filtrováno přes filtr s póry 0,22 μm, poté přidáno 150 ml PBS 1x

SEKT – 250 mM sacharóza, 20 mM EGTA, 40 mM KCl, 20 mM Tris; pH 7,6

PIC – směs proteasových inhibitorů, přidávaná do roztoku Tris, SEKT a SB v poměru 1:500

Sklizení buněk

Postup: Z kultivačních lahví jsem slila kultivační médium do předem připravených, označených kádinek, promyla je PBS 1x a do každé (75 cm²) kultivační lahve pipetovala 1,5 ml T+E. Lahve jsem vložila do termostatu (Heraeus instr.) vyhřátého na 37 °C. Uvolňování fibroblastů ze dna lahve trvalo přibližně 15 min. Část kultivačního média jsem po uvolnění buněk nalila zpět do kultivačních lahví, abych zabránila dalšímu působení trypsinu

a suspenzi s buňkami převedla do připravených, označených zkumavek typu Sarstedt. Dále jsem s buňkami pracovala při 4 °C, předchlazené byly i roztoky. Buňky jsem centrifugovala 5 min při 1800 rpm (Centaur 2), poté slila supernatant, pelet buněk resuspendovala PBS 1x a opět centrifugovala. Stejně buňky jsem spojila do jedné zkumavky s PBS 1x a centrifugovala. Po poslední promývací centrifugaci jsem buňky resuspendovala v určitém objemu PBS 1x (1 ml) a změřila protein postupem dle Bradfordové. Po sklizení jsem ze suspenze buněk připravila mitochondrie, nebo je zamrazila na – 20 °C.

Izolace mitochondriální frakce užitím hypotonického šoku

Postup: Suspenze buněk jsem převedla do předem zvážené 1,5ml zkumavky typu Eppendorf a centrifugovala při 600 g a 4 °C deset minut. Poté jsem ze zkumavky odsála supernatant a zvážila ji. Pelet jsem resuspendovala v desetinásobku váhy peletu (v mg) v objemu (v μ l) 10 mM Tris + PIC (1:500), hned přenesla do dobře těsnícího homogenizéru (teflon/sklo) a při 600 rpm 8x pomalým tahem pístu zhomogenizovala. Po homogenizaci jsem rychle přidala pětinu objemu 1,5M sacharózy, roztok převedla do zkumavky a opět centrifugovala 10 min při 600 g a 4 °C. Supernatant jsem převedla do zkumavky a nechala na ledu, pelet jsem resuspendovala v původním objemu SEKT + PIC a zhomogenizovala při 800 rpm 5x pomalým tahem pístu. Roztok jsem převedla do zkumavky a centrifugovala při 600 g 4 °C deset minut. Supernatant jsem spojila s předchozím supernatantem a centrifugovala při 10 000 g a 4 °C 10 min. Supernatant jsem odsála, mitochondriální pelet resuspendovala v konečném objemu 100 μ l SEKT + PIC a změřila protein. Mitochondriální frakci jsem solubilizovala pomocí detergentu (lauroylmaltosidu), nebo zamrazila na – 20 °C.

3.2.2 Stanovení koncentrace proteinů

Pro stanovení koncentrace proteinů ve vzorcích byla použita metoda dle Bradfordové založená na rovnovážných stavech mezi třemi formami barviva Coomassie Brilliant Blue. Za silně kyselých podmínek je barvivo nejstabilnější ve dvouprotonované červené formě, ale po navázání na protein se mění (přes zelenou) na neprotonovanou modrou formu [116]. Intenzita modrého zbarvení měřená spektrofotometricky oproti slepému vzorku při vlnové délce 595 nm odpovídá množství proteinu ve vzorku. Koncentrace proteinu je vypočtena z lineární závislosti kalibrace.

Postup: Kalibrační roztoky o koncentracích 0, 4, 8, 12, 16 a 20 µg/ml do 1 ml H₂O jsem připravila ze standardu BSA 0,2 mg/ml, přidala 250 µl Bradfordova činidla a ihned promíchala (Vortex). Po 2 minutách jsem změřila absorbanci roztoků při 595 nm (BioPhotometer) oproti slepému vzorku. Ze vzorků fibroblastů, mitochondrií nebo solubilizovaných proteinů jsem vždy odebrala paralelní objemy 1 a 2 µl do 1 ml H₂O, sonikovala (BANDELIN) je 20 s při 20% amplitudě (v případě fibroblastů a mitochondrií), přidala 250 µl Bradfordova činidla a roztoky jsem ihned promíchala. Po 2 minutách jsem změřila absorbanci roztoků při 595 nm proti slepému vzorku. Slepý vzorek obsahoval 1 ml H₂O a 250 µl Bradfordova činidla.

3.2.3 Vzorky myších tkání

Vzorky myších tkání (srdečních, jaterních a mozkových) a kultivované myší fibroblasty jsem obdržela jako jednotlivé zamražené (– 20 °C) suspenze mitochondrií.

3.2.4 Solubilizace mitochondrií

Příprava roztoků

LM – 10% lauroylmaltosid

SB – solubilizační pufr: 1,5 M 6-aminohexanová kyselina, 150 mM Bis-Tris, 0,5 mM EDTA;
pH 7,0

Postup: Mitochondrie jsem solubilizovala neiontovým slabým detergentem LM v poměru 4 mg detergentu na 1 mg proteinu (LM4) nebo 1 mg detergentu na 1 mg proteinu (LM1). Tímto postupem došlo k narušení slabších proteinových interakcí, z mitochondriální membrány se proteiny uvolnily a bylo možné je centrifugací oddělit od nesolubilizovaného materiálu. Vzorky mitochondrií o známé koncentraci proteinu jsem solubilizovala 10% roztokem laurylmaltosidu a do konečné koncentrace (většinou 200 µg proteinu) ředila roztokem SB. Vzorky s LM jsem inkubovala 5 min při 4 °C, několikrát promíchala (Vortex) a poté centrifugovala při 20 000 g a 4 °C 20 min.

Ze supernatantu jsem odebrala 1 a 2 µl na stanovení proteinu a z určitého objemu připravila vzorky na SDS a BN elektroforézu.

3.2.5 Příprava vzorků na elektroforézy

Příprava roztoků:

SLB 3x – vzorkový lyzační pufr: 6 % 2-merkptoethanol, 12 % SDS, 150 mM Tris, 30 % glycerol, 5 mg Coomassie Brilliant Blue G250

SBG – vzorkový pufr: 5 % Coomassie Brilliant Blue G250, 0,5 M 6-aminohexanová kyselina

SLB_{DTT} – vzorkový lyzační pufr (jiné složení než SLB 3x): 100 mM DTT, 4 % SDS, 100 mM Tris, 20 % glycerol, 0,002 % bromfenolová modř; pH 6,8

SLB – vzorkový lyzační pufr bez DTT, shodné složení jako SLB_{DTT}, pouze bez DTT

Po změření proteinu po solubilizaci byl z každého vzorku odebrán určitý objem supernatantu na vzorek pro disociovanou (SDS vzorek) a nativní (BN vzorek) elektroforézu (PAGE). Ke vzorku na SDS-PAGE jsem přidala stejný objem SLB 2x a do konečné koncentrace (2 mg/ml) ho naředila SLB 1x. K LM4 vzorku na BN-PAGE jsem přidala SBG v poměru 1:40, k LM1 vzorku 1:20.

SDS vzorky jsem inkubovala 5 min při teplotě 100 °C a poté zamrazila na – 20 °C, BN vzorky jsem ihned po přípravě zamrazila na – 20 °C.

Pro ověření možného vlivu SH-redukčních činidel na reaktivitu antigenů jsem připravila dva odlišné vzorkové pufrы SLB_{DTT} a SLB. SLB_{DTT} obsahoval místo 2-merkptoethanolu dithiotreitol, SLB neobsahoval DTT ani 2-merkptoethanol (viz kapitola 4.2.1 Imunodetekce podjednotky Cox3).

3.2.6 Elektroforetické metody

Vertikální SDS elektroforéza na minigelech

Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS (SDS-PAGE) je relativně rychlá a reprodukovatelná metoda separující bílkoviny na základě rozdílné relativní molekulové hmotnosti. SDS je anionický detergent rušící terciární a sekundární struktury proteinů rozrušením vodíkových vazeb, na bílkovinný řetězec se váže v poměru 1,4 g SDS na 1 g bílkoviny, přičemž délka komplexu SDS-bílkovina je úměrná jeho molekulové hmotnosti. Na základě srovnání relativních mobilit bílkoviny a standardů je pak možné určit její relativní molekulovou hmotnost [117].

Roztok akrylamidu a bisakrylamidu polymerizuje díky volným radikálům poskytnutým AP, které způsobují štěpení vazeb mezi kyslíky (O-O). K urychlení reakce se používá TEMED, což je zásada katalyzující tvorbu volných radikálů.

Příprava roztoků

3x GB – gelový pufr: 3 M Tris, 0,3 % SDS; pH 8,45

AB – 48 % akrylamid, 1,5 % bisakrylamid

AP – 10 % peroxosíran amonný

Katodový pufr – 100 mM Tris, 100 mM Tricin, 0,1 % SDS; pH 8,25

Anodový pufr – 100 mM Tris; pH 8,9

Příprava gelů

10 ml 10% separačního gelu: 3,64 ml H₂O, 3,3 ml 3x GB, 2 ml AB, 1 ml

87% glycerolu, 50 µl AP, 6 µl TEMED

5 ml 4% zaostřovacího gelu: 3,36 ml H₂O, 1,2 ml 3x GB, 0,4 ml AB, 40 µl AP,

4 µl TEMED

Postup: Mezi složená skla vertikální elektroforetické aparatury (MiniProtean 2, 3) jsem nanesla 10% separační gel, po jeho zpolymerizování 4% zaostřovací gel, ve kterém jsem pomocí hřebínku vytvořila jamky. Do jamek jsem nanášela SDS vzorky v množství 0,5 – 20,0 µg proteinu a standardy molekulové hmotnosti (Prestained Protein Ladder). Po sestavení celé elektroforetické aparatury a nalití katodového a anodového pufru do příslušných prostorů jsem zdroj napětí nastavila na 45 V. Po doputování vzorků do separačního gelu jsem zdroj napětí nastavila na 90 V. Po zastavení elektroforézy byly gely vyjmuty z aparatury a použity pro Western blot a následnou imunodetekci specifickými protilátkami.

Vertikální dvourozměrná elektroforéza: BN/SDS-PAGE

Spojením nativní elektroforézy v prvním rozměru a SDS elektroforézy v rozměru druhém získáme dvourozměrné proteinové mapy, které poskytují komplexní informace o složení a množství jednotlivých komplexů či subkomplexů v analyzovaných vzorcích [118, 119].

Při nativní elektroforéze na polyakrylamidovém gelu (BN-PAGE) je do katodového pufru přidána Coomassie Brilliant G250, která nedenaturuje proteiny. Během elektroforézy toto aniontové barvivo soutěží s neionogenním detergentem a váže se na membránové proteiny a komplexy a posouvá hodnotu jejich náboje k negativnějším hodnotám podobně jako SDS, proteiny pak putují bez ohledu na svůj izoelektrický bod (pI) směrem k anodě a separují se dle

molekulové hmotnosti. Agregace proteinů je minimalizována díky vzájemnému odpuzování jejich negativně nabitých povrchů [120].

Příprava roztoků

3x GB – 1,5 M 6-aminohexanová kyselina, 150 mM Bis-Tris; pH 7,0

AB – 48 % akrylamid, 1,5 % bisakrylamid

AP – 10% peroxosíran amonný

Katodový pufr bezbarvý – 15 mM Bis-Tris, 50 mM Tricin; pH 7,0

Katodový pufr modrý – 15 mM Bis-Tris, 50 mM Tricin, 0,02 % Coomassie Brilliant Blue R250; pH 7,0

Anodový pufr – 50 mM Bis-Tris; pH 7,0

roztok 2D-LB – pufr pro druhý rozměr: 1 % SDS, 1 % 2-merkptoethanol

Příprava gelů

5 ml 4% zaostřovacího gelu: 2,87 ml H₂O, 0,4 ml AB, 1,65 ml 3x GB, 60 µl AP, 6 µl TEMED

5 ml 6% separačního gelu: 2,72 ml H₂O, 1,2 ml AB, 3,3 ml 3x GB, 30 µl AP, 3 µl TEMED

5 ml 18% separačního gelu: 0,5 ml H₂O, 1,8 ml AB, 1,65 ml 3x GB, 1 ml 87% glycerolu, 5 µl AP, 1 µl TEMED

Postup: V prvním rozměru jsem provedla BN-PAGE. Mezi složená skla vertikální elektroforetické aparatury (MiniProtean 2) jsem pomocí míšiče gradientových gelů a peristaltické pumpy nanasla podvrstvením pod 1 ml H₂O separační gel s gradientem akrylamidu 6 – 18 %, po jeho zpolymerizování 4% zaostřovací gel a pomocí hřebínku jsem v něm vytvořila jamky. Do jamek převrstveným modrým katodovým pufrem jsem dávkovala vzorky v množství 15 – 20 µg proteinu a standard molekulové hmotnosti (HMW kalibrační kit). Nejdříve elektroforéza probíhala při 45 V, po doputování vzorků do separačního gelu jsem napětí nastavila na 95 V. Než doputovalo čelo migrujících iontů do poloviny gelu byl v katodovém prostoru použit modrý katodový pufr. Poté jsem ho vyměnila za bezbarvý. Jednotlivé separační linie jsem po skončení BN-PAGE nařezala na proužky a inkubovala je 60 min v roztoku 2D-LB (2-merkptoethanol rozrušuje disulfidové můstky a SDS vodíkové vazby, proteiny jsou v gelech denaturovány). Poté jsem proužky kontroly a vzorku vložila mezi skla vertikální elektroforetické aparatury (MiniProtean 2, 3), nanasla 10% separační gel, po zpolymerizování 4% zaostřovací gel, v něm vytvořila jamku pro standard molekulové hmotnosti (Prestained Protein Ladder) a pustila SDS-PAGE stejným způsobem viz výše. Po doběhnutí elektroforézy jsem blotovala (elektrotransfer) vždy kontrolu a studovaný vzorek

na jednu PVDF membránu pod sebe. Poté jsem provedla imunodetekci specifickými protilátkami.

Proužek se standardy z prvního nativního rozměru jsem barvila v roztoku obsahujícím Coomassie Brilliant Blue R250.

3.2.7 Western blot na PVDF membrány

Western blot (elektrotransfer) spojený s imunodetekcí proteinů vázaných na PVDF membránách je velmi citlivá a specifická metoda detekce a kvantifikace proteinů. Elektrotransfer jsem provedla technikou semi-dry na aparatuře OMNI-BIO se třemi transferovými pufry.

Příprava roztoků

Puf I – anodový puf I: 0,3 M Tris, 10 % methanol; pH 10,4

Puf II – anodový puf II: 25 mM Tris, 10 % methanol; pH 9,0

Puf III – katodový puf: 38 mM Tris, 10 mM glycin, 10 % methanol; pH 8,5

Postup: Aby nedocházelo ke kontaminaci membrány, pracovala jsem v rukavicích. Hned po skončení elektroforézy jsem gely (kontrola a vzorek) inkubovala v pufru III 15 min za stálého třepání. PVDF (0,45 μ m Immobilon-P) membránu jsem 30 s namáčela ve 100% methanolu (dokud se nezměnila všude v poloprůsvitnou), poté jí třepala 2 min v ultračisté vodě a 5 min v pufru II. Nařezala jsem 15 filtračních papírů (3 MM chr Whatman) a namočila jich šest na 30 s v pufru I, tři v pufru II a šest v pufru III. Blotovací aparaturu jsem sestavila následovně: spodní elektroda (anoda) navlhčená H₂O – 6 filtračních papírů v pufru I – 3 filtrační papíry v pufru II (poté jsem vytlačila z jednotlivých vrstev bublinky) – PVDF membrána ekvilibrovaná v pufru II – gely ekvilibrované v pufru III – 6 filtračních papírů v pufru III (z jednotlivých vrstev jsem vytlačila bublinky) – navlhčená horní elektroda (katoda). Přenos byl proveden při konstantním proudu, pro membrány o rozměrech 7x10 cm 60 mA 60 min, pro membrány 14x10 cm 120 mA 60 min.

Po přenosu jsem membrány nechala vysušit na vzduchu při pokojové teplotě, nebo je hned blokovala v 10% mléku.

3.2.8 Imunodetekce specifickými protilátkami

Příprava roztoků

PBS – 0,15 M NaCl, 0,02 M Na₂HPO₄; pH 7,4 / 1M NaOH

PBST 0,3 – 0,3 % Tween 20 v PBS

10% mléko – sušené nízkotučné mléko Laktino v PBS

Postup: Membránu jsem po přenosu (Western blotu) inkubovala 5 min v PBS (suchou membránu je nutné před ekvilibrací v PBS ponořit na 2 – 3 min do 100% methanolu). Poté jsem membránu blokovala 60 min v 10% mléku, dvakrát opláchla v PBST 0,3 (omytí od zbytků mléka) a 2 hodiny inkubovala v primární protilátce ředěné v PBST 0,3 (Tab. 2). Poté jsem membránu oplachovala 3x 10 min v PBST 0,3 a inkubovala 1 hod v sekundární protilátce (značené křenovou peroxidasou) ředěné v PBST 0,3 (v uzavřené nádobě bez přístupu světla) (Tab. 3). Poté jsem membránu oplachovala 3x 10 min v PBST 0,3, nakonec 10 min v PBS a provedla jsem standardní detekci pomocí fluorescenčního skeneru Odyssey (viz níže).

Primární protilátky

Tab. 2: Použité monoklonální a polyklonální primární protilátky od Mitosciences (U.S.A.) a Santa Cruz Biotechnology (U.S.A.).

Protilátka	Katalogové číslo	Ředění v PBST 0,3
antiCox1 – komplex IV	MS404	1:1000
antiCox2 – komplex IV	MS405	1:1000
antiCox4 – komplex IV	MS407	1:250
antiCox5a – komplex IV	MS409	1:1000
antiCox3 – komplex IV	SC-23986	1:200
OXPHOS kit obsahující:		
komplex I – NADH39 - 2 µg/ml		
komplex II – Sdh70 - 0,1 µg/ml	MS603	1:1000
komplex III – Core2 - 1 µg/ml		
komplex IV – Cox4 - 1 µg/ml		
komplexu V – α - 1 µg/ml		

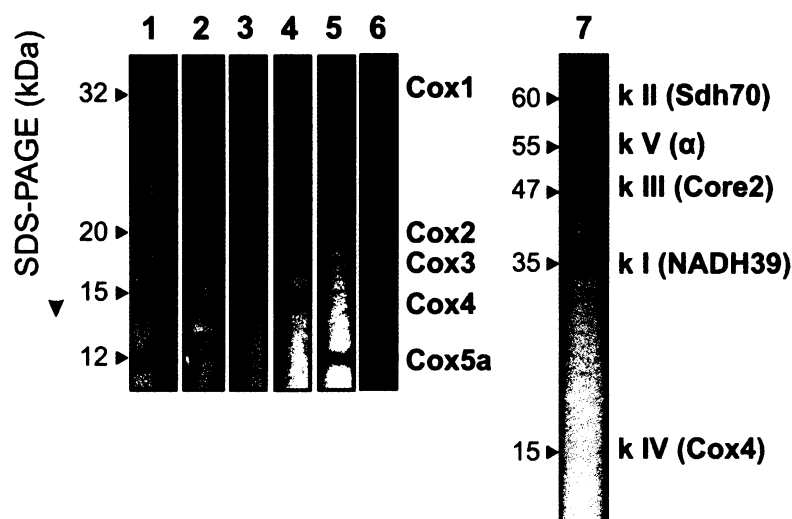
Sekundární protilátky

Tab. 3: Použité sekundární protilátky od Molecular Probes (U.S.A.).

Protilátka	Katalogové číslo	Ředění v PBST 0,3
Alexa Fluor 680 – donkey anti-goat	A21084	1:2000
Alexa Fluor 680 – goat anti-mouse	A21058	1:2000

Reaktivita jednotlivých protilátek

Reaktivita protilátek použitých při experimentech byla zkoumána na kontrolních vzorcích (LM4) dávkováním 2,5 μ g na 10% separační gel SDS-PAGE (Obr. 12).



Obr. 12: Reaktivita jednotlivých protilátek. Kontrolní LM4 vzorek byl dávkován na 10% separační gel SDS-PAGE a po elektrotransferu na PVDF membránu byla provedena imunodetekce jednotlivými protilátkami. 1 – směs monoklonálních protilátek proti podjednotkám Cox1, Cox2, Cox4 a Cox5a komplexu IV (ředění viz Tab. 2); 2 – 5 stejné monoklonální protilátky jako v 1, použité zvlášť: 2 – protilátka proti podjednotce Cox1 komplexu IV (ředění 1:1000); 3 – protilátka proti podjednotce Cox2 komplexu IV (ředění 1:1000); 4 – protilátka proti podjednotce Cox4 komplexu IV (ředění 1:250); 5 – protilátka proti podjednotce Cox5a komplexu IV (ředění 1:1000). 6 – polyklonální protilátka proti podjednotce Cox3 komplexu IV (ředění 1:200). 7 – OXPHOS kit obsahující protilátky proti podjednotkám komplexu I (NADH39), II (Sdh70), III (Core2), IV (Cox4) a V (α). Na monoklonální myší primární protilátky byla použita kozí sekundární (goat anti-mouse) protilátka (ředění 1:2000), na polyklonální kozí primární protilátku (proti podjednotce Cox3) byla použita oslí sekundární (donkey anti-goat) protilátka (ředění 1:2000).

Posouzení reaktivity použitých protilátek dle specifity a z kvantitativního hlediska

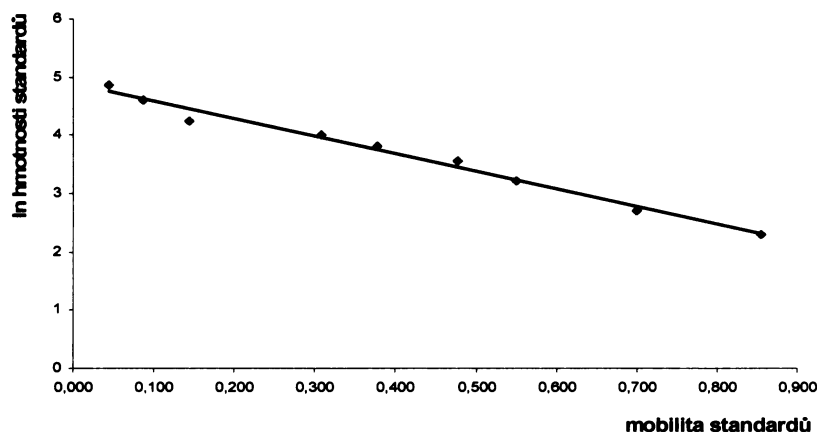
Zjištění pozice antigenu rozpoznaného protilátkou

Molekulové hmotnosti (pozice) rozpoznávaných antigenů byly stanoveny výpočtem z lineární závislosti výnosu mobilit a molekulových hmotností standardů. Standardy i kontrolní vzorky byly dávkovány na 10% separační gel SDS-PAGE. Proteiny reagující s příslušnými specifickými protilátkami vykazovaly mobilitu odpovídající předpokládaným molekulovým hmotnostem zjištěným dle aminokyselinových sekvencí jednotlivých proteinů (Tab. 4, Obr. 13).

Tab. 4: Porovnání zjištěných hmotností podjednotek savčí cytochrom *c* oxidasy s vypočtenými.

Podjednotky savčí COX	Hmotnost (kDa)	Vypočtená* hodnota (kDa)
Cox1	35	32,8
Cox2	26	19,0
Cox3	22	16,1
Cox4	18	14,4
Cox5a	12	11,8

* výpočty viz Příloha

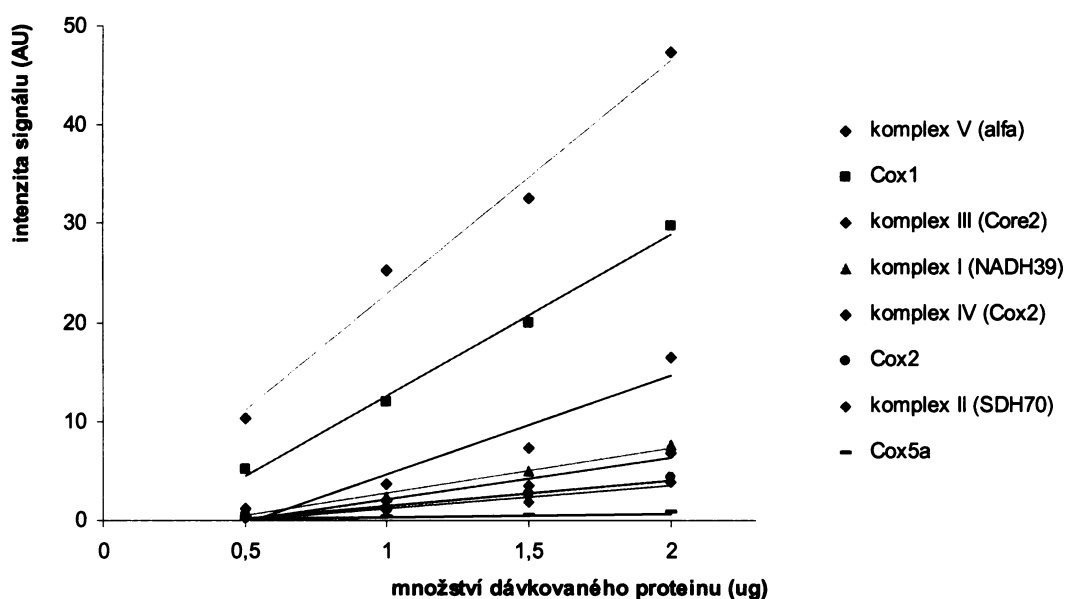


Obr. 13: Závislost mezi mobilitou a hmotností standardů migrujících v 10% separačním minigelu při SDS-PAGE. Na osu x byla vynesena mobilita jednotlivých standardů (relativní), na osu y přirozený logaritmus hodnot hmotností standardů. Z rovnice lineární regrese ($y = - 3,0185x + 4,8918$) byly vypočteny hodnoty kDa jednotlivých podjednotek dle jejich mobilit ve stejném gelu.

Kvantitativní závislost mezi dávkovaným a detekovaným antigenem při analýze Western blotem

Do jaké míry je analýza Western blotu spojeného s imunodetekcí proteinů specifickými protilátkami kvantitativní bylo stanoveno pomocí SDS-PAGE, dávkována byla koncentrační řada kontrolního vzorku 0,5 – 2,0 μg proteinu na 10% separační gel. Detekce imunokomplexů byla provedena protilátkami proti komplexu I (NADH39), komplexu II (Sdh70), komplexu III (Core2), komplexu IV (Cox2) a V (α) a protilátkami proti podjednotkám Cox1, Cox2 a Cox5a. Kvantifikace byla provedena v programu AIDA (viz níže) (Obr. 14). Jednotlivé protilátky vykazují rozdílnou citlivost proti antigenům a kvantitativní odpověď v rozmezí 0,5 – 2,0 μg aplikovaného mitochondriálního proteinu. V dané oblasti analyzovaného množství mitochondriálního proteinu lze považovat analýzu Western blotu za přijatelně kvantitativní. Může postihnout rozdíly v jednotlivých analyzovaných systémech.

Nejcitlivější je systém pro detekci podjednotky α komplexu V, ostatní protilátky byly méně citlivé, ale přesto vhodné k použití při imunodetekci.



Obr. 14: Závislost intenzity signálu (AU) rozpoznávaného antigenu detekovaného jednotlivými protilátkami na množství dávkovaného proteinu kontrolních vzorků. Dávkováno bylo 0,5 – 2,0 μg proteinu kontrolního vzorku, imunodetekce po elektrotransferu na PVDF membránu byla provedena protilátkami proti podjednotkám komplexu IV – Cox1, Cox2 a Cox5a, a směsí protilátek proti systému OXPHOS (komplex I – V) – použity byly koncentrace protilátek tak jak předepisuje výrobce a jak byly použity v dalších experimentech. Nejcitlivější je systém detekce pro podjednotku α komplexu V a podjednotku Cox1 komplexu IV, pro ostatní podjednotky je méně citlivý, ale vhodný k použití. Systém je vhodný (kvantitativní) i pro detekci vyšších koncentrací proteinu (není ukázáno).

3.2.9 Detekce signálu rozpoznaného antigenu pomocí Odyssey

Fluorescenční skener Odyssey obsahuje diodový laser, který snímá emisi fluorescenčního záření v infračervené oblasti (700 nm). Využívá fluorofor Alexa Fluor 680, navázaný na použitých sekundárních protilátkách (excitační vlnová délka 680 nm). Spojení detekce fluoroforem Alexa Fluor 680 se systémem Odyssey poskytuje při měření prakticky lineární rozsah se stoupající reprodukcibilitou v rozmezí několika řádů [121].

3.2.10 Barvení gelů

Příprava roztoků

barvicí roztok – 440 mg Coomassie Brilliant Blue R250, 400 ml 100% methanolu,
80 ml 99% kyseliny octové, přidáno do 400 ml H₂O

odbarvovací roztok – 250 ml 100% methanolu, 80 ml 99% kyseliny octové, přidáno
do 650 ml H₂O

Postup: Proužky s rozdělenými standardy po 1. rozměru (BN-PAGE) jsem po elektroforéze pro zviditelnění inkubovala 30 min v barvicím roztoku. Poté jsem proužky 3x 20 min inkubovala v odbarvovacím roztoku, opláchla v H₂O a skenovala (Scanner CanoScan). Takto zpracované standardy byly použity k přiřazení molekulových hmotností jednotlivým proteinům detekovaným na PVDF membránách po SDS elektroforéze (2. rozměr).

3.2.11 Stripování PVDF membrán

stripovací roztok – 2 % SDS, 62,5 mM Tris; 100 mM 2-merkaptoethanol – přidán
těsně před použitím; pH 6,8

Postup: Z PVDF membrány jsem po imunodetekci odstranila navázané protilátky inkubací v 50 ml stripovacího roztoku v 60 °C lázni 60 min za stálého třepání v uzavřených plastových vaničkách. Pak jsem je 3x 10 min oplachovala v PBS a blokovala v 10% mléku – dále viz postup při imunodetekci.

3.2.12 Vyhodnocování výsledků

Kvantifikace membrán po imunodetekci a skenování přístrojem Odyssey byla provedena v programu Advanced Image Data Analyzer (AIDA verze 3.21.001).

Výsledky byly zpracovány v programu Adobe Photoshop Elements (verze 0.5), CorelDRAW X3 (verze 13.0.0.576) a Microsoft Excel 2002 (verze 10.6841.6839).

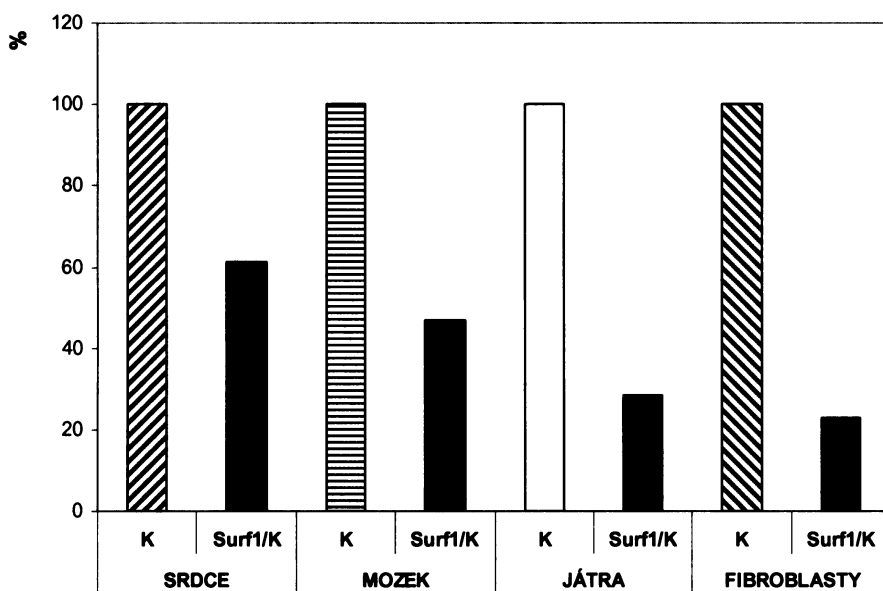
4 VÝSLEDKY

4.1 COX DEFICIENCE NA PODKLADĚ VYŘAZENÍ GENU *SURF1*

Knock-out genu *SURF1* představuje zatím nejvýznamnější zvířecí model COX deficiencie vyvolané absencí COX-specifického asemblačního faktoru. Protože se myší fenotyp podstatně liší od lidského onemocnění, zaměřili jsme se na charakterizaci asemblačních intermediátů COX v myších tkáních se *SURF1* knock-outem.

4.1.1 Kvantitativní analýza myších tkání

V programu AIDA bylo provedeno kvantitativní vyhodnocení intenzity signálu antigenu komplexu IV detekovaného protilátkou proti podjednotce Cox1 (na membránách z dvourozměrné elektroforézy) v kontrolních vzorcích a tkáních *Surf1*^{-/-} myši. V srdečních mitochondriích byl proti kontrole obsah COX snížený na 61,3 %, v mozkových mitochondriích na 47,0 %, v jaterních mitochondriích na 28,4 % a v mitochondriích kultivovaných fibroblastů na 30 %. Nejvíce byl obsah COX snížený v jaterní tkáni a fibroblastech, nejméně v tkáni srdeční (Obr. 15).



Obr. 15: Intenzita signálu komplexu COX, detekovaného protilátkou proti podjednotce Cox1, zkoumaných tkání (*Surf1*) vztažená na 100 % intenzity signálu kontrolního vzorku (K). Po BN-PAGE/SDS-PAGE a elektrotransféru byla na PVDF membránách provedena imunodetekce protilátkou proti podjednotce Cox1, kterou byl detekován komplex IV. Poté byl rozpoznán antigen kvantitativně vyhodnocen v programu AIDA a hodnoty intenzit vztaženy na 100 % hodnoty kontrolních vzorků (K). Oproti kontrolním tkáním byl obsah COX u všech defektních tkání (*Surf1*/K) snížený.

4.1.2 Analýza myších tkání dvourozměrnou elektroforézou

Pomocí dvourozměrné elektroforézy BN-PAGE/SDS-PAGE jsme zjišťovali, zda-li absence proteinu Surfl v myších tkáních ovlivňuje asemblaci COX na úrovni intermediátů oproti kontrolním myším tkáním. Z jednotlivých myších tkání zvířat s knock-outem a kontrolních zvířat byly izolovány mitochondrie a solubilizovány lauroylmaltosidem (LM4). BN vzorky takto zpracovaných mitochondrií byly v prvním rozměru analyzovány (separovány) na BN-PAGE a to vždy 15 µg proteinu. Poté byly jednotlivé proteiny z 1. rozměru separovány ve 2. rozměru na SDS-PAGE. Elektroforéza ve 2. rozměru vedla k rozpadu komplexů na jednotlivé podjednotky. Po elektrotransferu proteinů na PVDF membránu byly jednotlivé podjednotky detekovány specifickými protilátkami proti podjednotce Cox1, Cox2, Cox4 a Cox5a.

U srdeční tkáně (Obr. 16) byl detekován holoenzym COX (monomer, 205 kDa), dimer COX (440 kDa) a superkomplex (600 kDa) u kontroly i Surfl^{-/-}. Ve zkoumaném vzorku Surfl^{-/-} bylo oproti kontrole viditelné snížení obsahu asemblovaného holoenzymu komplexu IV, dimeru COX i superkomplexu detekovaného protilátkou proti podjednotce Cox1, zvýšené množství intermediátu obsahujícího podjednotku Cox1 (57 – 67 kDa) a dále částečné hromadění intermediátu obsahujícího podjednotku Cox5a (60 kDa). Na úrovni intermediátů protilátky proti jiným podjednotkám nereagovaly.

U jaterní tkáně (Obr. 17) byl detekován holoenzym COX (monomer, 205 kDa), dimer COX (440 kDa) a superkomplex (600 kDa). Viditelný byl snížený obsah asemblovaného komplexu IV, dimeru COX i superkomplexu detekovaného protilátkou proti podjednotce Cox1 ve vzorku Surfl^{-/-} oproti kontrole. Na úrovni intermediátů nereagovala žádná z dalších použitých protilátek.

U mozkové tkáně (Obr. 18) byl detekován holoenzym COX (205 kDa), dimer COX (440 kDa) a superkomplex (720 kDa). Viditelný byl snížený obsah asemblovaného komplexu IV, dimeru COX i superkomplexu detekovaného protilátkou proti podjednotce Cox1 u defektních myši (Surfl^{-/-}) oproti kontrole a dále zvýšené množství intermediátu obsahujícího podjednotku Cox1 (67 kDa). V mozkových mitochondriích nebyla detekována přítomnost intermediátu obsahujícího podjednotku Cox5a a na úrovni intermediátů protilátky proti jiným podjednotkám také nereagovaly.

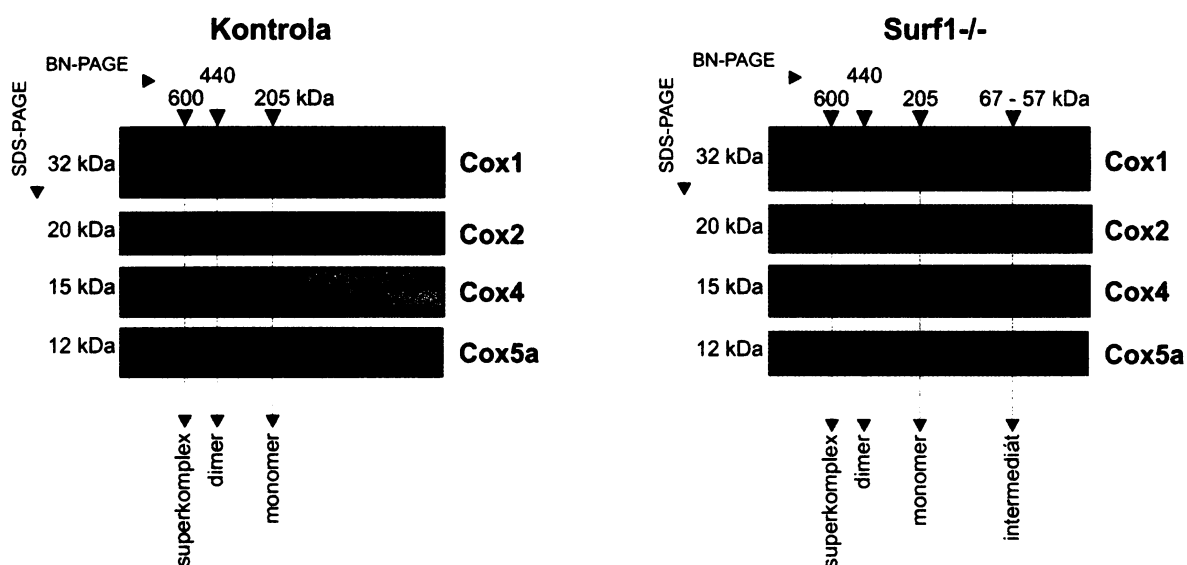
U kultivovaných fibroblastů (Obr. 19) byl detekován holoenzym COX (monomer, 205 kDa) a dimer COX (440 kDa) u Surfl^{-/-} i kontroly. Superkomplex o hmotnosti 680 kDa byl detekován pouze u kontroly. U Surfl^{-/-} byl oproti kontrole viditelný snížený obsah asemblovaného komplexu IV i dimeru COX detekovaného protilátkou proti podjednotce Cox1. U fibroblastů bylo nejvíce patrné snížení COX, a dále zvýšené množství intermediátů

obsahujících Cox1 (55 – 70 kDa, intermediát 1 a 2) a Cox5a (33 kDa, intermediát 3). Na úrovni intermediátů k reakci antigenu s protilátkami proti jiným podjednotkám nedošlo. Protilátka proti podjednotce Cox4 reagovala slabě s holoenzymem u kontroly, u vzorku *Surf1*^{-/-} nereagovala vůbec.

Pomocí dvourozměrných analýz byly u všech myších tkání detekovány podjednotky Cox1, 2, 4 a 5a ve vzorcích *Surf1*^{-/-} i kontroly kromě fibroblastů, kde byla detekce protilátkou proti podjednotce Cox4 pozitivní pouze u kontroly. U všech tkání s knock-outem genu *SURF1* pozorujeme ve srovnání s kontrolou snížené množství asemblovaných forem COX a naopak hromadění intermediátů obsahujících podjednotku Cox1. Nejvýrazněji dochází k hromadění Cox1 intermediátů v myších fibroblastech a srdeční tkáni, méně pak v mozkové tkáni a vůbec v jaterní. Ve fibroblastech a částečně také v srdeční tkáni dochází k hromadění intermediátů obsahujících podjednotku Cox5a. Podjednotky Cox2 a Cox4 byly detekovány pouze v holoenzymu a částečně v dimeru COX a superkomplexech, intermediáty obsahující tyto podjednotky nebyly detekovány.

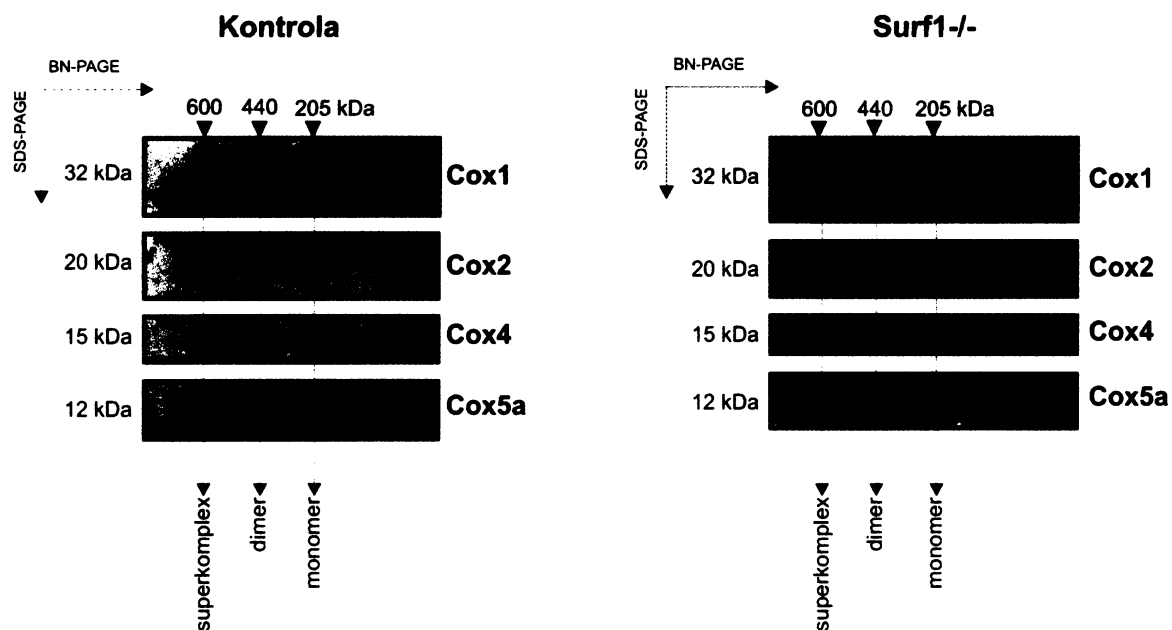
V srdeční a jaterní tkáni byl detekován superkomplex o stejné hmotnosti (600 kDa), kdežto v mozkové tkáni a fibroblastech byl detekován jiný superkomplex. Ve fibroblastech *Surf1*^{-/-} nebyl detekovaný žádný superkomplex.

MYŠÍ SRDEČNÍ TKÁŇ



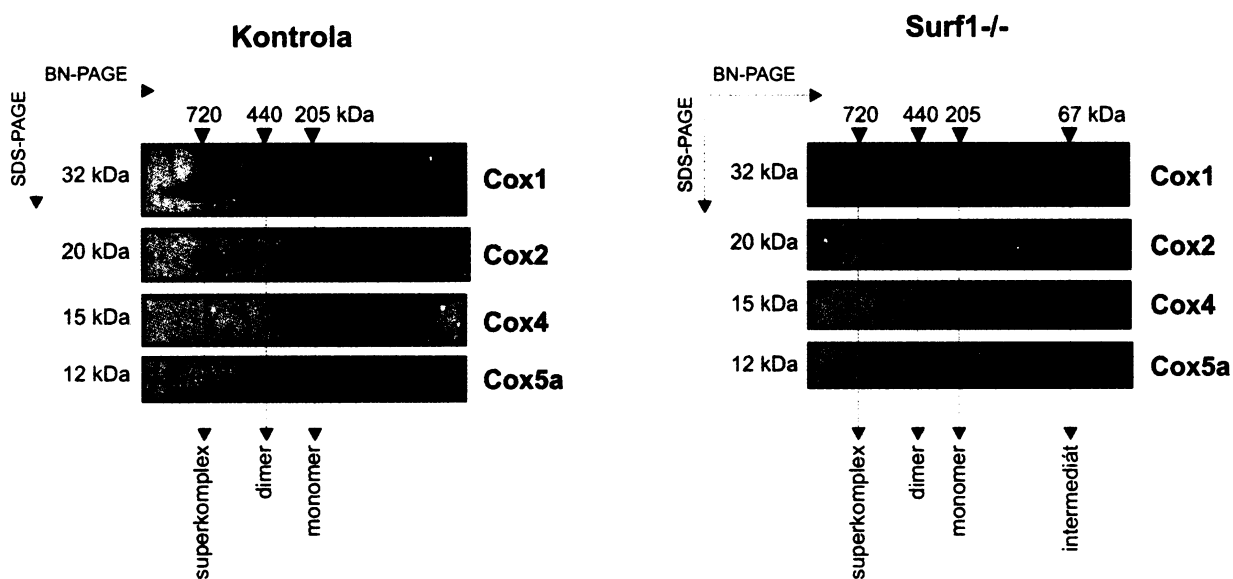
Obr. 16: Dvourozměrná elektroforéza BN-PAGE/SDS-PAGE myších srdečních mitochondrií. Vzorky kontrolních (**Kontrola**) a *SURF1* deficientních (**Surf1^{-/-}**) myších srdečních mitochondrií byly solubilizovány lauroylmaltosidem (LM4), v prvním rozměru bylo na 6 – 18% separační minigel vertikální BN-PAGE dávkováno 15 μ g proteinu. Druhý rozměr byl proveden na 10% separačním minigelu SDS-PAGE. Po elektrotransferu byla na PVDF membránách provedena imunodetekce protilátkami proti podjednotkám komplexu IV: Cox1, Cox2, Cox4 a Cox5a.

MYŠÍ JATERNÍ TKÁŇ



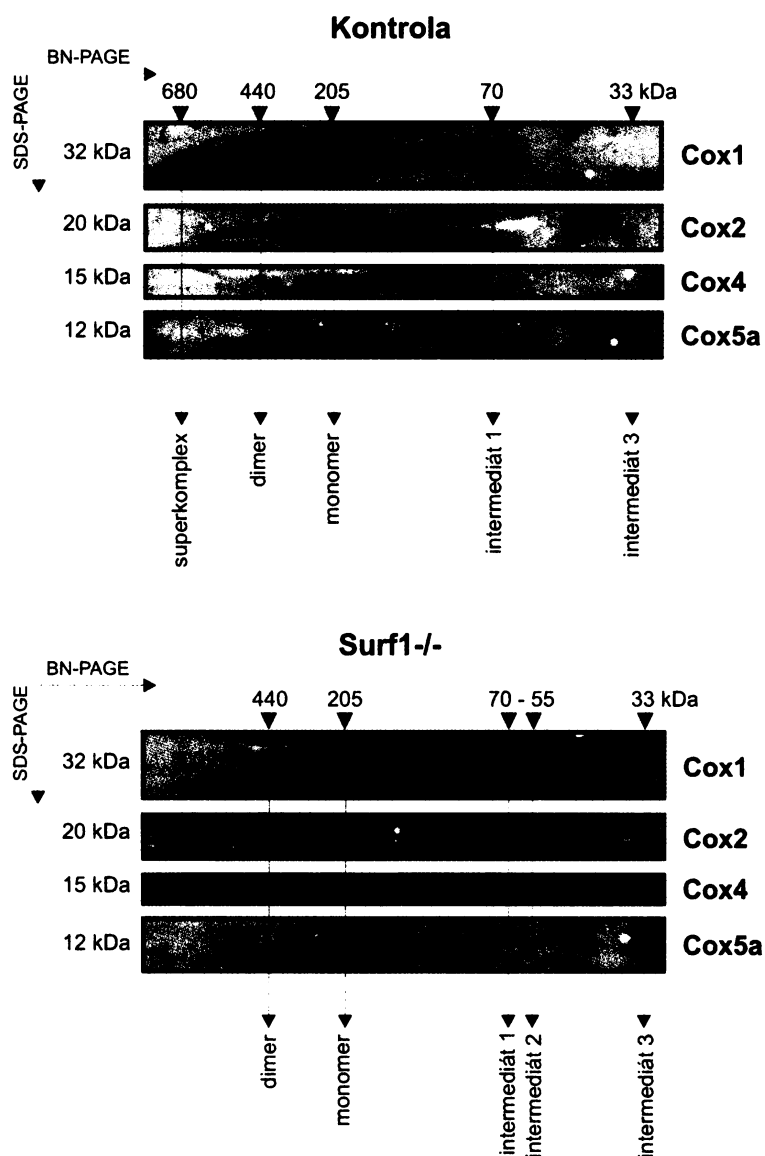
Obr. 17: Dvourozměrná elektroforéza BN-PAGE/SDS-PAGE myších jaterních mitochondrií. Vzorky kontrolních (Kontrola) a *SURF1* deficientních (*Surf1*^{-/-}) myších jaterních mitochondrií byly solubilizovány lauroylmaltosidem (LM4), v prvním rozměru bylo na 6 – 18% separační minigel vertikální BN-PAGE dávkováno 15 μ g proteinu. Druhý rozměr byl proveden na 10% separačním minigelu SDS-PAGE. Po elektrotransferu byla na PVDF membránách provedena imunodetekce protilátkami proti podjednotkám komplexu IV: Cox1, Cox2, Cox4 a Cox5a.

MYŠÍ MOZKOVÁ TKÁŇ



Obr. 18: Dvourozměrná elektroforéza BN-PAGE/SDS-PAGE myších mozkových mitochondrií. Vzorčky kontrolních (**Kontrola**) a *SURF1* deficientních (**Surf1^{-/-}**) myších mozkových mitochondrií byly solubilizovány lauroylmaltosidem (LM4), v prvním rozměru bylo na 6 – 18% separační minigel vertikální BN-PAGE dávkováno 15 µg proteinu. Druhý rozměr byl proveden na 10% separačním minigelu SDS-PAGE. Po elektrotransferu byla na PVDF membránách provedena imunodetekce protilátkami proti podjednotkám komplexu IV: Cox1, Cox2, Cox4 a Cox5a.

MYŠÍ FIBROBLASTY



Obr. 19: Dvourozměrná elektroforéza BN-PAGE/SDS-PAGE mitochondrií myších kultivovaných fibroblastů. Vzorky kontrolních (Kontrola) a *SURF1* deficientních (*Surf1^{-/-}*) mitochondrií z myších fibroblastů byly solubilizovány lauroylmaltosidem (LM4), v 1. rozměru bylo na 6 – 18% separační minigel vertikální BN-PAGE dávkováno 15 μ g proteinu. Druhý rozměr byl proveden na 10% separačním minigelu SDS-PAGE. Po elektrotransferu byla na PVDF membránách provedena imunodetekce protilátkami proti podjednotkám komplexu IV: Cox1, Cox2, Cox4 a Cox5a.

4.2 COX DEFICIENCE NA PODKLADĚ mtDNA MIKRODELECE V GENU *ATP6/COX3*

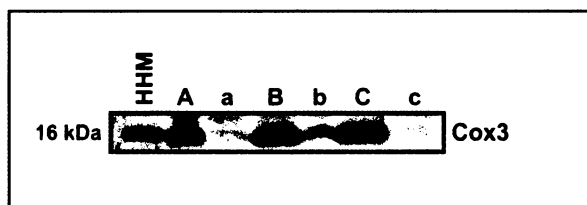
Maternálně přenášená mtDNA mikrodelece 9205delTA představuje unikátní model kombinovaného defektu ATP synthasy a COX vyvolaného snížením resp. nedostatečnou maturací mRNA pro podjednotku Atp6 ATP synthasy a podjednotku Cox3 cytochrom *c* oxidasy. Protože se dosud nepodařilo prokázat defekt Cox3 na úrovni proteinu, zaměřili jsme se na objasnění změn v obsahu podjednotky Cox3 a na charakterizaci asemblačních intermediátů COX.

4.2.1 Imunodetekce podjednotky Cox3

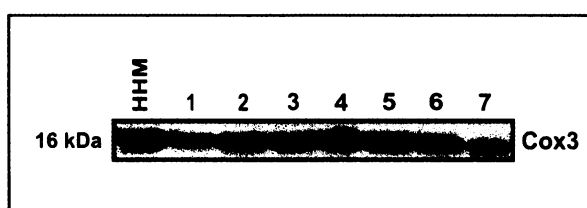
K dispozici jsme měli dvě protilátky proti podjednotce Cox3 (monoklonální od Mitosciences, a polyklonální od Santa Cruz Biotechn.), které v systému PAGE/Western blot s pomocí standardně připravených vzorků nereagovaly. Protože některé proteiny ztrácejí antigenní reaktivitu po termální denaturaci a/nebo působením SH-redukčních činidel, s pomocí polyklonální primární protilátky proti podjednotce Cox3 (Santa Cruz Biotechnology) a vzorků RHM (Rat Heart Mitochondria) jsme testovali vliv redukčních činidel (DTT a 2-merkapt ethanolu) ve vzorkovém pufru a vliv teploty disociace v SDS (Obr. 20, 21).

V povařených vzorcích nebyla podjednotka Cox3 detekována, v nepovařených vzorcích byla detekována ve vzorku připraveném s DTT i s 2-merkapt ethanolem (Obr. 20). Další analýza ukázala, že kritická je teplota opracování vzorku nad 55 °C, u vzorků připravených v 75 °C a 90 °C se již detekovaný signál snižoval (Obr. 21).

Zjistili jsme, že pro imunodetekci polyklonální protilátkou proti podjednotce Cox3 je kritická teplota opracování vzorku, zatímco přítomnost SH-redukčních činidel nevádí.



Obr. 20: Zkoumání podmínek reaktivity polyklonální primární protilátky proti podjednotce Cox3 – vliv SH-redukčních činidel. Z mitochondrií RHM (24,8 mg/ml) bylo odebráno 3x 10 µl, které byly upraveny na SDS vzorek odlišným způsobem: roztokem SLB_{DTT} (62,5 µl a 52,5 µl H₂O), SLB (62,5 µl a 52,5 µl H₂O) a SLB 1x (115 µl naředěné z SLB 3x). Takto připravené vzorky byly rozděleny napůl, jedna polovina (A, B, C) byla ponechána za laboratorní teploty, druhá polovina (a, b, c) byla povařena 5 min při 100 °C. Poté bylo na 10% separační minigel SDS-PAGE dávkováno vždy 20 µg každého vzorku, 5 µg pozitivní kontroly HHM (Human Heart Mitochondria, Mitosciences) a markery molekulové hmotnosti (Prestained Protein Ladder). Po elektrotransferu na PVDF membránu byla provedena imunodetekce polyklonální protilátkou proti podjednotce Cox3.



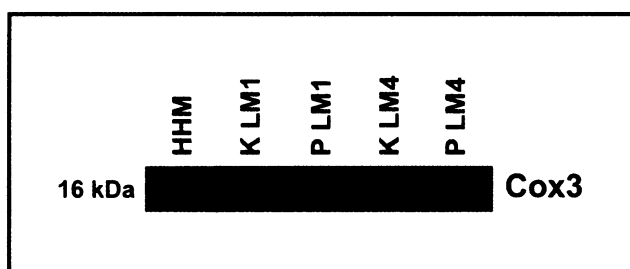
Obr. 21: Zkoumání podmínek reaktivity polyklonální primární protilátky proti podjednotce Cox3 – vliv teploty opracování SDS vzorku. Vzorky byly analyzovány na SDS-PAGE (10% separační minigel). Z RHM (24,8 mg/ml) bylo připraveno pět SDS vzorků roztokem SLB 1x (s DTT): vždy bylo odebráno 5 µl suspenze o koncentraci 24,8 mg/ml a přidáno 100 µl SLB 1x. První SDS vzorek byl ponechán za laboratorní teploty a dávkováno bylo 2,5, 5 a 10 µg proteinu na separační gel (1, 2 a 3); druhý SDS vzorek byl zahříván 5 min při 40 °C a dávkováno bylo 10 µg na separační gel (4); třetí SDS vzorek byl zahříván 5 min při 55 °C a dávkováno bylo 10 µg na separační gel (5); čtvrtý SDS vzorek byl zahříván 5 min při 75 °C a pátý 5 min při 90°C a dávkováno bylo 10 µg na separační gel (6, 7). Pozitivní kontroly HHM bylo dávkováno 10 µg. Po skončení elektroforézy byl proveden Western blot na PVDF membránu a imunodetekce polyklonální protilátkou proti podjednotce Cox3.

4.2.2 Detekce množství podjednotky Cox3 u pacienta

Pomocí vertikální SDS-PAGE na minigelech bylo porovnáváno množství podjednotky Cox3 ve vzorcích kultivovaných fibroblastů pacienta a kontroly.

Z kultivovaných fibroblastů kontroly a pacienta byly izolovány mitochondrie a ty následně solubilizovány lauroylmaltosidem (LM1 a LM4). SDS vzorky byly připraveny v roztoku SLB 2x, ponechány 15 min za laboratorní teploty a pak dávkovány na 10% separační minigel SDS-PAGE. Dávkovány byly: HHM (pozitivní kontrola, 5 µg), kontrolní vzorky (K LM1 a K LM4 – 20 µg) a vzorky pacienta (P LM1 a P LM4 – 20 µg). Po elektrotransferu byla na PVDF membránách provedena imunodetekce polyklonální protilátkami proti podjednotce Cox3.

Obsah podjednotky Cox3 byl snížený ve vzorcích pacienta P LM1 i P LM4 oproti kontrolním vzorkům (Obr. 22), ve srovnání s kontrolou obsahovaly vzorky pacienta 25 % (P LM1) a 50 % (P LM4) podjednotky Cox3.



Obr. 22: Detekce sníženého obsahu podjednotky Cox3 ve vzorcích pacienta oproti kontrole. Z kultivovaných fibroblastů kontroly a pacienta byly izolovány mitochondrie a ty následně solubilizovány lauroylmaltosidem (LM1 a LM4). SDS vzorky byly připraveny v roztoku SLB 2x, 15 min ponechány za laboratorní teploty a dávkovány na 10% separační minigel SDS-PAGE. Dávkovány byly: HHM (pozitivní kontrola, 5 µg), kontrolní vzorky (K LM1 a K LM4 – 20 µg) a vzorky pacienta (P LM1 a P LM4 – 20 µg). Po elektrotransferu byla na PVDF membránách provedena imunodetekce polyklonální protilátkou proti podjednotce Cox3.

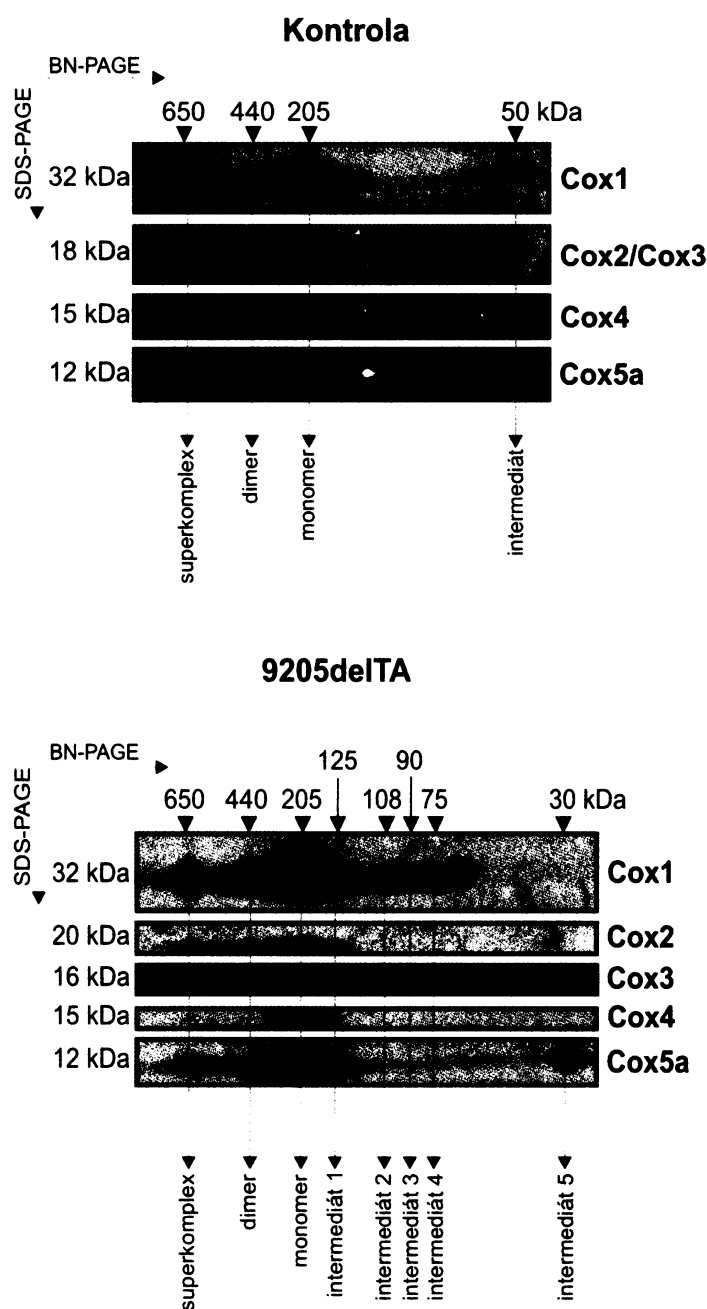
4.2.3 Analýza kultivovaných fibroblastů pacienta dvourozměrnou elektroforézou

Pomocí dvourozměrné elektroforézy BN-PAGE/SDS-PAGE jsme studovali, jakým způsobem ovlivňuje mikrodelece složení COX a její asemblaci na úrovni intermediátů oproti kontrolním fibroblastům. Z kontrolních fibroblastů a fibroblastů pacienta byly izolovány mitochondrie a solubilizovány lauroylmaltosidem (LM4). BN vzorky takto zpracovaných mitochondrií byly dávkovány na 6 – 18% separační minigel BN-PAGE v prvním rozměru a to vždy 20 µg. Poté byly jednotlivé proužky s proteiny nařezány, inkubovány 60 min v roztoku 2D-LB a aplikovány na 10% separační minigel SDS-PAGE. Výsledkem byl rozpad komplexů ve 2. rozměru na jednotlivé podjednotky. Po elektrotransferu proteinů na PVDF

membránu byla provedena detekce specifickými protilátkami proti podjednotkám Cox1, Cox2, Cox3, Cox4 a Cox5a.

Jak ukazuje Obr. 23, v obou vzorcích byl detekován holoenzym (monomer COX, 205 kDa), dimer (440 kDa) a superkomplex (650 kDa). Holoenzym obsahoval u pacienta i u kontroly podjednotku Cox3, takže v buňkách postižených mtDNA mikrodelecí 9205delTA se tvoří méně enzymu, který je ale kompletní a obsahuje Cox3. Oproti kontrole bylo ve vzorku pacienta (9205delTA) detekováno zvýšené množství antigenu na pozici 125 kDa (intermediát 1). U kontroly nebyl protilátkou proti podjednotce Cox1 detekován žádný intermediát na pozici 75, 90 a 108 kDa (intermediáty 4, 3 a 2) a protilátkou proti podjednotce Cox5a na pozici 30 kDa (intermediát 5) na rozdíl od pacienta (9205delTA). Na úrovni intermediátů k reakci antigenu s protilátkami proti jiným podjednotkám než Cox1 a Cox5a nedošlo.

LIDSKÉ FIBROBLASTY



Obr. 23: Analýza kultivovaných fibroblastů pacienta s mtDNA mikrodeleci 9205delTA dvourozměrnou elektroforézou. Nativní vzorky (LM4) kontroly (Kontrola) a pacienta (9205delTA) byly dávkovány na 6 – 18% separační minigel BN-PAGE v prvním rozměru a to vždy 20 μ g. Poté byly jednotlivé proužky s proteiny nařezány, inkubovány 60 min v roztoku 2D-LB a puštěny na 10% separační minigel SDS-PAGE. Po elektrotransferu proteinů na PVDF membránu byla provedena detekce specifickými protilátkami proti podjednotkám Cox1, Cox2, Cox3, Cox4 a Cox5a.

5 DISKUZE

Funkční cytochrom *c* oxidasa je nezbytná pro oxidaci substrátů a tvorbu ATP mitochondriálním aparátem OXPHOS. Sestavení aktivního komplexu COX vyžaduje koordinovanou asemblaci podjednotek kódovaných mitochondriálním i jaderným genomem pomocí mnoha jaderně kódovaných asemblačních a biogenetických faktorů.

Studovali jsme dva savčí modely deficiencie COX – tkáňe myši s vyřazeným (knock-outovaným) jaderně kódovaným genem *SURF1* a kultivované fibroblasty pacienta s mutací 9205delTA postihující expresi mitochondriálně kódované podjednotky Atp6 a Cox3. Pomocí elektroforetických metod jsme analyzovali rozdíly v obsahu a formách COX mezi defektními a kontrolními mitochondriemi a výsledky porovnávali s již publikovanými výsledky. Mitochondrie myších tkání a fibroblastů (*SURF1* defektních i kontrolních) i kultivovaných lidských fibroblastů (pacienta s mutací 9205delTA i kontrolních) byly solubilizovány detergentem lauroylmaltosidem, který částečně rozrušil proteinové interakce podjednotek enzymu a poté byly takto upravené vzorky srovnávány pomocí analýzy jednorozměrnou SDS-PAGE a dvourozměrnou BN-PAGE/SDS-PAGE s následným Western blotem a imunodetekcí specifickými protilátkami.

Mutace jaderných genů kódujících asemblační faktory cytochrom *c* oxidasy jsou časté příčiny poruch oxidační fosforylace. Proto je důležité odhalit, jakým způsobem je mechanismus biogeneze COX absencí proteinu Surf1 ovlivněn. To je nejlépe postihnutele právě na modelu myši s vyřazeným (knock-outovaným) genem *SURF1*, kde protein Surf1 není přítomen vůbec. Ve všech vzorcích knock-outované myši bylo detekováno snížené množství COX oproti kontrole, a to nejvýrazněji ve fibroblastech a jaterní tkáni – téměř o 70 %. U srdeční tkáňe byl obsah COX snížen o 40 % a u mozkové o 50 %. Vliv deficiencie proteinu Surf1 se tedy u těchto tkání neprojevuje stejně a naše výsledky jsou v soulasu s prací [122].

Jak již bylo uvedeno, Surf1 hraje významnou roli při asemblaci holoenzymu COX zřejmě na úrovni S2 → S3 intermediátu. U pacientů trpících LS^{COX} je sestavování holoenzymu blokováno na úrovni intermediátu S2 tvořeného podjednotkami Cox1-4-5a, což naznačuje, že Surf1 napomáhá navazování podjednotek Cox2 a 3 na heterodimer podjednotky Cox1, 4 a 5a [123].

Ve všech vzorcích mitochondrií mimo jaterních byly protilátkou proti podjednotce Cox1 detekovány asemblační intermediáty o hmotnosti 57 – 70 kDa. Tato hmotnost je příliš vysoká aby se mohlo jednat o samotnou podjednotku Cox1. Součet hmotností podjednotek Cox1 (35 kDa), Cox4 (18 kDa) a Cox5a (12kDa) je 65 kDa. Může se tedy jednat o intermediát S2, který se v tkáni *SURF1* deficientní myši kumuloval nebo o jeho částečně degradovanou

formu. Na úrovni podjednotky Cox4 nebyl ve vzorcích detekován žádný antigen. To může být způsobeno nedostatečnou reaktivitou protilátky proti podjednotce Cox4 při imunodetekci, ale i po zvýšení koncentrace protilátky nebyl antigen rozpoznán. Je možné, že systém Odyssey takto nízká množství rozpoznávaného antigenu již není schopen detekovat. Podjednotka Cox4 byla přítomna pouze v holoenzymu a vyšších strukturách enzymu, k degradaci Cox4 resp. antigenního epitopu tak zřejmě dochází dříve než k degradaci Cox1 a Cox5a, proto nelze samotnou podjednotku detekovat. Vysoká labilita nekompletně asemblované Cox4 byla pozorována i v jiných studiích [123]. Jaderně kódovaná podjednotka Cox4 savčí COX existuje ve dvou izoformách. Změna Cox4-1 izoformy na Cox4-2 izoformu není pravděpodobná, předpokládá se, že souvisí s hypoxickou regulací [124], protilátky proti podjednotce Cox4 nemusí se všemi izoformami reagovat [88]. Nemůžeme tedy zatím prokázat, jde-li o intermediát S2, nebo jiný, který obsahuje podjednotku Cox1.

V srdečních mitochondriích a fibroblastech byl protilátkou proti podjednotce Cox5a detekován protein o hmotnosti 60 kDa. Jedná se o intermediát obsahující pouze Cox5a, ale jeho hmotnost je opět příliš vysoká na samotnou podjednotku Cox5a. Intermediát musí obsahovat další protein(y), např. asemblační faktory, které nejsou součástí vlastní COX, a COX-specifické protilátky je nemohou detekovat. Problém s detekcí volné Cox5a je spojen právě s její malou hmotností (12 kDa). Pokud není navázána na jiné proteiny, je těžko detekovatelná, protože se v prvním rozměru BN-PAGE pohybuje s čelem migrujících iontů, pravděpodobně z gelu vyputuje a do druhého rozměru se nedostane.

V jaterní tkáni myši s knock-outem genu *SURF1* žádné asemblační intermediáty detekovány nebyly. To se shoduje s výsledky analýzy jaterní tkáně pacientů s mutací *SURF1* a ukazuje na velmi krátkou dobu života intermediátů COX v játrech [123].

Na vzorcích mozkových mitochondrií použité protilátky fungovaly obecně méně, takže nelze přesně říci, zda-li nebyly intermediáty detekovány kvůli nepřítomnosti antigenu, nebo kvůli snížené reaktivitě protilátek.

Ve fibroblastech byla detekce podjednotky Cox4 snižena i na úrovni holoenzymu COX, v *Surf1*^{-/-} vzorku nebyla detekována vůbec. Protilátka proti podjednotce Cox4 pravděpodobně reaguje rozdílně s různými tkáněmi (tkáňová specifita, viz výše). Obecně je kumulace intermediátů ve fibroblastech mnohonásobně vyšší, stejně tak jako v lidských buňkách [123]. Podjednotka Cox5a byla detekována ve fibroblastech a částečně v srdečních mitochondriích u kontrolní i *Surf1*^{-/-} myši, kde se hromadila.

Z našich výsledků je možné uzavřít, že kumulace asemblačních intermediátů cytochrom *c* oxidasy v důsledku mutací genu *SURF1* je tkáňově specifická. Podobně i stabilita asemblačních intermediátů je v tkáních odlišná od kultivovaných fibroblastů.

Naše studium mitochondrií s mtDNA mikrodelecí 9205delTA poprvé jasně ukázalo, že mutace vede k redukci podjednotky Cox3. Její detekce je problematická, protože pravděpodobně obsahuje tepelně labilní epitopy reagující s protilátkou. Aby bylo možné detekovat podjednotku Cox3 specifickou protilátkou, upravili jsme metodiku přípravy vzorků pro analýzu SDS-PAGE. SDS vzorky nesmí být zahřívány na teploty vyšší než 55 °C.

mtDNA mutace 9205delTA postihuje sestřihové místo mezi *ATP6* a *COX3*, primární transkript je sestřižen méně efektivně a ovlivněna je maturace mRNA pro podjednotku Atp6 ATP synthasy a podjednotku Cox3 cytochrom *c* oxidasy. Tato maternálně přenášená mikrodelece představuje unikátní model kombinovaného defektu velmi důležitých enzymů. Protilátkou proti podjednotce Cox3 bylo v solubilizovaných mitochondriích pacienta detekováno snížené množství podjednotky v LM1 vzorcích o 75 % a v LM4 vzorcích o 50 % oproti kontrole. Protože holoenzym (monomer COX) u pacienta i kontroly měl shodnou velikost a obsahoval Cox3, je zřejmé, že se netvoří enzym COX o změněném složení podjednotek (bez Cox3), ale je snížené celkové množství normálního enzymu. Protilátkou proti podjednotce Cox1 byl detekován rozdíl v asemblačním procesu COX pacienta oproti kontrole. Detekováno bylo zvýšené množství asemblačních intermediátů (jiných než u *SURF1* deficientních myších tkání). Antigen byl rozpoznán na pozici 75, 90, 108 a 125 kDa. Na pozici 125 kDa se pravděpodobně jedná o degradovanou formu COX holoenzymu nebo o největší formu intermediátu, který podjednotku Cox3 ještě neobsahuje. Na pozicích 75 – 108 kDa se jedná pravděpodobně o formy intermediátu S2. Dochází také ke kumulaci podjednotky Cox5a.

6 ZÁVĚR

Ve všech vzorcích *SURF1* deficientních myši bylo detekováno snížené množství COX oproti kontrole, ale rozdíly v obsahu enzymu naznačují, že se deficience (úplná absence) proteinu Surf1 projevuje různě v jednotlivých tkáních.

V jaterní tkáni nebyly detekovány žádné asemblační intermediáty enzymu, což se shoduje s výsledky nalezenými v jaterní tkáni pacientů trpících mutací genu *SURF1*. Ve vzorcích kultivovaných fibroblastů a mozkové a srdeční tkáně byly protilátkou proti podjednotce Cox1 komplexu IV detekovány intermediáty o hmotnosti 57 až 70 kDa, což přibližně odpovídá asemblačnímu intermediátu S2 složenému z podjednotek Cox1-4-5a (přibližně 65 kDa). Podjednotky Cox4 a 5a ale nebyly v rovině tohoto intermediátu na PVDF membráně detekovány. Podjednotka Cox5a byla detekována pouze jako součást proteinu o hmotnosti 60 kDa, nejednalo se o volnou podjednotku.

Kumulace intermediátů ve fibroblastech je vyšší než u ostatních tkání, což se shoduje s analýzou lidských fibroblastů.

Optimalizovali jsme protokol pro používání polyklonální protilátky proti podjednotce Cox3. Ve fibroblastech pacienta trpícího mtDNA mutací 9205delTA byla v solubilizovaných vzorcích detekována přítomnost monomeru COX o stejné velikosti jako ve fibroblastech kontrolních. V postižených mitochondriích se tedy tvoří plně asemblovaná COX obsahující nezměněné složení podjednotek, ale tvoří se snížené množství enzymu. Detekováno bylo i snížené množství podjednotky Cox3. Protilátkou proti podjednotce Cox1 bylo detekováno vyšší množství asemblačních intermediátů lišících se od intermediátů nalezených v myších tkáních i fibroblastech s defektem *SURF1*.

SEZNAM LITERATURY

1. Alberts, B.; Bray, D.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walker, P.: *Úvod do molekulární biologie buňky*. 4. vydání, Ústí nad Labem, Espero Publishing 1998.
2. Gray, M. W.; Burger, G.; Lang, B. F.: Mitochondrial evolution. *Science* **283**:5407, 1476-1481 (1999).
3. Frey, T. G.; Renken, C. W.; Perkins, G. A.: Insight into mitochondrial structure and function from electron tomography. *Biochim. Biophys. Acta* **1555**:1-3, 196-203. (2002).
4. Voet, D.; Voet, J. G.: *Biochemistry*. 3. vydání, New York, John Wiley & Sons, Inc. 2004.
5. Houstek, J.; Cannon, B.; Lindberg, O.: Glycerol-3-phosphate shuttle and its function in intermediary metabolism of hamster brown-adipose tissue. *European journal of biochemistry / FEBS* **54**:1, 11-18 (1975).
6. Liang, X.; Le, W.; Zhang, D.; Schulz, H.: Impact of the intramitochondrial enzyme organization on fatty acid oxidation. *Biochem. Soc. Trans.* **29**:Pt 2, 279-282. (2001).
7. Schagger, H.: Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* **1555**:1-3, 154-159 (2002).
8. Schagger, H.; de Coo, R.; Bauer, M. F.; Hofmann, S.; Godinot, C.; Brandt, U.: Significance of respirasomes for the assembly/stability of human respiratory chain complex I. *J. Biol. Chem.* **279**:35, 36349-36353 (2004).
9. Ohnishi, T.: Iron-sulfur clusters/semiquinones in complex I. *Biochim. Biophys. Acta* **1364**:2, 186-206 (1998).
10. Lehninger, A. L.; Nelson, D.; Cox, M. M.: *Lehninger Principles of Biochemistry*. Hard Cover vydání, W. H. Freeman & Co. 2000.
11. Anderson, S.; Bankier, A. T.; Barrell, B. G.; de Bruijn, M. H. L.; Coulson, A. R.; Drouin, J.; Eperon, I. C.; Nierlich, D. P.; Roe, B. A.; Sanger, F.; Schreier, P. H.; Smith, A. J. H.; Staden, R.; Young, I. G.: Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* **290**, 457-465 (1981).
12. Lightowers, R. N.; Chinnery, P. F.; Turnbull, D. M.; Howell, N.: Mammalian mitochondrial genetics: heredity, heteroplasmy and disease. *Trends Genet.* **13**:11, 450-455 (1997).
13. Taanman, J. W.: The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim. Biophys. Acta* **1410**:2, 103-123 (1999).
14. Pecina, P.: PhD Thesis *Inherited disorders of cytochrome c oxidase biogenesis*. Charles University in Prague, Prague 2007
15. Attardi, G.; Chomyn, A.; Doolittle, R. F.; Mariottini, P.; Ragan, C. I.: Seven unidentified reading frames of human mitochondrial DNA encode subunits of the respiratory chain NADH dehydrogenase. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **51**:Pt 1, 103-114 (1986).
16. Chomyn, A.; Mariottini, P.; Cleeter, M. W.; Ragan, C. I.; Matsuno Yagi, A.; Hatefi, Y.; Doolittle, R. F.; Attardi, G.: Six unidentified reading frames of human mitochondrial DNA encode components of the respiratory-chain NADH dehydrogenase. *Nature* **314**, 592-597 (1985).
17. Lemire, B. D.; Oyedotun, K. S.: The *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial succinate:ubiquinone oxidoreductase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1553**:1-2, 102-116 (2002).
18. Capaldi, R. A.; Darley-Usmar, V.; Fuller, S.; Millett, F.: Structural and functional features of the interaction of cytochrome c with complex III and cytochrome c oxidase. *FEBS Lett.* **138**:1, 1-7 (1982).
19. Deng, K.; Shenoy, S. K.; Tso, S.-C.; Yu, L.; Yu, C.-A.: Reconstitution of Mitochondrial Processing Peptidase from the Core Proteins (Subunits I and II) of

- Bovine Heart Mitochondrial Cytochrome bc₁ Complex. *J. Biol. Chem.* **276**:9, 6499-6505 (2001).
20. Fontanesi, F.; Soto, I. C.; Horn, D.; Barrientos, A.: Assembly of mitochondrial cytochrome c-oxidase, a complicated and highly regulated cellular process. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **291**:6, C1129-1147 (2006).
 21. Abramson, J.; Svensson-Ek, M.; Byrne, B.; Iwata, S.: Structure of cytochrome c oxidase: a comparison of the bacterial and mitochondrial enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* **1544**:1-2, 1-9. (2001).
 22. Poyton, R. O.; McEwen, J. E.: Crosstalk between nuclear and mitochondrial genomes. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 563-607. (1996).
 23. Kadenbach, B.; Huttemann, M.; Arnold, S.; Lee, I.; Bender, E.: Mitochondrial energy metabolism is regulated via nuclear-coded subunits of cytochrome c oxidase. *Free Radic. Biol. Med.* **29**:3-4, 211-221. (2000).
 24. Babcock, G. T.; Wikstrom, M.: Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration. *Nature* **356**, 301-309 (1992).
 25. Riistama, S.; Puustinen, A.; Garcia-Horsman, A.; Iwata, S.; Michel, H.; Wikstrom, M.: Channelling of dioxygen into the respiratory enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* **1275**:1-2, 1-4 (1996).
 26. Hosler, J. P.: The influence of subunit III of cytochrome c oxidase on the D pathway, the proton exit pathway and mechanism-based inactivation in subunit I. *Biochim. Biophys. Acta* **1655**:1-3, 332-339 (2004).
 27. Huttemann, M.; Kadenbach, B.; Grossman, L. I.: Mammalian subunit IV isoforms of cytochrome c oxidase. *Gene* **267**:1, 111-123. (2001).
 28. Chicco, A. J.; Sparagna, G. C.: Role of cardiolipin alterations in mitochondrial dysfunction and disease. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **292**:1, C33-44 (2007).
 29. Tsukihara, T.; Aoyama, H.; Yamashita, E.; Tomizaki, T.; Yamaguchi, H.; Shinzawa-Itoh, K.; Nakashima, R.; Yaono, R.; Yoshikawa, S.: The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å [see comments]. *Science* **272**:5265, 1136-1144 (1996).
 30. Capaldi, R. A.: Structure and assembly of cytochrome c oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* **280**, 252-262 (1990).
 31. Ludwig, B.; Bender, E.; Arnold, S.; Huttemann, M.; Lee, I.; Kadenbach, B.: Cytochrome C oxidase and the regulation of oxidative phosphorylation. *Chembiochem. Europ. J. Chem. Biol.* **2**:6, 392-403. (2001).
 32. Casey, R. P.; Chappell, J. B.; Azzi, A.: Limited-turnover studies on proton translocation in reconstituted cytochrome c oxidase-containing vesicles. *Biochem. J.* **182**:1, 149-156. (1979).
 33. Sigel, E.; Carafoli, E.: Quantitative analysis of the proton and charge stoichiometry of cytochrome c oxidase from beef heart reconstituted into phospholipid vesicles. *Eur. J. Biochem.* **111**:2, 299-306. (1980).
 34. Wikstrom, M.; Krab, K.; Saraste, M.: Proton-translocating cytochrome complexes. *Annu. Rev. Biochem.* **50**, 623-655. (1981).
 35. Tzagoloff, A.; Dieckmann, C. L.: PET genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **54**:3, 211-225. (1990).
 36. Herrmann, J. M.; Funes, S.: Biogenesis of cytochrome oxidase - sophisticated assembly lines in the mitochondrial inner membrane. *Gene* **354**, 43-52 (2005).
 37. Krause, K.; Lopes de Souza, R.; Roberts, D. G.; Dieckmann, C. L.: The mitochondrial message-specific mRNA protectors Cbp1 and Pet309 are associated in a high-molecular weight complex. *Mol. Biol. Cell* **15**:6, 2674-2683 (2004).
 38. Herrmann, J. M.; Neupert, W.: Protein insertion into the inner membrane of mitochondria. *IUBMB Life* **55**:4-5, 219-225 (2003).

39. Lemaire, C.; Hamel, P.; Velours, J.; Dujardin, G.: Absence of the mitochondrial AAA protease Yme1p restores F0-ATPase subunit accumulation in an *oxa1* deletion mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **275**:31, 23471-23475 (2000).
40. Szyrach, G.; Ott, M.; Bonnefoy, N.; Neupert, W.; Herrmann, J. M.: Ribosome binding to the Oxa1 complex facilitates co-translational protein insertion in mitochondria. *Embo. J.* **22**:24, 6448-6457 (2003).
41. Barros, M. H.; Tzagoloff, A.: Regulation of the heme A biosynthetic pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **516**:1-3, 119-123 (2002).
42. Beers, J.; Glerum, D. M.; Tzagoloff, A.: Purification, characterization, and localization of yeast Cox17p, a mitochondrial copper shuttle. *J. Biol. Chem.* **272**:52, 33191-33196 (1997).
43. Horng, Y. C.; Cobine, P. A.; Maxfield, A. B.; Carr, H. S.; Winge, D. R.: Specific copper transfer from the Cox17 metallochaperone to both Sco1 and Cox11 in the assembly of yeast cytochrome C oxidase. *J. Biol. Chem.* **279**:34, 35334-35340 (2004).
44. Siep, M.; van Oosterum, K.; Neufeglise, H.; van der Spek, H.; Grivell, L. A.: Mss51p, a putative translational activator of cytochrome c oxidase subunit-1 (COX1) mRNA, is required for synthesis of Cox1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **37**:4, 213-220 (2000).
45. Decoster, E.; Simon, M.; Hatat, D.; Faye, G.: The MSS51 gene product is required for the translation of the COX1 mRNA in yeast mitochondria. *Mol. Gen. Genet.* **224**:1, 111-118 (1990).
46. Barrientos, A.; Zambrano, A.; Tzagoloff, A.: Mss51p and Cox14p jointly regulate mitochondrial Cox1p expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo. J.* **23**:17, 3472-3482 (2004).
47. Herrmann, J. M.; Koll, H.; Cook, R. A.; Neupert, W.; Stuart, R. A.: Topogenesis of cytochrome oxidase subunit II. Mechanisms of protein export from the mitochondrial matrix. *J. Biol. Chem.* **270**, 27079-27086 (1995).
48. Hell, K.; Tzagoloff, A.; Neupert, W.; Stuart, R. A.: Identification of Cox20p, a novel protein involved in the maturation and assembly of cytochrome oxidase subunit 2. *J. Biol. Chem.* **275**:7, 4571-4578 (2000).
49. Papadopoulou, L. C.; Sue, C. M.; Davidson, M. M.; Tanji, K.; Nishino, I.; Sadlock, J. E.; Krishna, S.; Walker, W.; Selby, J.; Glerum, D. M.; Coster, R. V.; Lyon, G.; Scalais, E.; Lebel, R.; Kaplan, P.; Shanske, S.; De Vivo, D. C.; Bonilla, E.; Hirano, M.; DiMauro, S.; Schon, E. A.: Fatal infantile cardioencephalomyopathy with COX deficiency and mutations in SCO2, a COX assembly gene. *Nat. Genet.* **23**:3, 333-337 (1999).
50. Funes, S.; Nargang, F. E.; Neupert, W.; Herrmann, J. M.: The Oxa2 protein of *Neurospora crassa* plays a critical role in the biogenesis of cytochrome oxidase and defines a ubiquitous subbranch of the Oxa1/YidC/Alb3 protein family. *Mol. Biol. Cell* **15**:4, 1853-1861 (2004).
51. Hell, K.; Neupert, W.; Stuart, R. A.: Oxa1p acts as a general membrane insertion machinery for proteins encoded by mitochondrial DNA. *Embo. J.* **20**:6, 1281-1288 (2001).
52. Souza, R. L.; Green-Willms, N. S.; Fox, T. D.; Tzagoloff, A.; Nobrega, F. G.: Cloning and characterization of COX18, a *Saccharomyces cerevisiae* PET gene required for the assembly of cytochrome oxidase. *J. Biol. Chem.* **275**:20, 14898-14902 (2000).
53. Poyau, A.; Buchet, K.; Godinot, C.: Sequence conservation from human to prokaryotes of Surf1, a protein involved in cytochrome c oxidase assembly, deficient in Leigh syndrome. *FEBS Lett.* **462**:3, 416-420. (1999).
54. Nijtmans, L. G.; Taanman, J. W.; Muijsers, A. O.; Speijer, D.; Van den Bogert, C.: Assembly of cytochrome-c oxidase in cultured human cells. *Eur. J. Biochem.* **254**:2, 389-394 (1998).

55. Williams, S. L.; Valnot, I.; Rustin, P.; Taanman, J. W.: Cytochrome c oxidase subassemblies in fibroblast cultures from patients carrying mutations in COX10, SCO1, or SURF1. *J. Biol. Chem.* **279**:9, 7462-7469 (2004).
56. Boekema, E. J.; Braun, H. P.: Supramolecular structure of the mitochondrial oxidative phosphorylation system. *J. Biol. Chem.* **282**:1, 1-4 (2007).
57. Collinson, I. R.; Runswick, M. J.; Buchanan, S. K.; Fearnley, I. M.; Skehel, J. M.; van Raaij, M. J.; Griffiths, D. E.; Walker, J. E.: Fo membrane domain of ATP synthase from bovine heart mitochondria: purification, subunit composition, and reconstitution with F1-ATPase. *Biochemistry* **33**, 7971-7978 (1994).
58. Stock, D.; Leslie, A. G.; Walker, J. E.: Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science* **286**:5445, 1700-1705 (1999).
59. Kaminsky, P.; Escanye, J. M.; Klein, M.; Robin Lherbier, B.; Walker, P.; Robert, J.; Duc, M.: [Spectroscopy of phosphorus in nuclear magnetic resonance. General review of clinical applications to the study of human skeletal muscle]. *Rev. Med. Interne.* **12**, 128-130, 133-128 (1991).
60. Catterall, W. A.; Coty, W. A.; Pedersen, P. L.: Adenosine triphosphatase from rat liver mitochondria. 3. Subunit composition. *J. Biol. Chem.* **248**:21, 7427-7431 (1973).
61. Walker, J. E.: ATP synthesis by rotary catalysis (Nobel lecture). *Engew. Chem. Int. Ed.* **37**, 2308-2319 (1998).
62. Watts, S. D.; Zhang, Y.; Fillingame, R. H.; Capaldi, R. A.: The gamma subunit in the Escherichia coli ATP synthase complex (ECF1F0) extends through the stalk and contacts the c subunits of the F0 part. *FEBS Lett.* **368**:2, 235-238 (1995).
63. Collinson, I. R.; van Raaij, M. J.; Runswick, M. J.; Fearnley, I. M.; Skehel, J. M.; Orriss, G. L.; Miroux, B.; Walker, J. E.: ATP synthase from bovine heart mitochondria. In vitro assembly of a stalk complex in the presence of F1-ATPase and in its absence. *J. Mol. Biol.* **242**, 408-421 (1994).
64. Collinson, I. R.; Skehel, J. M.; Fearnley, I. M.; Runswick, M. J.; Walker, J. E.: The F1F0-ATPase complex from bovine heart mitochondria: the molar ratio of the subunits in the stalk region linking the F1 and F0 domains. *Biochemistry* **35**:38, 12640-12646 (1996).
65. Joshi, S.; Cao, G. J.; Nath, C.; Shah, J.: Oligomycin sensitivity conferring protein of mitochondrial ATP synthase: deletions in the N-terminal end cause defects in interactions with F1, while deletions in the C-terminal end cause defects in interactions with F0. *Biochemistry* **35**:37, 12094-12103 (1996).
66. Hundal, T.; Norling, B.; Ernster, L.: Lack of ability of trypsin-treated mitochondrial F1-ATPase to bind the oligomycin-sensitivity conferring protein (OSCP). *FEBS Lett.* **162**:1, 5-10 (1983).
67. Walker, J. E.; Lutter, R.; Dupuis, A.; Runswick, M. J.: Identification of the subunits of F1F0-ATPase from bovine heart mitochondria. *Biochemistry* **30**:22, 5369-5378 (1991).
68. Abrahams, J. P.; Leslie, A. G.; Lutter, R.; Walker, J. E.: Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* **370**, 621-628 (1994).
69. Boyer, P. D.: Catalytic site forms and controls in ATP synthase catalysis. *Biochim. Biophys. Acta* **1458**:2-3, 252-262 (2000).
70. Capaldi, R. A.; Aggeler, R.; Gilkerson, R.; Hanson, G.; Knowles, M.; Marcus, A.; Margineantu, D.; Marusich, M.; Murray, J.; Oglesbee, D.: A replicating module as the unit of mitochondrial structure and functioning. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1555**:1-3, 192-195 (2002).
71. Tsunoda, S. P.; Aggeler, R.; Yoshida, M.; Capaldi, R. A.: Rotation of the c subunit oligomer in fully functional F1Fo ATP synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**:3, 898-902 (2001).
72. Menz, R. I.; Leslie, A. G.; Walker, J. E.: The structure and nucleotide occupancy of bovine mitochondrial F(1)-ATPase are not influenced by crystallisation at high concentrations of nucleotide. *FEBS Lett.* **494**:1-2, 11-14. (2001).

73. Wang, Z. G.; White, P. S.; Ackerman, S. H.: Atp11p and Atp12p are assembly factors for the F(1)-ATPase in human mitochondria. *J. Biol. Chem.* **276**:33, 30773-30778. (2001).
74. Paul, M. F.; Barrientos, A.; Tzagoloff, A.: A single amino acid change in subunit 6 of the yeast mitochondrial ATPase suppresses a null mutation in ATP10. *J. Biol. Chem.* **275**:38, 29238-29243 (2000).
75. Houstek, J.; Andersson, U.; Tvrdik, P.; Nedergaard, J.; Cannon, B.: The expression of subunit c correlates with and thus may limit the biosynthesis of the mitochondrial F₀F₁-ATPase in brown adipose tissue. *J. Biol. Chem.* **270**, 7689-7694 (1995).
76. Mitchell, P.: Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **41**:3, 445-502 (1966).
77. Follmann, K.; Arnold, S.; Ferguson-Miller, S.; Kadenbach, B.: Cytochrome c oxidase from eucaryotes but not from procaryotes is allosterically inhibited by ATP. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **45**:5, 1047-1055. (1998).
78. Taanman, J. W.; Capaldi, R. A.: Subunit VIa of yeast cytochrome c oxidase is not necessary for assembly of the enzyme complex but modulates the enzyme activity. Isolation and characterization of the nuclear-coded gene. *J. Biol. Chem.* **268**, 18754-18761 (1993).
79. Ludwig, B.; Bender, E.; Arnold, S.; Huttemann, M.; Lee, I.; Kadenbach, B.: Cytochrome C oxidase and the regulation of oxidative phosphorylation. *Chembiochem* **2**:6, 392-403 (2001).
80. Kadowaki, T.; Kitagawa, Y.: Hypoxic depression of mitochondrial mRNA levels in HeLa cell. *Exp. Cell. Res.* **192**, 243-247 (1991).
81. Wrutniak-Cabello, C.; Casas, F.; Cabello, G.: Thyroid hormone action in mitochondria. *J. Mol. Endocrinol.* **26**:1, 67-77 (2001).
82. Hood, D. A.; Zak, R.; Pette, D.: Chronic stimulation of rat skeletal muscle induces coordinate increases in mitochondrial and nuclear mRNAs of cytochrome-c-oxidase subunits. *Eur. J. Biochem.* **179**:2, 275-280 (1989).
83. Burke, P. V.; Raitt, D. C.; Allen, L. A.; Kellogg, E. A.; Poyton, R. O.: Effects of oxygen concentration on the expression of cytochrome c and cytochrome c oxidase genes in yeast. *J. Biol. Chem.* **272**:23, 14705-14712 (1997).
84. Lenaz, G.; Baracca, A.; Carelli, V.; D'Aurelio, M.; Sgarbi, G.; Solaini, G.: Bioenergetics of mitochondrial diseases associated with mtDNA mutations. *Biochim. Biophys. Acta* **1658**:1-2, 89-94 (2004).
85. Davis, R. E.; Miller, S.; Herrnstadt, C.; Ghosh, S. S.; Fahy, E.; Shinobu, L. A.; Galasko, D.; Thal, L. J.; Beal, M. F.; Howell, N.; Parker, W. D., Jr.: Mutations in mitochondrial cytochrome c oxidase genes segregate with late-onset Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**:9, 4526-4531 (1997).
86. Lodish, H.; Berk, A.; Zipursky, S. L.; Matsudaira, P.; Baltimore, D.; Darnell, J. E.: *Molecular Cell Biology*. 4. vydání, New York, W. H. Freeman and Company 2001.
87. Houstek, J.; Mracek, T.; Vojtiskova, A.; Zeman, J.: Mitochondrial diseases and ATPase defects of nuclear origin. *Biochim. Biophys. Acta* **1658**:1-2, 115-121 (2004).
88. Bohm, M.; Pronicka, E.; Karczmarewicz, E.; Pronicki, M.; Piekutowska-Abramczuk, D.; Sykut-Cegielska, J.; Mierzewska, H.; Hansikova, H.; Vesela, K.; Tesarova, M.; Houstkova, H.; Houstek, J.; Zeman, J.: Retrospective, multicentric study of 180 children with cytochrome C oxidase deficiency. *Pediatr. Res.* **59**:1, 21-26 (2006).
89. DiMauro, S.; Zeviani, M.; Servidei, S.; Bonilla, E.; Miranda, A. F.; Prell, A.; Schon, E. A.: Cytochrome oxidase deficiency: clinical and biochemical heterogeneity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **488**, 19-32 (1986).
90. Rahman, S.; Blok, R. B.; Dahl, H. H.; Danks, D. M.; Kirby, D. M.; Chow, C. W.; Christodoulou, J.; Thorburn, D. R.: Leigh syndrome: clinical features and biochemical and DNA abnormalities. *Ann. Neurol.* **39**:3, 343-351. (1996).

91. Robinson, B. H.: Human cytochrome oxidase deficiency. *Pediatr. Res.* **48**:5, 581-585. (2000).
92. Tiranti, V.; Munaro, M.; Sandona, D.; Lamantea, E.; Rimoldi, M.; DiDonato, S.; Bisson, R.; Zeviani, M.: Nuclear DNA origin of cytochrome c oxidase deficiency in Leigh's syndrome: genetic evidence based on patient's-derived rho degrees transformants. *Hum. Mol. Genet.* **4**, 2017-2023 (1995).
93. Munaro, M.; Tiranti, V.; Sandona, D.; Lamantea, E.; Uziel, G.; Bisson, R.; Zeviani, M.: A single cell complementation class is common to several cases of cytochrome c oxidase-defective Leigh's syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **6**:2, 221-228 (1997).
94. Tiranti, V.; Hoertnagel, K.; Carrozzo, R.; Galimberti, C.; Munaro, M.; Granatiero, M.; Zelante, L.; Gasparini, P.; Marzella, R.; Rocchi, M.; Bayona-Bafaluy, M. P.; Enriquez, J. A.; Uziel, G.; Bertini, E.; Dionisi-Vici, C.; Franco, B.; Meitinger, T.; Zeviani, M.: Mutations of SURF-1 in Leigh disease associated with cytochrome c oxidase deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* **63**:6, 1609-1621 (1998).
95. Zhu, Z.; Yao, J.; Johns, T.; Fu, K.; De Bie, I.; Macmillan, C.; Cuthbert, A. P.; Newbold, R. F.; Wang, J.; Chevrette, M.; Brown, G. K.; Brown, R. M.; Shoubridge, E. A.: SURF1, encoding a factor involved in the biogenesis of cytochrome c oxidase, is mutated in Leigh syndrome. *Nat. Genet.* **20**:4, 337-343 (1998).
96. Mashkevich, G.; Repetto, B.; Glerum, D. M.; Jin, C.; Tzagoloff, A.: SHY1, the yeast homolog of the mammalian SURF-1 gene, encodes a mitochondrial protein required for respiration. *J. Biol. Chem.* **272**:22, 14356-14364. (1997).
97. Pecina, P.; Capkova, M.; Chowdhury, S. K.; Drahotka, Z.; Dubot, A.; Vojtiskova, A.; Hansikova, H.; Houstkova, H.; Zeman, J.; Godinot, C.; Houstek, J.: Functional alteration of cytochrome c oxidase by SURF1 mutations in Leigh syndrome. *Biochim. Biophys. Acta* **1639**:1, 53-63 (2003).
98. Pecina, P.; Houstkova, H.; Hansikova, H.; Zeman, J.; Houstek, J.: Genetic defects of cytochrome c oxidase assembly. *Physiol. Res.* **53 Suppl 1**, S213-223 (2004).
99. Duhig, T.; Ruhrberg, C.; Mor, O.; Fried, M.: The human Surfeit locus. *Genomics* **52**:1, 72-78. (1998).
100. Yao, J.; Shoubridge, E. A.: Expression and functional analysis of SURF1 in Leigh syndrome patients with cytochrome c oxidase deficiency. *Hum. Mol. Genet.* **8**:13, 2541-2549. (1999).
101. Tiranti, V.; Galimberti, C.; Nijtmans, L.; Bovolenta, S.; Perini, M. P.; Zeviani, M.: Characterization of SURF-1 expression and Surf-1p function in normal and disease conditions. *Hum. Mol. Genet.* **8**:13, 2533-2540 (1999).
102. Poyau, A.; Buchet, K.; Bouzidi, M. F.; Zobot, M. T.; Echenne, B.; Yao, J.; Shoubridge, E. A.; Godinot, C.: Missense mutations in SURF1 associated with deficient cytochrome c oxidase assembly in Leigh syndrome patients. *Hum. Genet.* **106**:2, 194-205. (2000).
103. Coenen, M. J.; van den Heuvel, L. P.; Nijtmans, L. G.; Morava, E.; Marquardt, I.; Girschick, H. J.; Trijbels, F. J.; Grivell, L. A.; Smeitink, J. A.: SURFEIT-1 gene analysis and two-dimensional blue native gel electrophoresis in cytochrome c oxidase deficiency. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **265**:2, 339-344 (1999).
104. Pequignot, M. O.; Dey, R.; Zeviani, M.; Tiranti, V.; Godinot, C.; Poyau, A.; Sue, C.; Di Mauro, S.; Abitbol, M.; Marsac, C.: Mutations in the SURF1 gene associated with Leigh syndrome and cytochrome c oxidase deficiency. *Hum. Mutat.* **17**:5, 374-381. (2001).
105. Lombes, A.; Nakase, H.; Tritschler, H. J.; Kadenbach, B.; Bonilla, E.; DeVivo, D. C.; Schon, E. A.; DiMauro, S.: Biochemical and molecular analysis of cytochrome c oxidase deficiency in Leigh's syndrome. *Neurology* **41**, 491-498 (1991).
106. Zimmermann, P.; Kadenbach, B.: Modified structure and kinetics of cytochrome c oxidase in fibroblasts from patients with Leigh syndrome. *Biochim. Biophys. Acta* **1180**, 99-106 (1992).

107. Possekkel, S.; Marsac, C.; Kadenbach, B.: Biochemical analysis of fibroblasts from patients with cytochrome c oxidase-associated Leigh syndrome. *Biochim. Biophys. Acta* **1316**:3, 153-159. (1996).
108. Sue, C. M.; Karadimas, C.; Checcarelli, N.; Tanji, K.; Papadopoulou, L. C.; Pallotti, F.; Guo, F. L.; Shanske, S.; Hirano, M.; De Vivo, D. C.; Van Coster, R.; Kaplan, P.; Bonilla, E.; DiMauro, S.: Differential features of patients with mutations in two COX assembly genes, SURF-1 and SCO2. *Ann. Neurol.* **47**:5, 589-595. (2000).
109. Hayasaka, K.; Brown, G. K.; Danks, D. M.; Droste, M.; Kadenbach, B.: Cytochrome c oxidase deficiency in subacute necrotizing encephalopathy (Leigh syndrome). *J. Inherit. Metab. Dis.* **12**:3, 247-256 (1989).
110. von Kleist-Retzow, J. C.; Vial, E.; Chantrel-Groussard, K.; Rotig, A.; Munnich, A.; Rustin, P.; Taanman, J. W.: Biochemical, genetic and immunoblot analyses of 17 patients with an isolated cytochrome c oxidase deficiency. *Biochim. Biophys. Acta* **1455**:1, 35-44. (1999).
111. Wasniewska, M.; Karczarewicz, E.; Pronicki, M.; Piekutowska-Abramczuk, D.; Zablocki, K.; Popowska, E.; Pronicka, E.; Duszynski, J.: Abnormal calcium homeostasis in fibroblasts from patients with Leigh disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **283**:3, 687-693. (2001).
112. Dell'agnello, C.; Leo, S.; Agostino, A.; Szabadkai, G.; Tiveron, C.; Zulian, A.; Prella, A.; Roubertoux, P.; Rizzuto, R.; Zeviani, M.: Increased longevity and refractoriness to Ca²⁺-dependent neurodegeneration in Surf1 knockout mice. *Hum. Mol. Genet.* **16**:4, 431-444 (2007).
113. Seneca, S.; Abramowicz, M.; Lissens, W.; Muller, M. F.; Vamos, E.; de Meirleir, L.: A mitochondrial DNA microdeletion in a newborn girl with transient lactic acidosis. *J. Inherit. Metab. Dis.* **19**:2, 115-118 (1996).
114. Fornuskova, D.; Tesarova, M.; Hansikova, H.; Zeman, J.: New mtDNA mutation 9204delTA in a family with mitochondrial encephalopathy and ATPsynthase defect. *Cas. Lek. Cesk.* **142**:5, 313 (2003).
115. Jesina, P.; Tesarova, M.; Fornuskova, D.; Vojtiskova, A.; Pecina, P.; Kaplanova, V.; Hansikova, H.; Zeman, J.; Houstek, J.: Diminished synthesis of subunit a (ATP6) and altered function of ATP synthase and cytochrome c oxidase due to the mtDNA 2 bp microdeletion of TA at positions 9205 and 9206. *Biochem. J.* **383**:Pt 3, 561-571 (2004).
116. Bradford, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254 (1976).
117. Schagger, H.; von Jagow, G.: Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**, 368-379 (1987).
118. Klement, P.; Nijtmans, L. G.; Van den Bogert, C.; Houstek, J.: Analysis of oxidative phosphorylation complexes in cultured human fibroblasts and amniocytes by blue-native-electrophoresis using mitoplasts isolated with the help of digitonin. *Anal. Biochem.* **231**:1, 218-224 (1995).
119. Schagger, H.; Cramer, W. A.; von Jagow, G.: Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal. Biochem.* **217**:2, 220-230. (1994).
120. Schagger, H.; von Jagow, G.: Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* **199**, 223-231 (1991).
121. Schutz-Geschwender, A., et al: Quantitative, Two-Color Western Blot Detection With Infrared Fluorescence. *LI-COR Biosciences*, 1-7 (2004).
122. Agostino, A.; Invernizzi, F.; Tiveron, C.; Fagiolari, G.; Prella, A.; Lamantea, E.; Giavazzi, A.; Battaglia, G.; Tatangelo, L.; Tiranti, V.; Zeviani, M.: Constitutive

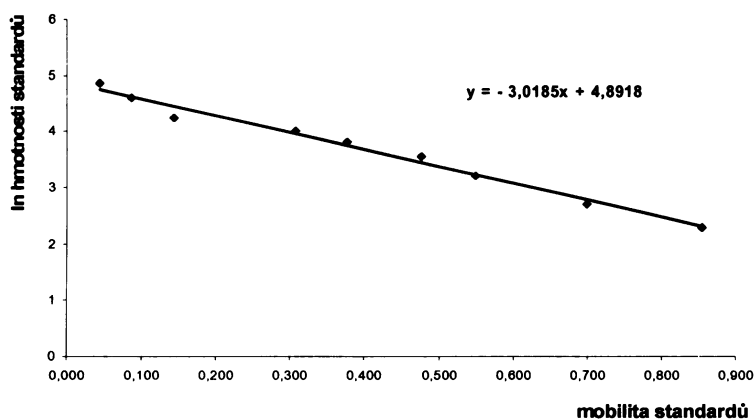
- knockout of Surf1 is associated with high embryonic lethality, mitochondrial disease and cytochrome c oxidase deficiency in mice. *Hum. Mol. Genet.* **12:4**, 399-413 (2003).
123. Stiburek, L.; Vesela, K.; Hansikova, H.; Pecina, P.; Tesarova, M.; Cerna, L.; Houstek, J.; Zeman, J.: Tissue-specific cytochrome c oxidase assembly defects due to mutations in SCO2 and SURF1. *Biochem. J.* **392**:Pt 3, 625-632 (2005).
124. Fukuda, R.; Zhang, H.; Kim, J. W.; Shimoda, L.; Dang, C. V.; Semenza, G. L.: HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell* **129**:1, 111-122 (2007).

Příloha – Zjištění pozice antigenu rozpoznaného jednotlivými specifickými protilátkami

Pozice (molekulová hmotnost) antigenu rozpoznaného specifickou protilátkou byla zjištěna výpočtem z regresní rovnice závislosti mobility proteinů na jejich hmotnosti (Tab. 5). Standardy i kontrolní vzorky byly dávkovány na 10% separační minigel SDS-PAGE.

Tab. 5: Hodnoty mobilit standardů (bezrozměrné) a zlogaritmovaných hmotností standardů vynesené do grafu Obr. 13.

standardy	mobilita standardů	hmotnost standardů (kDa)	hodnoty ln hmotnosti standardů
1	0,04	130	4,87
2	0,09	100	4,61
3	0,14	70	4,25
4	0,31	55	4,01
5	0,38	45	3,81
6	0,48	35	3,56
7	0,55	25	3,22
8	0,70	15	2,71
9	0,86	10	2,30



Obr. 13: Závislost mezi mobilitou a hmotností standardů migrujících v 10% separačním minigelu při SDS-PAGE. Na osu x byla vynesena mobilita jednotlivých standardů (relativní), na osu y přirozený logaritmus hodnot hmotností standardů. Z rovnice lineární regrese ($y = - 3,0185x + 4,8918$) byly vypočteny hodnoty kDa jednotlivých podjednotek dle jejich mobilit ve stejném gelu.

Z rovnice lineární regrese byly vypočteny hmotnosti podjednotek komplexu IV (Tab. 6):

$$y = -3,0185x + 4,8918$$

y....hodnota ln hmotnosti proteinu

x....mobilita proteinu

pro Cox1: $x = 0,46$

$$y = -3,0185 \cdot 0,464 + 4,8918$$

$$y = 3,49$$

$$e^{3,49} = 32,83 \text{ (kDa)}$$

- analogicky vypočteno pro ostatní podjednotky

Tab. 6: Vypočtené hmotnosti podjednotek savčí cytochrom c oxidasy.

Podjednotky savčí COX	mobilita	výpočet hodnot hmotností (kDa) z rovnice lin. regrese
Cox1	0,46	32,83
Cox2	0,65	18,95
Cox3	0,70	16,10
Cox4	0,74	14,36
Cox5a	0,80	11,76