Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Speciální chemicko-biologické obory
Molekulární biologie a biochemie organismů

Tereza Daňhelovská

Systém oxidativní fosforylace a metody analýzy jeho funkce

System of oxidative phosphorylation and methods for its functional analysis

Bakalářská práce

Školitelka: Ing. Markéta Tesařová, Ph.D.

Praha, 2014

Laboratoř pro studium mitochondriálních poruch

Klinika dětského a dorostového lékařství 1. LF UK a VFN

Ke Karlovu 2, Praha 2

Prohlášení:

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

V Praze, 15. 5. 2014

Tereza Daňhelovská

Podpis

Poděkování

Velmi ráda bych na tomto místě poděkovala Ing. Markétě Tesařové, Ph.D. za veškerý čas, cenné rady a podporu během sepisování této bakalářské práce.

Děkuji RNDr. Haně Hansíkové, CSc. za možnost působení v Laboratoři pro studium mitochondriálních poruch, podílení se na experimentální činnosti a za konzultace během sepisování práce.

Dále bych chtěla poděkovat celému kolektivu laboratoře za ochotu a přátelský přístup.

V neposlední řadě děkuji své rodině a Adamovi Blažkovi za podporu v průběhu celého bakalářského studia.

Abstrakt

Systém oxidativní fosforylace (OXPHOS) je hlavním a nepostradatelným zdrojem energie (ATP) eukaryotické buňky. Je to komplexní proces, situovaný ve vnitřní mitochondriální membráně, na kterém se podílí 4 enzymy dýchacího řetězce, 2 mobilní přenašeče a ATP syntáza. Narušení jakékoli části OXPHOS může vést k mitochondriálnímu onemocnění.

S incidencí přibližně 1:5000 se mitochondriální onemocnění řadí mezi jedny z nejčastějších vrozených metabolických poruch. Klinicky se jedná o velmi heterogenní skupinu chorob, postihující zejména energeticky náročné tkáně (mozek, srdce, svaly). Vzhledem k širokému spektru klinických projevů a relativně slabé korelaci mezi genotypem a fenotypem mitochondriálních onemocnění se upřednostňuje kompletní laboratorní diagnostika, zahrnující celou řadu biochemických a molekulárně genetických metod.

Tato bakalářská práce shrnuje dosavadní informace o mechanismu OXPHOS a popisuje hlavní tři současně používané metody k charakterizaci jeho funkčnosti. Jedná se o metody: spektrofotometrické měření aktivit jednotlivých komplexů OXPHOS, měření kapacity mitochondriálního energetického metabolismu pomocí radioaktivně značených substrátů a polarografické měření spotřeby kyslíku.

K co nejpřesnější charakterizaci funkce OXPHOS by měla být využita kombinace více metod a to nejlépe na dvou různých tkáních (většinou kosterní svalovina a kultivované kožní fibroblasty).

Klíčová slova: mitochondrie, systém oxidativní fosforylace, mitochondriální onemocnění, spektrofotometrie, polarografie, mitochondriální energetický metabolismus

Abstract

The system of oxidative phosphorylation (OXPHOS) is main and essential source of energy (ATP) in eukaryotic cells. It is complex process situated in the inner mitochondrial membrane in which 4 enzymes of the respiratory chain, 2 mobile carriers and the ATP synthase participate. Defect in any part of OXPHOS may lead to the mitochondrial disorders.

An incidency of the mitochondrial disorders is estimated to be 1:5000 and mitochondrial disorders are the most common inherent metabolic diseases. Clinically, it is extremely heterogeneous group of disorders affecting primarily tissue with high energy demand, for example brain, hearth and muscle. With regard to broad spectrum of clinical symptoms and relatively poor genotype-phenotype correlation of mitochondrial genetic defects, it is preferred to perform complete laboratory diagnostic tests including several biochemical and molecular genetic approaches.

This bachelor thesis summarizes actual information about mechanism of OXPHOS and describes three major approaches to detect its functionality. Three major approaches are: spectrophotometric measurement of individual OXPHOS enzyme activities, measuring capacity of the mitochondrial energy generating system using various radioactive labeled substrates and measuring of oxygen consumption by polarography.

To achieve the best characterization of OXPHOS function, combination of these methods should be performed, preferably on two different tissues (usually skeletal muscle and cultured skin fibroblasts).

Key words: mitochondria, oxidative phosphorylation system, mitochondrial disorders, spectrophotometry, polarography, mitochondrial energy generating system

Obsah

1. Úvod....3
1. Mitochondrie....4
1.1. Struktura mitochondrie....4
2. Oxidativní fosforylace....6
2.1. Komplex I....6
2.1.1. Struktura komplexu I....7
2.2. Komplex II....9
2.2.1. Struktura komplexu II....9
2.3. Komplex III....10
2.3.1. Struktura komplexu III....10
2.3.2. Q cyklus:....11
2.4. Komplex IV....11
2.4.1. Struktura komplexu IV....12
2.5. Koenzym Q....13
2.6. Cytochrom *c*....13
2.7. ATP syntáza....13
2.7.1. Struktura ATP syntázy....13
2.7.2. Syntéza ATP....14
3. Mitochondriální onemocnění....15
3.1. Primární a sekundární deficity....15
3.2. Mutace v mitochondriální DNA....16
3.2.1. Heteroplasmie....16
3.2.2. Treshold efekt....16
3.3. Mutace v jaderné DNA....17
3.4. Pacienti s podezřením na mitochondriální onemocnění....17
4. Analýza OXPHOS....18
4.1. Metody....18
4.1.1. Spektrofotometrické měření aktivit jednotlivých komplexů OXPHOS....18
4.1.1. Měření kapacity mitochondriálního energetického metabolismu....21
4.1.2. Měření spotřeby kyslíku....25
4.2. Tkáně, z kterých se analýza provádí....30
5. Závěr....31
6. Přehled použité literatury....32

Seznam zkratek

ANT	adeninnukleotidový přenašeč, adenine nucleotide translocator
antA	antimycin A (inhibitor komplexu III)
ask	askorbát
ATP, ADP	adenosintrifosfát, adenosindifosfát
CCCP	karbonylkyanid 3-chlorofenylhydrazon
CoQ	koenzym Q, ubichinon
CrP	kreatinfosfát
CS	citrátsyntáza
cyt c	cytochrom *c*
DCPIP	dichlorofenolindofenol
dig	digitonin
DB	decylubichinon
DNP	2,4-dinitrofenol
DTNB	5,5´-dithio-bis-(2-nitrobenzoová kyselina)
FAD, $FADH_2$	flavinadenindinukleotid (oxidovaná, redukovaná forma)
FCCP	karbonylkyanid-*p*-trifluoromethoxyfenylhydrazon
FMN	flavinmononukleotid
glu	glutamát
KI	komplex I, NADH:ubichinon oxidoreduktáza
KII	komplex II, sukcinát:ubichinon oxidoreduktáza
KIII	komplex III, cytochrom *bc1* komplex, ubichinol:cytochrom *c* oxidoreduktáza
KIV	komplex IV, cytochrom *c* oxidáza
KV	komplex V, ATP syntáza
LDH	laktátdehydrogenáza
mal	malát

MEGS	mitochondriální energii generující systém, mitochondrial energy-generating system
mtDNA	mitochondriální DNA
NAD^+, NADH	nikotinamidadenindinukleotid (oxidovaná, redukovaná forma)
nDNA	jaderná DNA, nuclear DNA
OSCP	oligomycin senzitivní protein, oligomycin sensitivity-conferring protein
OXPHOS	systém oxidativní fosforylace
PK	pyruvátkináza
PDH	pyruvátdehydrogenáza
POLG	gen pro DNA polymerázu γ
Q, QH_2	ubichinon (koenzym Q), ubichinol (hydroubichinol), (oxidovaná, redukovaná forma koenzymu Q)
RCR	respirační kontrolní poměr, respiratory kontrol ratio
ROS	volné kyslíkové radikály, reactive oxygen species
rot	rotenon (inhibitor komplexu I)
sukc	sukcinát
TMPD	N,N,N',N'-tetramethyl-p-fenylendiamin
tRNA	transferová RNA
VDAC	kanál VDAC, voltage-dependent anion channel

1. Úvod

Porucha systému oxidativní fosforylace (OXPHOS) vede k velmi závažným metabolickým onemocněním, projevujícím se často krátce po narození. S incidencí 1:5000 patří mitochondriální onemocnění (porucha OXPHOS) mezi jedny z nejčastějších vrozených metabolických poruch.

První případ mitochondriálního onemocnění byl popsán v 60. letech minulého století (Luft et al., 1962). Jednalo se o 35 letou ženu s vážným hypermetabolickým syndromem. Biochemická studie této pacientky byla provedena na izolovaných mitochondriích kosterní svaloviny. Studie zahrnovala respirační analýzu, byla měřena aktivita ATP syntázy a aktivita cytochrom *c* oxidázy (KIV). Respirace byla měřena v přítomnosti pyruvátu a malátu, v nadbytku anorganického fosfátu a ATP. Spotřeba kyslíku byla monitorována v přítomnosti (maximální respirace) i nepřítomnosti (klidová respirace) konečného akceptoru fosfátu (glukóza + kvasinková hexokináza). U pacientky bylo pozorováno zvýšené množství mitochondriálních proteinů, zvýšená aktivita komplexu IV na jednotku proteinu, vysoce na Mg^{2+} závislá ATPázová aktivita byla pouze mírně stimulována dinitrofenolem (normálně je ATPázová aktivita relativně nízká a přidání dinitrofenolu jí může 4 – 5 krát zvýšit). Citlivost k oligomycinu byla pouze částečná a byla naměřena téměř maximální respirace v nepřítomnosti akceptoru fosfátu paralelně s normálním dýcháním v přítomnosti akceptoru fosfátu. Dále byly provedeny mikroskopické studie, které vykazovaly strukturní abnormality mitochondrií: zvýšené množství mitochondrií v perinukleární oblasti, mitochondrie byly extrémně variabilní ve velikosti a obsahovaly obrovské množství hustě zabalených krist.

Od té doby se poznatky o OXPHOS i o jeho poruchách výrazně rozšířily. V roce 1981 byl osekvenován mitochondriální genom (Anderson et al., 1981), roku 1996 byly poprvé formulovány hlavní kritéria k identifikaci mitochondriálního onemocnění (Walker et al., 1996) a dnes se odhaduje, že každý dvoustý člověk nese patogenní mtDNA mutaci (Cree et al., 2009) a až 1500 genů může být zapojeno do správné funkce mitochondriálního energetického metabolismu.

Přestože dnes máme o OXPHOS mnohem více informací, není diagnostika mitochondriálního onemocnění snadným úkolem. Vyšetření pacientů s podezřením na mitochondriální onemocnění vyžaduje celou řadu laboratorních a klinických testů.

1. Mitochondrie

Mitochondrie jsou buněčné organely mající důležitou roli v eukaryotických buňkách. Probíhá zde například homeostáze Ca^{2+}, buněčná signalizace, apoptóza, produkce volných kyslíkových radikálů (ROS) (Venditti et al., 2013), termogeneze (Azzu and Brand, 2010), Krebsův cyklus a metabolismus aminokyselin, mastných kyselin a steroidů (DiMauro and Schon, 2003). Avšak nejdůležitější funkcí je jejich schopnost transformovat energii přijímanou živinami do formy ATP (Venditti et al., 2013).

Mitochondrie vznikly z α-proteobakterií, přibližně před dvěma miliardami let, mechanismem nazývaným endosymbióza (Gray, 2012; Yang et al., 1985). Mitochondrie mají svůj vlastní genom, avšak během evoluce přešla většina genů z genomu organely do genomu jaderného. Většina proteinů mitochondrií je tedy kódována jádrem, syntetizována v cytosolu a následně importována do organely.

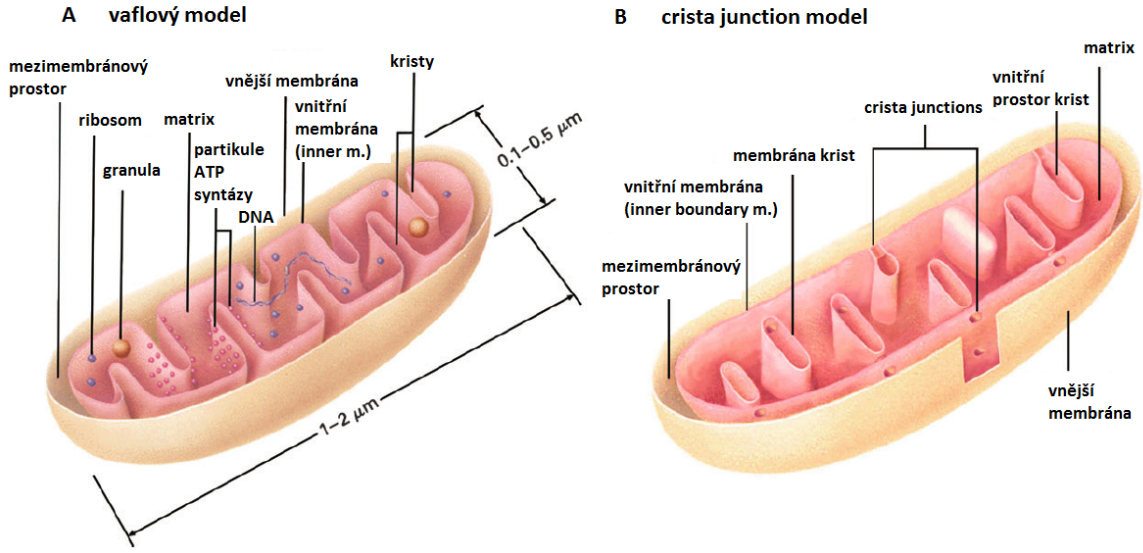
Lidský mitochondriální genom je cirkulární, velký 16 565 bp, a kóduje celkem 37 genů: 2 rRNA, 22 tRNA a 13 podjednotek komplexů dýchacího řetězce (7 podjednotek komplexu I, 1 podjednotku komplexu III, 3 podjednotky komplexu IV a 2 podjednotky ATP syntázy) (Anderson et al., 1981). V buňkách je přítomný až v tisíci kopiích.

1.1. Struktura mitochondrie

Mitochondrie jsou rozdílné ve velikosti a tvaru v závislosti na tkáni, ze které pochází. Jsou eliptické, ~0,5μm široké a ~1μm dlouhé. V buňkách mitochondrie neexistují jako izolované organely, ale vytvářejí vysoce dynamickou síť.

Mitochondrie mají dvě membrány, vnější a vnitřní. Oblast mezi vnější a vnitřní membránou nazýváme mezimembránový prostor a vnitřní část mitochondrie matrix. Existuje tzv. vaflový model (z anglického baffle model), kdy vnitřní membrána (inner membrane) je mnohanásobně větší než membrána vnější a je velmi zprohýbaná (záhyby nazýváme kristy). Tento model (Palade, 1952) je dodnes používaným učebnicovým modelem. V posledních letech, díky studii struktury mitochondrie pomocí elektron-mikroskopické tomografie, se ale od toho modelu opouští a vaflový model je nahrazován „crista junction modelem“. V tomto modelu jsou kristy spojeny s vnitřní membránou (inner boundary membrane), která je podobná membráně vnější, pomocí membránových tubulů. Tubuly, též nazývány „crista junctions“, mají průměr ~30 nm. Kristy se jeví jako napuchlé váčky (cisterny), které jsou spojovány úzkými tubuly s vnitřní membránou i jsou těmito tubuly propojovány navzájem (Frey and Mannella, 2000; Logan, 2006).

Matrix mitochondrie obsahuje mnoho enzymů (například enzymy Krebsova cyklu nebo proteiny oxidace mastných kyselin), mtDNA, ale i kompletní mašinerii sloužící pro syntézu mitochondriálních proteinů: DNA a RNA polymerázy, ribozomy, molekuly tRNA, nukleotidy a aminokyseliny. Vnější mitochondriální membrána obsahuje napěťově řízené aniontové kanály (VDAC), póry, které propouští malé molekuly jako je ATP a glukóza, zatímco větší (například proteiny) kanálem projít nemohou. Přenos nasyntetizovaného ATP z matrix do mezimembránového prostoru a přenos ADP opačným směrem zprostředkovává ADP/ATP přenašeč vnitřní mitochondriální membrány. Kromě ADP/ATP translokátoru obsahuje vnitřní membrána mnoho dalších transportních systémů (přenašeče pro glykogen a další důležité metabolity, kofaktory, anorganické molekuly, atd.) (Goodsell, 2010).

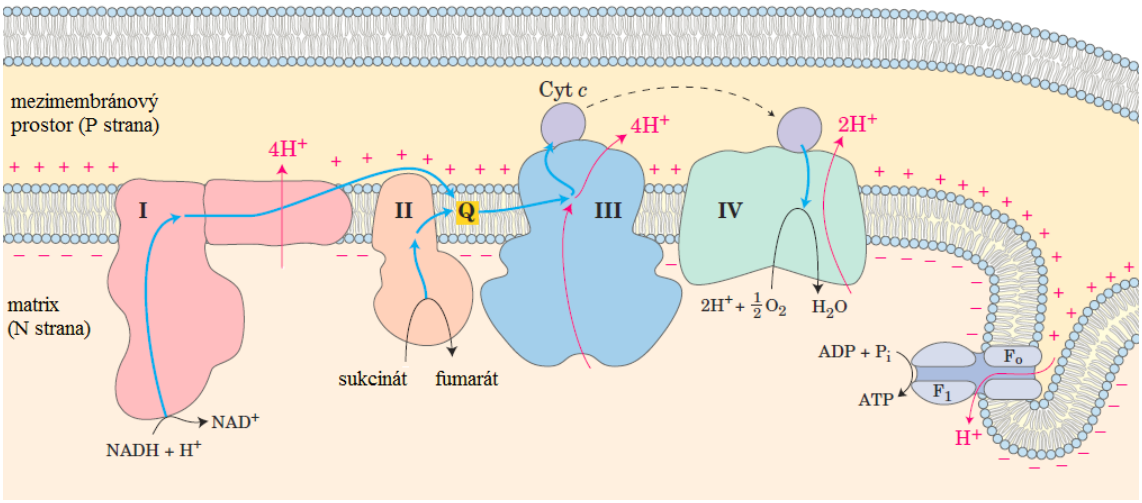


Obrázek : Struktura mitochondrie. A) vaflový model, B) „crista junctions model“ (upraveno podle Logan, 2006).

2. Oxidativní fosforylace

Oxidativní fosforylace (OXPHOS) je hlavním zdrojem ATP eukaryotické buňky (Chaban et al., 2013). Systém OXPHOS je situován do vnitřní mitochondriální membrány. Je to proces, při kterém elektrony (pocházející z redukovaných koenzymů NADH a $FADH_2$) posupně procházejí sérií enzymů a mobilních přenašečů, kterou nazýváme elektron-transportní řetězec, na jejich terminální akceptor kyslík.

Elektron-transportní řetězec se skládá ze 4 komplexů dýchacího řetězce, které jsou zabudované ve vnitřní mitochondriální membráně, a dvou mobilních přenašečů. Postupným přechodem elektronů jednotlivými komplexy dochází k tvorbě protonového gradientu. Ten je využit F_1F_o ATP syntázou na syntézu ATP (OXPHOS).



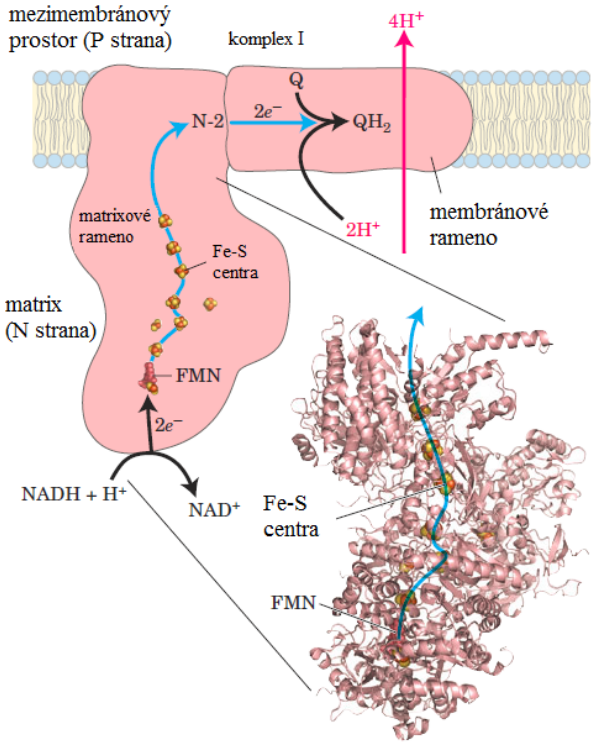
Obrázek : Schéma systému oxidativní fosforylace (upraveno podle Nelson et al., 2008)

2.1. Komplex I

První komplex dýchacího řetězce, též nazývaný NADH:ubichinon oxidoreduktáza nebo NADH dehydrogenáza (EC 1.6.5.3, KI) je největším enzymem mitochondriálního dýchacího řetězce. Je tvořen 44 podjednotkami (Balsa et al., 2012; Carroll et al., 2006), z toho 7 je kódováno mitochondriálním genomem. Molekulová hmotnost enzymu je přibližně 980 kDa Přenáší 2 elektrony z NADH, vytvořeného během Krebsova cyklu, β oxidace mastných kyselin či glykolýzy, na koenzym Q (ubichinon) (Hirst, 2013).

NADH je oxidován nekovalentně vázaným flavin mononukleotidem (FMN) na NAD^+ a následně 2 elektrony přechází přes 8 železo-sirných center (2 binukleární a 6 tetranukleární) na vazebné místo ubichinonu za současné redukce ubichinonu (Q) na ubichinol (QH_2). Energie uvolněná během této reakce je použita na přenos 4 protonů z matrix do

mezimembránového prostoru (stechiometrie tedy je $2H^+/e^-$). Přenosem protonů se tvoří proton-motivní síla, která je využita pro syntézu ATP (Hirst, 2013; Janssen et al., 2006b).



Obrázek : Schéma komplexu I (upraveno podle Nelson et al., 2008)

2.1.1. Struktura komplexu I

Konzervované jádro enzymu tvoří 14 z 44 podjednotek KI a zbylých 30 podjednotek je tzv. nadpočetných, které se mezi jednotlivými druhy velmi liší. V prokaryotním organismu najdeme pouze 14 hlavních podjednotek, nadpočetné podjednotky se zde nevyskytují (T Yagi, 1998).

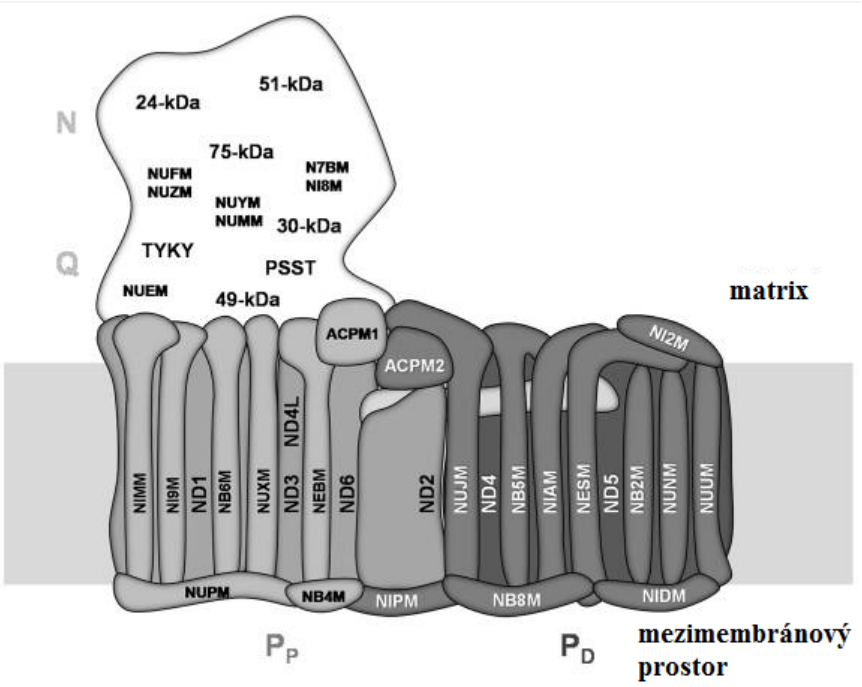
Tyto podjednotky, též nazývány jako „minimum“ enzymu, katalyzují transport elektronů z NADH na ubichinon a generují membránový potenciál. Tvoří dvě domény, připomínající tvar písmene L. 7 hydrofilních podjednotek představuje redoxní část sahající do mitochondriální matrix (N (NADH oxidační) modul a Q (ubichinon redukční) modul) a 7 hydrofóbních podjednotek (ND1, ND2, ND3, ND4, ND5, ND6 a ND4L) tvoří doménu zabudovanou ve vnitřní mitochondriální membráně (P (proton translokující) modul). Těchto 7 hydrofóbních podjednotek je kódováno mitochondriálním genomem, zatímco hydrofilní podjednotky jsou kódovány genomem jaderným a následně jsou do mitochondrií importovány (Hirst, 2013; Janssen et al., 2006b; Schultz and Chan, 2001). Funkce nadpočetných

podjednotek není dodnes jasná, předpokládá se, že mají úlohu v asemblaci, regulaci a stabilizaci komplexu (Angerer et al., 2011).

N a Q modul společně zajišťují veškeré redoxní děje odehrávající se v komplexu. P modul můžeme rozdělit na dvě subdomény: proximální P_P a distální P_D (Angerer et al., 2011). Tři největší podjednotky membránového ramene komplexu I: ND2, ND4 a ND5 byly považovány za kandidáty v přenosu protonů. A skutečně se ukazuje, že hlavní podjednotky P_D modulu, ND4 a ND5, přispívají k pumpování protonů. Nedávná studie mutageneze ND5 (Dröse et al., 2011) ukazuje funkční důležitost proteinu, jakožto redoxní protonové pumpy, ale též příspěvek jiné části membránového ramene KI k pumpování protonů. Stabilní subkomplex nb8mΔ s deletovanými geny pro ND4 a ND5 nadále pumpuje protony a to v polovičním množství než kompletní enzym. Membránové rameno má tedy dvě funkčně odlišné protonové pumpy, jednu v P_P doméně a jednu v P_D doméně, přičemž protonové pumpa P_D domény je sériově spojena s protonovou pumpou P_P domény. Tento fakt se též shoduje s ideou, že dlouhý helikální transmisní element, přemosťující tyto dvě subdomény, je zapojen v řízení protonových pump (Dröse et al., 2011). Dále analýza subkomplexu s deletovanými podjednotkami ND1 a ND3 (subkomplex Iδ) ukazuje, že tyto podjednotky spojují membránovou a periferní část. Avšak skutečnost, že i subkomplex Iδ obsahuje kompletní Q a N modul a velkou část P modulu naznačuje, že mezi periferní a membránovou částí enzymu musí být další spojení. Dále se ukazuje, že podjednotka ND1 má význam ve vedení ubichinonu do aktivního místa (Angerer et al., 2011).

Asemblace KI není ovlivněna pouze dvěma genomy (mtDNA a nDNA), ale i mnoha importními cestami, směřujícími jaderně kódované podjednotky do matrixové nebo mezimembránové části enzymu (Angerer et al., 2011).

Některé z nadpočetných podjednotek stabilizují membránové rameno a tvoří lešení okolo centrálních podjednotek P modulu. NUJM podjednotka bude nejspíše důležitou spojkou mezi periferním a membránovým ramenem (Angerer et al., 2011).



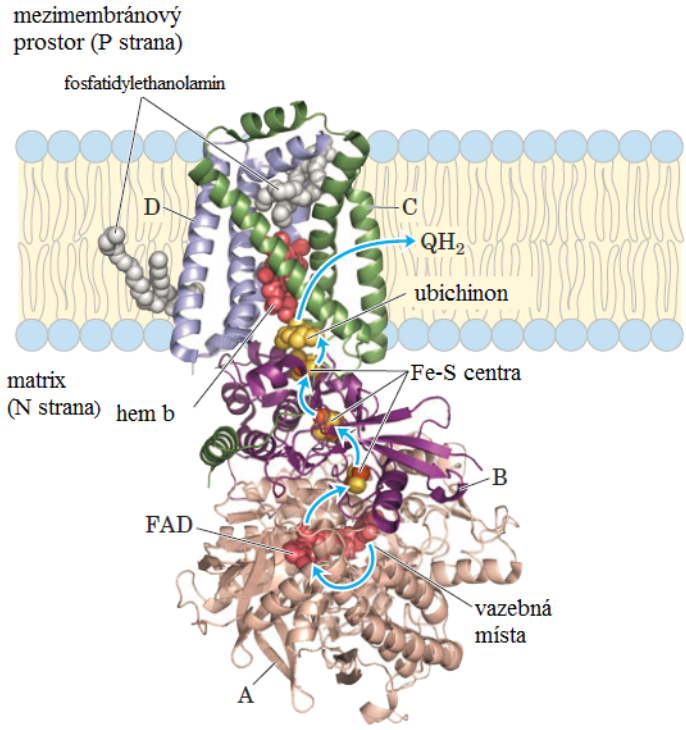
Obrázek : Uspořádání podjednotek komplexu I (upraveno podle Angerer et al., 2011)

2.2. Komplex II

Druhým enzymem je sukcinát:ubichinon oxidoreduktáza (SQR, EC 1.3.5.1, KII). Je to integrální membránový komplex, mající úlohu nejen v oxidativní fosforylaci, ale i v cyklu trikarboxylových kyselin (zde je označován jako sukcinátdehydrogenáza). Sukcinátdehydrogenáza katalyzuje oxidaci sukcinátu na fumarát za současné redukce FAD. Během oxidativní fosforylace pak elektrony z redukovaného FAD ($FADH_2$) přechází přes tři železo-sirná centra na ubichinon. Jako jediný ze série enzymů dýchacího řetězce nepřenáší protony. Je tvořen čtyřmi podjednotkami, z nichž ani jedna není kódována mtDNA (Cecchini, 2003; Diaz et al., 2011; Sun et al., 2005).

2.2.1. Struktura komplexu II

Komplex II je složen z rozpustného katalytického heterodimeru a integrálního membránového regionu. Heterodimer obsahuje podjednotku a s kovalentně vázaným FAD a podjednotku b, obsahující tři železosirná centra. Membránový region je tvořen dvěma hydrofóbními proteiny (velký cytochrom b vázající protein (Cyt b_L neboli podjednotka c) a malý cytochrom b vázající protein (Cyt b_S neboli podjednotka d)) a jednou molekulou hemu (Sun et al., 2005).



Obrázek : Struktura komplexu II (upraveno podle Nelson et al., 2008)

2.3. Komplex III

Komplex III (EC 1.10.2.2, KIII), též nazývaný cytochrom *bc1* komplex či ubichinon cytochrom *c* oxidoreduktáza, zprostředkovává přenos elektronů z redukovaného CoQ (hydroubichinol QH_2) na cytochrom *c* (cyt c). Tento proces je spřažen se současným přenosem 4 protonů/e^- přes vnitřní mitochondriální membránu do mezimembránového prostoru. Komplex III je homodimer. Každý z monomerů se skládá z 11 podjednotek, z nichž jedna (cyt b) je kódována mtDNA. Tři jsou katalytické, Rieskeho železosirný protein, nízko a vysoce kapacitní b typ cytochromu (b_L a b_H) a cytochrom c_1 (Robertson et al., 1993), a osm je strukturních. (Diaz et al., 2011). Celková velikost KIII je přibližně 240 kDa (Iwata et al., 1998).

2.3.1. Struktura komplexu III

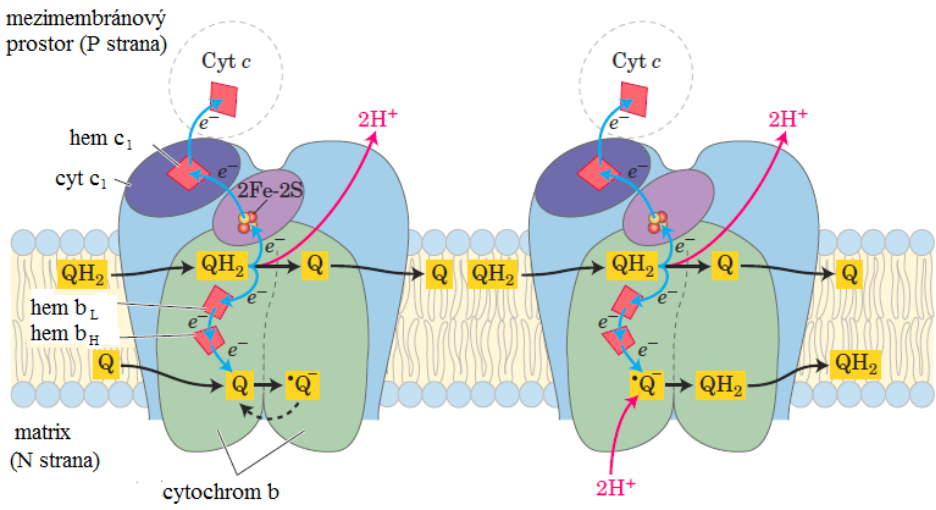
Cytochrom bc_1 lze rozdělit do 3 domén intermembránové, transmembránové a matrixové, dohromady tvořených 11 podjednotkami. Intermembránová doména je tvořena cyt c_1, Rieskeho protein a podjednotkou 8. Transmembránová doména je tvořena cyt b, podjednotkou 7, 10, 11 a transmembránovou částí Rieskeho proteinu a cyt c_1. Matrixová část je tvořená velkými proteiny (podjednotkami 1 a 2) a podjednotkami 6 a 9, které jsou lokalizovány mezi těmito dvěma proteiny (Iwata et al., 1998).

2.3.2. Q cyklus:

Transfer elektronů uvnitř komplexu III je spřažen s translokací protonů mechanismem, který nazýváme Q cyklus. Dochází k oxidaci QH_2 na Q za současné redukce 2 molekul cyt c. Cyt c je solubilní protein mezimembránového prostoru, který přenáší elektrony z komplexu III na komplex IV (Nelson et al., 2008).

Q je na N (negativní) straně membrány redukován na semiubichinonový radikál ($^{\cdot}Q^{-}$), který je v druhé fázi konvertován na QH_2. Mezitím na P (pozitivní) straně membrány dochází k oxidaci dvou molekul QH_2 a k uvolnění $2H^+/Q$ (celkem 4 H^+) do mezimembránového prostoru (Brandt, 1996; Nelson et al., 2008).

Elektrony jsou přenášeny dvěma směry. Jeden elektron prochází Rieskeho železosirným proteinem na cyt c, zatímco druhý putuje přes cytochrom b_L na b_H na molekulu Q. Během cesty elektronu druhým směrem dochází k redukci Q ve dvou krocích, protony jsou přijímány z matrix též v poměru $2H^+/Q$ (Iwata et al., 1998; Nelson et al., 2008).



Obrázek : Schéma Q cyklu (upraveno podle Nelson et al., 2008)

2.4. Komplex IV

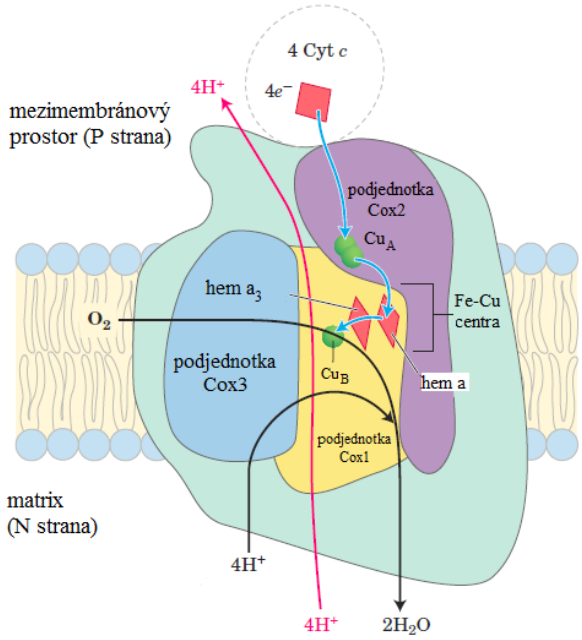
Posledním enzymem je komplex IV, cytochrom *c* oxidáza (EC 1.9.3.1, KIV). Přenáší elektrony z cytochromu *c* na kyslík za současného přenosu protonů z matrix do mezimembránového prostoru. Komplex IV je homodimer, obsahující 14 podjednotek (Balsa et al., 2012) o celkové velikosti ~230 kDa. Tři podjednotky, tvořící katalytické jádro proteinu, jsou kódovány mtDNA, zbytek je kódován jaderným genomem (Diaz et al., 2011).

Cytochrom *c* oxidáza je hlavním regulačním enzymem elektron-transportního řetězce. Její důležitost lze dokázat na mnoha úrovních regulace její aktivity a též na jejím obsahu v mitochondriích (Srinivasan and Avadhani, 2012).

2.4.1. Struktura komplexu IV

Podjednotky Cox1, Cox2 a Cox3 (mtDNA kódované) jsou největšími a evolučně konzervovanými podjednotkami komplexu IV. Tvoří katalytické jádro enzymu. Nesou dvě hemové (hem a, hem a_3) a dvě Cu^{2+} redoxní centra (Cu_A, Cu_B) a vychytávají více než 90% molekulárního kyslíku. Zbylých 11 podjednotek je kódováno jádrem a mají úlohu ve stabilizaci, regulaci a asemblaci enzymu (Srinivasan and Avadhani, 2012).

Cu_A (Cox2) přijímá elektron z redukovaného cyt c a přenáší jej na hem a (Cox1). Z hemu a jsou elektrony transportovány na Fe-Cu centrum, hem a_3/Cu_B (Cox1) a redukují molekulární kyslík na vodu. Během tohoto procesu dochází k přenosu $4H^+$ z matrix do mezi membránového prostoru (Capaldi, 1990 cit. podle Srinivasan and Avadhani, 2012).



Obrázek : Struktura komplexu IV (upraveno podle Nelson et al., 2008)

V roce 2012 se začalo ukazovat, že podjednotka NDUFA4, původně považovaná za součást komplexu I, je ve skutečnosti podjednotkou komplexu IV. Tato podjednotka není asemblační a není ani sama o sobě vyžadována pro katalytickou reakci uvnitř enzymu. Její mutace ale snižuje aktivitu KIV ve svalové tkáni i v kultivovaných kožních fibroblastech.

Proto se usuzuje, že tato podjednotka je vyžadována během biogeneze komplexu IV a poté volně asociuje s komplexem IV (Balsa et al., 2012; Pitceathly et al., 2013).

2.5. Koenzym Q

Koenzym Q, neboli ubichinon, je lipofilní molekula, vyskytující se ve všech typech tkání a buněk, nejčastěji ve vnitřní mitochondriální membráně. Je to izoprenoidní koenzym, obsahující redukčně aktivní benzochinon. Délka izoprenoidního řetězce se liší mezi jednotlivými druhy, přičemž u člověka je složen z 10 isoprenylových podjednotek (CoQ_{10}). Přenáší elektrony z komplexu I a II na komplex III. Krom toho má mnoho dalších funkcí: antioxidační, vychytávání volných kyslíkových radikálů (ROS) a podílí se na mnoha aspektech buněčného metabolismu (Quinzii and Hirano, 2010; Turunen et al., 2004).

2.6. Cytochrom *c*

Cytochrom *c* je malý solubilní protein vnitřní mitochondriální membrány. Přenáší elektrony z komplexu III na komplex IV. Jeho další rolí je spouštění apoptózy díky stimulaci kaspáz (Nelson et al., 2008).

2.7. ATP syntáza

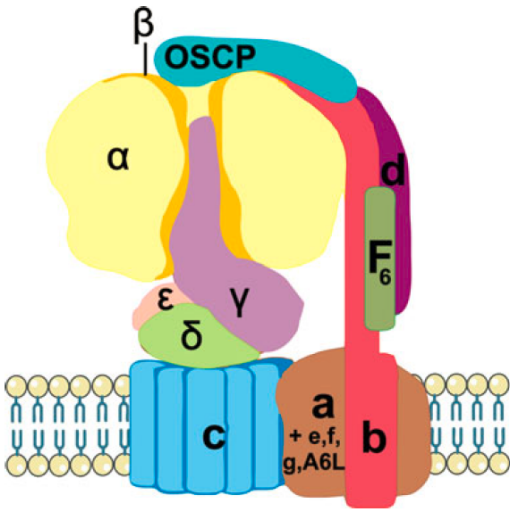
ATP syntáza, též nazývána jako F_1F_o ATPáza (EC 3.6.3.14), H^+ ATPáza F typu nebo pátý komplex (KV) dýchacího řetězce, se skládá z dvou funkčních domén. Matrixové F_1 domény a membránové F_o. Celková velikost je ~600 kDa (Habersetzer et al., 2013). ATP syntáza využívá energii elektrochemického gradientu k fosforylaci ADP na ATP. F_1 doména je tvořena z 5 podjednotek α, β, γ, δ, ε, z nichž α a β jsou každá ve třech kopiích. F_o je tvořena 6 hlavními podjednotkami (a, b, c, d, F6 a OSCP) a 4 přidatnými (e, f, g a A6L) (Jonckheere et al., 2012). Podjednotky a i A6L jsou kódovány mtDNA (Anderson et al., 1981).

ATP syntáza se ve vnitřní mitochondriální membráně vyskytuje ve formě dimeru. Je-li v savčích buňkách proces dimerizace narušen, dochází ke snížení aktivity OXPHOS a drastickému snížení tvorby ATP. Dochází též k dezorganizaci ultrastruktury mitochondrie, jelikož dimery ATP syntézy jsou nezbytné k tvorbě mitochondriálních krist (Habersetzer et al., 2013).

2.7.1. Struktura ATP syntázy

F_1 doména je ve vodě rozpustný periferní membránový protein, který se skládá z podjednotek α, β, γ, δ, ε v poměru (3:3:1:1:1). Podjednotky γ, δ, ε tvoří centrální stonek komplexu. α a β podjednotky vážou nukleotidy (ADP/ATP), β podjednotka je katalytickým

centrem ATP syntázy. γ podjednotka spojuje F_1 a F_o části. F_o je transmembránová, ve vodě nerozpustná část enzymu, skládající se z c kruhu, složeného pravděpodobně z osmi podjednotek (Watt et al., 2010), a podjednotek a, b, d, F6 a OSCP (oligomycin senzitivní protein), které tvoří periferní stonek (Jonckheere et al., 2012).



Obrázek : Lidská ATP syntáza (Jonckheere et al., 2012)

Dále se zde vyskytuje malá regulační podjednotka IF1, vázající se na F_1 část enzymu při nízkém pH a bránící tak enzymu přejít do hydrolytické fáze a hydrolyzovat ATP. S ATP syntázou dále asociují proteiny DAPIT (z anglického Diabetes-Associated Protein in Insulin-sensitive Tissue) a 6,8 kDa velký proteolipid (MLQ) (Hejzlarová et al., 2014). Nově byl také objeven protein TMEM70, který je biosyntetickým faktorem ATP syntázy u vyšších eukaryot a chybí-li, je syntéza enzymu silně inhibována (Čížková et al., 2008).

2.7.2. Syntéza ATP

ATP je tvořen z ADP a anorganického fosfátu. Dochází tak v F_1 části enzymu díky protonovému gradientu napříč vnitřní mitochondriální membránou. Protony prochází kanálem na rozhraní c kruhu a podjednotky a. Díky protonaci glutamátu v každé c podjednotce dochází k roztočení c kruhu. S c kruhem se zároveň roztáčí i centrální stonek (podjednotky γ, δ, ε). Ten pak interaguje s αβ hexametrem F_1 části enzymu, dochází ke konformačním změnám na hexametru a k syntéze ATP. K otočení F_1F_o ATPázy o 360° je tedy potřeba 8 protonů a výsledkem jsou tři molekuly ATP (Watt et al., 2010).

3. Mitochondriální onemocnění

Termínem mitochondriální onemocnění můžeme označovat kromě poruchy OXPHOS též poruchy apoptózy, poruchy regulace cytoplasmatického a mitochondriálního vápníku, poruchy syntézy a katabolismu metabolitů i poruchy transportu organely sebe sama na správné místo v buňce (Brand and Nicholls, 2011). V této bakalářské práci však budu považovat za mitochondriální onemocnění pouze poruchy tvorby ATP, tedy poruchy funkce OXPHOS.

Klinicky se jedná o velmi heterogenní skupinu chorob s incidencí přibližně 1:5000 živě narozených dětí (Schaefer et al., 2004; Wolf, 2010). První známky onemocnění se mohou projevit v jakémkoli věku, ve většině případů se však projeví do prvních pěti let života (van den Heuvel and Smeitink, 2001). Existují dva fenotypy mitochondriálních onemocnění a to relativně mírné myopatické onemocnění nebo multisystémové onemocnění postihující zejména orgány a tkáně s velkými energetickými požadavky (mozek, srdce, kosterní svaly, ledviny, endokrinní orgány, CNS). Zasažen však může být jakýkoli orgán. Nejčastějším fenotypem je Leighův syndrom, progresivní onemocnění, zasahující oblasti mozku a zpomalující vývoj (van den Heuvel and Smeitink, 2001; Wolf, 2010).

Mitochondriální deficity mohou být způsobeny mutací jaderného či mitochondriálního genomu. V případě jaderné DNA se jedná o dědičnost autosomálně dominantní, či recesivní, nebo X vázanou. V případě mitochondriální DNA se jedná o dědičnost maternální (Wolf, 2010).

3.1. Primární a sekundární deficity

Přibližně 1500 genů může ovlivnit mitochondriální strukturu a funkci (Milone and Wong, 2013) a více než 300 mutací mtDNA genů (bodové mutace, inzerce, delece či genové přestavby) bylo spojeno s mitochondriálním onemocněním (Wolf, 2010). Zatímco většina jaderně kódovaných deficitů není na molekulární úrovni zcela objasněna (Wolf, 2010).

U dětí jsou mnohem častější mutace jaderné DNA, nejčastěji autosomálně recesivní (Haas et al., 2008). Mutace mitochondriálního genomu tvoří pouze 10 – 20 % případů (Wolf, 2010).

Jako primární deficity označujeme onemocnění, způsobené mutací v genech, kódujících podjednotky dýchacího řetězce a asemblační faktory jednotlivých komplexů. Dále se jedná o geny, které nekódují proteiny dýchacího řetězce, ovšem i mutace těchto genů způsobují deficit OXPHOS. Příkladem mohou být například geny biogeneze mtDNA, biochemických

drah, vedoucích mitochondriální proteiny do vnitřní mitochondriální membrány, nebo geny důležité pro asemblaci jednotlivých enzymů OXPHOS.

Abnormality systému OXPHOS byly identifikovány i u některých neurodegenerativních onemocnění (Parkinsonova choroba, Huntingtonova choroba, Alzheimerova choroba, Amyotrofická laterální skleróza, Wilsonova choroba) (Schapira, 2002), ale i u dalších nemocí jako je diabetes (Sleigh et al., 2011), epilepsie (Lönnqvist et al., 2009), rakovina (Cairns et al., 2011) a obezita (Tseng et al., 2010). Takovéto onemocnění označujeme jako sekundární deficity OXPHOS.

3.2. Mutace v mitochondriální DNA

Mitochondriální genom kóduje pouze 37 genů, a přesto bylo identifikováno více než 300 mutací mtDNA, způsobujících mitochondriální onemocnění. I když jsou jednotlivé defekty klinicky velmi heterogenní, většina z nich vykazuje znaky laktátové acidózy a masivní mitochondriální proliferaci ve svalech. Mutace mtDNA postihuje proteiny dýchacího řetězce nebo syntézu mitochondriálních proteinů jako takovou (mutace tRNA a rRNA). Neexistuje přímý vztah mezi konkrétní mutací a klinickým fenotypem. Jedna mutace může způsobit u dvou pacientů odlišné onemocnění a naopak dvě odlišné mutace mohou způsobit stejný syndrom (DiMauro and Schon, 2003). Zajímavým zjištěním je fakt, že s rostoucím věkem, kdy se u pacienta projevilo mitochondriální onemocnění, je pravděpodobnější, že se jedná o mtDNA mutaci (Schaefer et al., 2004).

3.2.1. Heteroplasmie

V každé buňce (kromě erytrocytů) jsou tisíce molekul mtDNA (Wolf, 2010), avšak patogenní mutaci nenese každá molekula. Tento jev se nazývá heteroplasmie. Část molekul mtDNA buňky nese mutaci a část je bez mutace, či některé buňky tkáně nesou mutaci a jiné ne. Heteroplasmii můžeme uvádět i na úrovni organelové. Každá mitochondrie obsahuje obvykle 2 – 10 molekul mtDNA (Schapira, 2002) a ne všechny nesou mutaci (DiMauro and Schon, 2003).

3.2.2. Treshold efekt

K fenotypovému projevu mutace v mtDNA dochází až v případě, kdy je mutace přítomna v určitém počtu molekul mtDNA, dosáhne se tzv. Treshold efektu. Tento práh je nižší u tkání s vysokou energetickou poptávkou (mozek, srdce, kosterní svalovina, sítnice, nefrony a endokrinní žlázy) a liší se mezi jednotlivými mutacemi (DiMauro and Schon, 2003).

3.3. Mutace v jaderné DNA

Přibližně 1500 jaderně kódovaných genů může ovlivnit strukturu a funkci mitochondrií. Jedná se o geny pro strukturní podjednotky dýchacího řetězce, pro proteiny důležité k asemblaci a správné funkci OXPHOS, pro faktory, zajišťující dynamiku mitochondrií, ale i pro faktory, zajištující například integritu a replikaci mtDNA (Hirano et al., 2001), či zajišťující transport jaderně kódovaných proteinů z cytosolu buňky do mitochondrií.

Pacient může nést deficit jednoho konkrétního enzymu OXPHOS, či deficit kombinovaný (nesprávná funkce více komplexů) (van den Heuvel and Smeitink, 2001).

3.4. Pacienti s podezřením na mitochondriální onemocnění

Kdy můžeme mít podezření, že by pacient mohl trpět defektem OXPHOS? Podezření můžeme mít v případě, kdy se u pacienta vyskytují symptomy, postihující zdánlivě nesouvisející orgány, nebo se vyskytuje některý z těchto znaků: pozměněný oxido-redukční stav (výsledek hromadění NADH, způsobený zhoršenou funkcí Krebsova cyklu) nebo zvýšené množství laktátu a ketolátek současně se zvýšeným poměrem laktát:pyruvát (Rustin et al., 1994).

4. Analýza OXPHOS

Diagnostické vyšetření pacientů, s podezřením na mitochondriální onemocnění, vyžaduje mnoho klinických a laboratorních testů. Mezi hlavní z nich patří vyšetření biochemická.

Defekt systému OXPHOS může vést ke zvýšení laktátu v krvi, moči anebo i v mozkomíšním moku. Též zvýšeny poměr laktát:pyruvát v krvi, pozměněný poměr ketonových látek, zvýšený alanin, ale i další aminokyseliny (prolin, glycin, sarkosin) či zvýšené meziprodukty Krebsova cyklu (malát, sukcinát, 2-oxoglutarát, fumarát) mohou být indikátory mitochondriálního onemocnění. Proto u pacientů, s podezřením na mitochondriální onemocnění, bývá prvním vyšetřením analýza těchto metabolitů (Haas et al., 2008; Rodenburg, 2011).

Ovšem ne všechny mitochondriální poruchy mají mezi svými klinickými znaky zvýšený laktát. Například u Kearns-Sayerova syndromu, Leberovy dědičné optické neuropatické (LHON) a u nemoci asociované s mitochondriální polymerázou γ (z anglického mitochondrial polymerase γ-associated disease) je laktát zvýšený jen minimálně anebo vůbec (Haas et al., 2007).

Dále většina pacientů, trpících mitochondriální poruchou s postižením CNS, vykazuje abnormality na magnetické rezonanci (Barragán-Campos et al., 2005; Valanne et al., 1998). Doplňkem při vyšetření pacientů, podezřelých na mitochondriální deficit, může být i relativně nová metoda protonové magnetické rezonanční spektroskopie (Haas et al., 2008).

Ve většině případů se jako tkáň pro zkoumání mitochondriální funkce používá kosterní sval, odebraný biopsií. K získání funkčního obrazu se používají například metody: měření aktivity komplexů OXPHOS, analýza mitochondriálního dýchání (dýchacího řetězce), měření kapacity mitochondriálního energetického metabolismu pomocí sledování rychlosti oxidace substrátu a analýza složení a množství OXPHOS komplexů pomocí BN-PAGE. Poté se molekulárně genetickými metodami testují jednotlivé kandidátní geny. Zjištění biochemického fenotypu je důležité nejen pro selekci kandidátních genů, ale též přináší hodnotné informace k interpretaci genetických výsledků (Rodenburg, 2011).

4.1. Metody

4.1.1. Spektrofotometrické měření aktivit jednotlivých komplexů OXPHOS

Pro stanovení enzymatických aktivit jednotlivých komplexů OXPHOS můžeme použít několik metod. Jelikož ale nativní elektroforéza a následný western blot, případně barvení v

gelu, nemusí detekovat mírné defekty či nedetekuje celkovou aktivitu komplexu, ale pouze aktivitu jedné časti enzymu (pouze NADH dehydrogenázovou aktivitu komplexu I), nejčastěji používanou metodou je spektrofotometrické měření (Rodenburg, 2011).

Neexistuje jeden konkrétní protokol pro měření aktivity komplexů OXPHOS, postupy jednotlivých laboratoří se liší. Obecným principem je sledování oxidace a redukce různých substrátů a substrátových analogů (Frazier and Thorburn, 2012). Aktivita enzymu je měřena jako změna absorbance vzorku v čase při teplotě 37 °C (30 °C) (Frazier and Thorburn, 2012).

Spektrofotometrické měření aktivity komplexů OXPHOS může být měřeno jak na izolovaných komplexech (KI, KII, KIII, KIV, KV) nebo dohromady jako KI+III a KII+III (Haas et al., 2008). Tabulka 1 představuje reakce, sloužící k měření enzymatických aktivit jednotlivých komplexů OXPHOS v naší laboratoři. Abychom rozlišili primární a sekundární deficity, vztahujeme aktivitu komplexů OXPHOS na aktivitu citrátsyntázy (CS) (Kirby et al., 1999) či dáváme aktivity jednotlivých komplexů do poměrů mezi sebou (Chretien et al., 1998), než abychom aktivitu vztahovali na koncentraci proteinu (Thorburn et al., 2004). Též je možné aktivitu konkrétního komplexu vztahovat na aktivitu sukcinát:ubichinon oxidoreduktázy (komplex II). Je to jediný komplex OXPHOS, který je kódován pouze jadernou DNA, a jeho aktivita tedy může být normální či vyšší u pacientů, nesoucích mtDNA mutaci (Frazier and Thorburn, 2012). Navíc v případě analýzy deficitu komplexu I z post mortem získané tkáně je vhodnější použít poměr I/II než I/CS, jelikož je komplex II post mortem daleko stabilnější než CS a je tak menší pravděpodobnost nesprávné diagnózy (Thorburn et al., 2004). Běžně se však používá porovnání aktivity komplexu s CS, což umožňuje porovnání vzorků mezi sebou (Frazier and Thorburn, 2012; Grazina, 2012; Spinazzi et al., 2012).

Novější protokoly (Frazier and Thorburn, 2012; Spinazzi et al., 2012) umožňují měřit aktivitu komplexů I, II, III a IV ze vzorku čerstvé tkáně i z tkáně zmražené (srdeční, jaterní, svalové a mozkové). Nebo z kultivovaných buněk (fibroblasty, lymfoblasty, i buňky choriových klků). Výjimkou je komplex V, jehož aktivitu lze měřit pouze z čerstvé tkáně (Kirby et al., 2007).

Měření lze provádět na izolovaných mitochondriích, na tkáňových homogenátech, i na celých buňkách (Haas et al., 2008). Využití tkáňových homogenátů oproti izolovaným mitochondriím má několik výhod. Tkáňové homogenáty lze měřit i ze zmražených vzorků, zatímco u izolovaných mitochondrií je zmražení méně vhodné (Zheng et al., 1990). Měření ze

zmražených vzorků má výhodu nejen v možnosti skladování vzorků. Zmražením dochází k narušení mitochondriální membrány a substrát je pak více přístupný enzymům. To je klíčové pro dosažení maximální aktivity KI a KII. Na druhou stranu, po zmražení může dojít k mírnému poklesu aktivity KII a KIII (Spinazzi et al., 2012). Další výhodou tkáňových homogenátů je to, že lze odhadnout množství mitochondrií (aktivita CS) v dané tkáni/buněčné linii. Navíc je měření tkáňových homogenátů časově a finančně výhodnější (Spinazzi et al., 2012)

Metoda dvojí vlnové délky (z anglického double wavelength approach) (Grazina, 2012) umožňuje měření aktivit komplexů v menším množství biologického materiálu, což je důležité zejména u vzorků od dětských pacientů a u vzorků odebraných bioptickou jehlou (biopsie jater, myokardu, ledvin). Většinou je množství 1 – 20 mg tkáně dostačující. Může být použita i tkáň získaná post mortem, je-li odebraná do 2 hodin po smrti a ihned zmražena v kapalném N_2.

Spektrofotometrické měření může někdy přinést falešně negativní výsledky. Ty mohou být způsobené například tím, že se při měření využívají syntetické substráty (Haas et al., 2008).

In vitro vyšetření OXPHOS, kdy nedochází k měření za fyziologických podmínek (pH, osmolarita, celkový buněčný kontext), není ideální. V některých případech není interpretace výsledků snadná a může se objevit nejednoznačnost (Grazina, 2012). I přes tyto nevýhody přináší spektrofotometrická metoda klíčové informace o maximální katalytické aktivitě komplexů dýchacího řetězce (Spinazzi et al., 2012).

Tabulka : Principy reakcí pro měření aktivit komplexů dýchacího řetězce a citrátsyntázy. Analýza je prováděna na základě detekce změny absorbance složky každé reakce (upraveno podle Frazier and Thorburn, 2012; Rustin et al., 1994).

enzym	reakce	λ (nm)
komplex I	$NADH + H^+ + CoQ \rightarrow NAD^+ + CoQ{\cdot}H_2$	340
Komplex I+III	$NADH + H^+$ + cytochrom c (ox) → NAD^+ + cytochrom c (red)	550
komplex II	sukcinát + DCPIP (ox) → fumarát + DCPIP (red)	600
komplex II + III	sukcinát + cytochrom c (ox) → fumarát + cytochrom c (red)	550
komplex III	$DB{\cdot}H_2$ + cytochrom c (ox) → DB + cytochrom c (red)	550
komplexIV	cytochrom c (red) + O_2 → cytochrom c (ox) + H_2O	550
komplex V	$Mg{\cdot}ATP \xrightarrow{ATPsyntáza} Mg{\cdot}ADP + Pi$ $Mg{\cdot}ADP + PEP \xrightarrow{PK} Mg{\cdot}ATP$ + pyruvát Pyruvát + $NADH + H^+ \xrightarrow{LDH}$ laktát + NAD^+	340
Citrátsyntáza	oxalacetát + acetyl CoA → citrát + CoA·SH CoA·SH + DTNB → CoA·S-S-nitrobenzoát + 5-thio-2-nitrobenzoátový anion	412

Vysvětlení zkratek: DB (decylubichinon), DCPIP (dichlorofenolindofenol) DTNB (5,5´-dithio-bis-(2-nitrobenzoová kyselina), LDH (laktátdehydrogenáza), PK (pyruvátkináza)

4.1.1. Měření kapacity mitochondriálního energetického metabolismu

Na rozdíl od spektrofotometrické metody, která analyzuje aktivitu izolovaných komplexů, následující dvě metody, měření kapacity mitochondriálního energetického metabolismu (rychlost oxidace substrátu) a měření spotřeby kyslíku, přináší informace o celkové funkčnosti OXPHOS.

Oxidací pyruvátu (nebo mastných kyselin) získáme acetyl-CoA, který je oxidován v Krebsově cyklu. Dochází tak k tvorbě redukovaných koenzymů NADH a $FADH_2$, které jsou následně využity dýchacím řetězcem k tvorbě ATP (obrázek 9). Oxidace 1 molu pyruvátu přináší 15 molů ATP. Defekt jakékoli části této dráhy vede ke snížené oxidaci pyruvátu a menší produkci ATP. Může se tedy jednat o deficity komplexů OXPHOS (kromě komplexu II), pyruvátdehydrogenázy (PDH), Krebsova cyklu či adeninnukleotidového přenašeče (ANT).

K měření kapacity mitochondriálního energetického metabolismu se používá radioaktivně značený ^{14}C pyruvát, a ^{14}C značené intermediáty Krebsova cyklu (malát a sukcinát). Oxidační rychlost (množství vzniklého $^{14}CO_2$) se pak měří v přítomnosti či nepřítomnosti různých donorů a akceptorů acetyl-CoA a v přítomnosti specifických inhibitorů Krebsova cyklu nebo komplexů OXPHOS (sada inkubací s ^{14}C značenými substráty, shrnuto v tabulce 2). Oxidace malátu je měřena za přítomnosti malonátu (inhibitor sukcinátdehydrogenázy). Konečný produkt, sukcinát, je transportován z mitochondrie a nezasahuje do oxidace substrátu. Produkce ATP je měřena v inkubacích obsahujících pyruvát, malát, kreatin a ADP, v přítomnosti (blank) i nepřítomnosti arzenitu. Inhibiční místa jsou schematicky vyznačena na obrázku 10.

Inkubace jsou prováděny na třepací vodní lázni (37 °C), po dobu 20 minut, ve skleněných lahvičkách se s víčky, s filtračním papírem nasyceným hydroxidem sodným, do kterých se jímá radioaktivní frakce v podobě $^{14}CO_2$. Inkubace jsou startovány přidáním 50 µl vzorku a zastaveny jsou kyselinou chloristou. Poté jsou inkubace přeneseny na 1 hodinu na led, kdy dochází k jímání $^{14}CO_2$. Množství $^{14}CO_2$ je následně měřeno scintilačním počítačem. Inkubace, které slouží k měření produkce ATP, jsou dány na 15 minut na led a poté jsou centrifugovány. Supernatant je neutralizován ledovým $KHCO_3$, přenesen na 15 minut na led a poté zamražen do – 20°C (Janssen et al., 2006a).

ATP a fosfokreatin jsou měřeny podle Lamprechta (Lamprecht et al., 1974). Míra oxidace substrátu a produkce ATP se vztahuje na aktivitu CS.

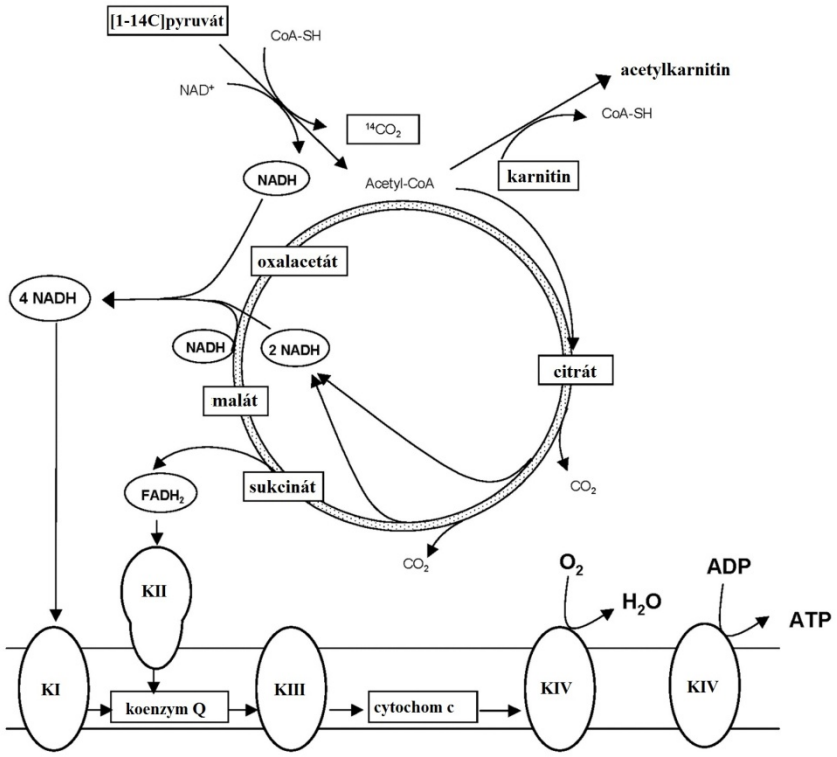
Tabulka : Složení jednotlivých inkubací pro měření kapacity mitochondriálního energetického metabolismu (podle Janssen et al., 2006a).

inkubace	substrát
1	[1-^{14}C] pyruvát + malát
2	[1-^{14}C] pyruvát + karnitin
3	[1-^{14}C] pyruvát + malát bez ADP
4	[1-^{14}C] pyruvát + malát-ADP + CCCP
5	[1-^{14}C] pyruvát + malát-ADP + atraktilosid
6	[U-^{14}C] malát + pyruvát + malonát
7	[U-^{14}C] malát + acetylkarnitin +malonát
8	[U-^{14}C] malát + acetylkarnitin + arsenit
9	[1,4-^{14}C] sukcinát + acetylkarnitin
10	ATP + CrP z oxidace pyruvátu + malát

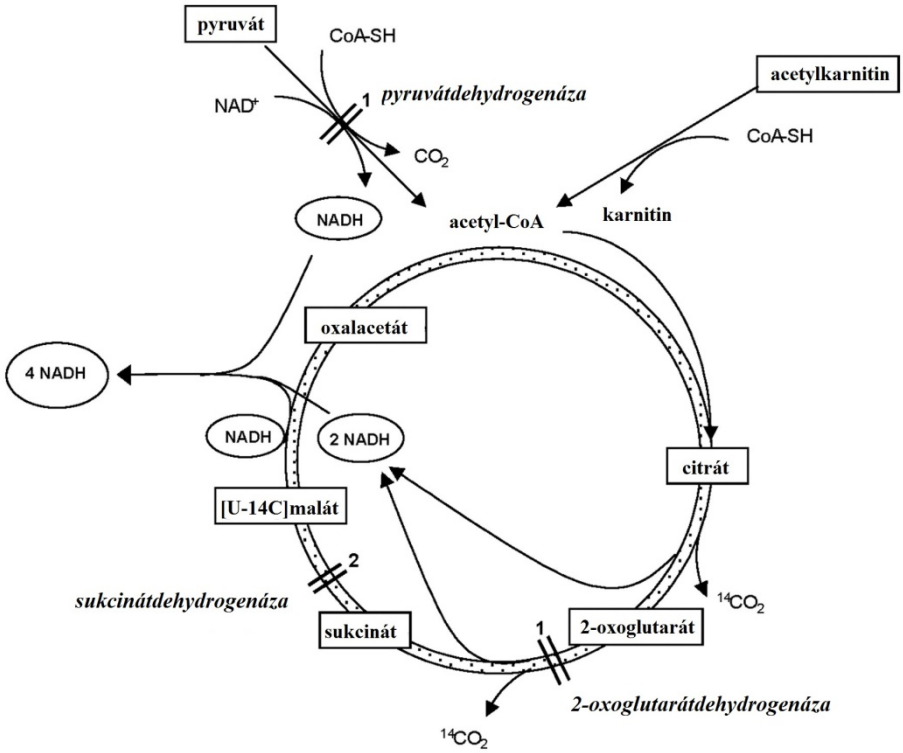
Vysvětlení zkratek: CCCP (karbonylkyanid 3-chlorofenylhydrazon), CrP (kreatinfosfát)

Tato metoda přináší důležité informace sloužící k lokalizaci primárního mitochondriálního deficitu. Například snížená oxidace pyruvátu v přítomnosti malátu spolu s normální či mírně sníženou oxidací pyruvátu v přítomnosti karnitinu je ukazatelem defektu OXPHOS. Zvýšený poměr inkubací (pyruvát + malát – ADP + CCCP) / (pyruvát + malát) je ukazatelem deficitu komplexu V. Přidáním rozpřahujícího proteinu (CCCP) zbavíme oxidaci pyruvátu závislosti na komplexu V (Janssen et al., 2006a).

Studie 24 pacientů s 3243A→G mutací (mtDNA) (Janssen et al., 2008)., vedoucí k fenotypovému projevu MELAS syndromu (mitochondriální myopatie, encefalopatie, laktátová acidóza a iktu (mrtvici) podobné příhody (z anglického stroke-like episodes)), ukazuje, že měření kapacity mitochondriálního energetického metabolismu (kapacita MEGS) je citlivější metodou detekce mitochondriálního defektu ve srovnání s měřením aktivit jednotlivých komplexů OXPHOS pomocí spektrofotometrie. V této studii 8 pacientů s normální enzymatickou aktivitou vykazovalo snížený jeden nebo více parametrů kapacity MEGS a pouze 1 pacient se sníženou aktivitou KIV vykazoval normální parametry kapacity MEGS.



Obrázek : Oxidace ^{14}C pyruvátu v přítomnosti ADP a malátu nebo karnitinu (akceptor acetyl-CoA) (Upraveno podle Janssen et al., 2006a).



Obrázek : Oxidace ^{14}C malátu v přítomnosti pyruvátu nebo acetylkarnitinu (donor acetyl-CoA). (1) inhibiční místo pyruvátdehydrogenázy / 2-oxoglutarátdehydrogenázy (inhibice arzenitem). (2) inhibiční místo sukcinátdehydrogenázy (inhibice malonátem) (Upraveno podle Janssen et al., 2006a)

4.1.2. Měření spotřeby kyslíku

Základním biochemickým principem OXPHOS je transport elektronů přes komplexy dýchacího řetězce. Dochází tak k tvorbě protonového gradientu, který je následně využit k fosforylaci ADP. Finálním akceptorem elektronu je kyslík, který je redukován na vodu (odpadní produkt OXPHOS). Měření spotřeby kyslíku je důležitou funkční analýzou OXPHOS u pacientů, s podezřením na mitochondriální onemocnění.

4.1.2.1. Polarografie s využitím Clarkovy elektrody

Základní metodou, která měří spotřebu kyslíku, je polarografie s využitím Clarkovy elektrody. Měří se na čerstvě izolovaných mitochondriích, na permeabilizovaných buňkách či na tkáňových homogenátech v přítomnosti oxidovatelných substrátů (malát + pyruvát nebo malát + glutamát poskytující NADH, sukcinát poskytující $FADH_2$, durohydrochinon poskytuje elektrony přímo KIII a TMPD + askorbát poskytuje elektrony přímo cyt c), exogenně přidaného ADP nebo i inhibitorů (Li and Graham, 2012).

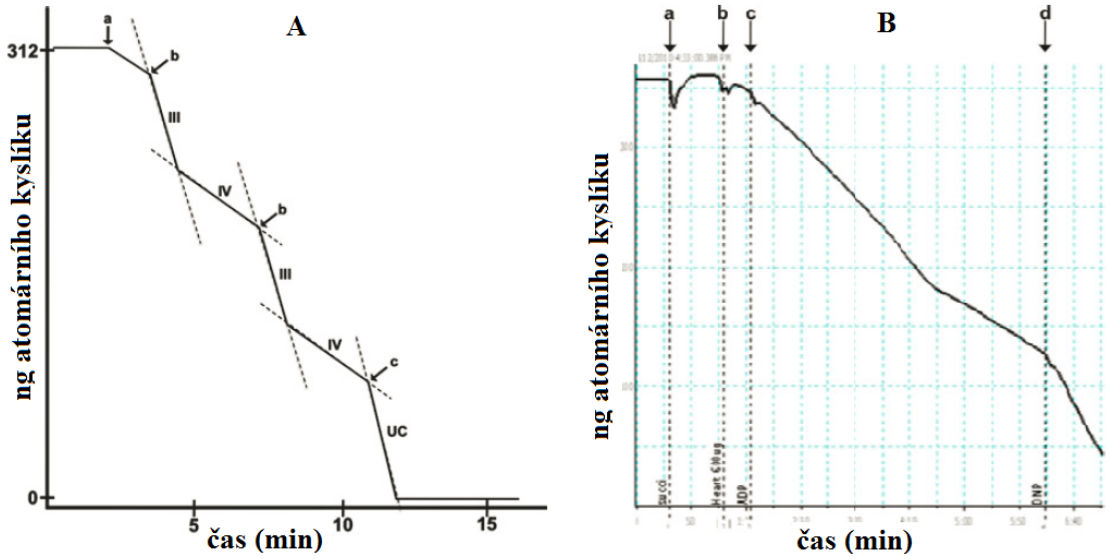
Specifické inhibitory komplexu I (rotenon) a komplexu III (antimycin A) spolu se substráty umožňují charakterizaci všech čtyř komplexů dýchacího řetězce v jednom měření (Wenchich et al., 2003).

Do polarografické komory se přidá čerstvě připravený respirační pufr a po ustálení se dodají požadované substráty (malát + glutamát nebo malát + pyruvát pro měření KI, sukcinát pro KII, TMPD + askorbát, redukující cyt c, pro měření KIV (Barrientos, 2002) (Trounce et al., 1996). Po přidání mitochondrií je spotřeba kyslíku nízká (stav IV, ADP limitující stav) v důsledku úniku protonů skrz vnitřní mitochondriální membránu. Přídavek ADP k mitochondriální frakci stimuluje fosforylaci a tím i spotřebu kyslíku (stav III, ADP stimulující stav). Jakmile je ADP spotřebováno, přechází mitochondrie zpět do stavu IV. Poté se přidá ADP podruhé a můžeme pozorovat stav III a přechod do stavu IV, podobně jako po prvním přidání. Nakonec se přidá rozpřahující protein[1] (DNP, CCCP nebo FCCP) a měří se rozpřažení respirace (z anglického uncoupled respiration rate) (Li and Graham, 2012).

Typické parametry, získané z mitochondriální polarografie, jsou stav III, stav IV, RCR (respirační kontrolní poměr), míra rozpřažení (z anglického uncoupled rate) a poměr ADP/O. Kontrolní respirační poměr (RCR, stav III/stav IV) je indikátorem integrity vnitřní mitochondriální membrány. Jeho citlivost je vhodná pro detekci deficitu OXPHOS. Poměr

[1] Rozpřahující protein vytvoří v membráně póry a tím se zruší protonový gradient. ATP syntáza, která tento gradient potřebuje k tvorbě ATP, přestává fungovat.

ADP/O je přímým ukazatelem efektivity fosforylace a může signalizovat abnormality spřažení nebo ATP syntázy. Míra rozpřažení signalizuje maximální respirační kapacitu.



Obrázek : A) ideální průběh polarografického měření. V čase „0“ je přidán substrát (glutamát + malát nebo sukcinát) do kolony. a) přidání izolovaných mitochondrií b) přidání ADP (po spotřebě ADP přechází stimulující stav III do limitujícího stavu IV) c) přidání DNP (stimulace maximálního rozpřažení)

B) typický průběh polarografického měření (sukcinát jako substrát) a) přidání sukcinátu b) přidání mitochondrií c) přidání ADP d) přidání DNP (upraveno podle Li and Graham, 2012)

U pacientů s deficitem KI je snížená respirace po přidání substrátů poskytujících NADH, zatímco dýchání v přítomnosti ostatních substrátů je normální. Pacienti s deficitem KII mají sníženou spotřebu kyslíku pouze u substrátů poskytujících $FADH_2$. Snížená respirace v přítomnosti substrátů poskytujících NADH i $FADH_2$ a normální respirace oxidace durohydrochinonu a TMPD + askorbátu naznačuje deficit CoQ. Snížená oxidace NADH i $FADH_2$ poskytujících substrátů spolu se sníženou oxidací durohydrochinonu naznačuje deficit KIII. Redukovaná oxidace všech substrátů naznačuje deficit KIV (Tulinius et al., 1991). Touto metodou lze detekovat i deficit PDH (Tulinius et al., 2005).

4.1.2.2. Měření respirace na permeabilizovaných svalových vláknech

Studie OXPHOS musí být provedena na neporušených mitochondriích. Měření spotřeby kyslíku se provádí na mitochondriích, izolovaných z tkání nebo buněk. Izolace se provádí diferenciální centrifugací. Ta přináší precizní funkční charakteristiku OXPHOS *in vitro,* má však i několik nevýhod. Může dojít k selekci části mitochondriální populace, k ovlivnění vlastností mitochondrií během izolace, rozrušení interakcí mezi jednotlivými mitochondriemi

a hlavně je potřeba relativně velký objem vzorku (buněk, tkáně) (shrnuto v Kuznetsov et al., 2008).

Využití nepermeablizovaných buněk je omezené. Mnoho efektorů nedokáže proniknout buněčnou membránou. Proto na neporušených preparátech nelze studovat mitochondriální odpovědi na některé substráty (například ADP, kreatin nebo cyt c). Aby byla překonána omezení, která přináší izolované mitochondrie, byly vyvinuty metody, zkoumající funkce mitochondrie na permeabilizovaných buňkách a na tkáňových homogenátech.

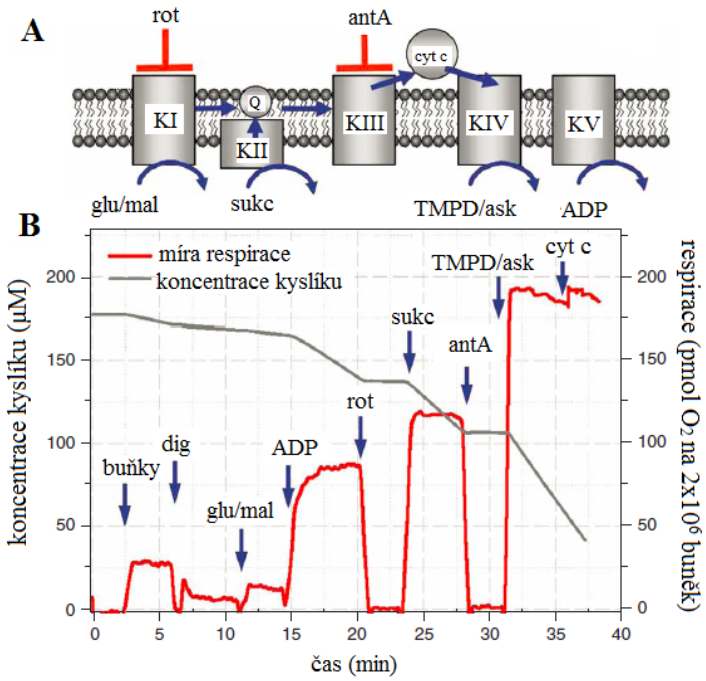
Schopnost některých chemických činidel (digitonin, saponin, filipin, α-solanin, α-tomatin a β-escin) interagovat s cholesterolem, vyskytujícím se na buněčných membránách, můžeme využít k permeabilizaci buněčných membrán. Permeabilizovaná svalová vlákna nebo buňky jsou schopné zpracovat různé substráty, vysoce citlivé na specifické inhibitory, což znázorňuje funkční neporušenost mitochondrií.

Studie *in situ* umožňuje analýzu mitochondrií jako integrovaného buněčného systému (v jejich přirozené pozici v buňce, uchovává nepostradatelnou interakci s cytoskeletem, jádrem a ER). Mitochondrie jsou považovány za centrální část mnoha signálních buněčných kaskád, proto je jejich funkce silně regulována architekturou buňky, uspořádáním a morfologií mitochondrií. To má vliv i na dynamiku mitochondriální sítě, pohyblivost mitochondrií a jejich interakci s cytoskeletem. Ačkoli mitochondriální dynamika může být během permeabilizace buněk ztracena, základní interakce zůstávají neporušené. Měření *in situ* se více podobá situaci v živých buňkách než měření na izolovaných mitochondriích (shrnuto v Kuznetsov et al., 2008).

In situ metoda má ale i své nevýhody. Přináší informace o celkové mitochondriální populaci, ale nelze pomocí ní studovat jednotlivé mitochondriální podskupiny (například subsarkolemální, intermyofibrilární a perinukleární). Dále během permeabilizace dochází ke ztrátě cytoplasmy a veškerých rozpustných komponentů buňky, a proto nelze studovat mechanismus vlivu signální transdukce. Též nelze studovat například změnu pH buňky, koncentrace vápníku a metabolitů. Avšak tento problém lze překonat měnícím se složením inkubace (Kuznetsov et al., 2008).

Kontrola kvality permeabilizace je ověřována přidáním redukovaného cyt c. Nedojde-li k porušení vnější membrány mitochondrie, exogenně přidaný cyt c nemá na mitochondriální respiraci vliv. V případě, kdy došlo k porušení vnější membrány, se cyt c uvolní z mezimembránového prostoru a respirace je inhibována. Přidáním cyt c do polarografické

komory výrazně zvyšuje spotřebu kyslíku. Po vyčerpání cyt c je dýchání inhibováno, jelikož komplexu IV nejsou dodávány elektrony. Stejně jako v případě měření spotřeby kyslíku v izolovaných mitochondriích se do komory postupně přidávají substráty a inhibitory komplexů OXHOS. Titrace substrátů a inhibitorů umožňuje detekovat a lokalizovat defekty dýchacího řetězce. Míra spotřeby kyslíku se vztahuje na mg suché váhy svalových vláken (Kuznetsov et al., 2008).



Obrázek : A) schéma komplexů systému oxidativní fosforylace se substráty a inhibitory. B) příklad polarografického měření permeabilizovaných buněk po přidání jednotlivých substrátů a inhibitorů komplexů dýchacího řetězce (upraveno podle Kuznetsov et al., 2008).

Vysvětlení zkratek: antA (antimycin A), ask (askorbát), dig (digitonin), glu (glutamát), mal (malát), rot (rotenon), sukc (sukcinát), TMPD (N,N,N',N'-tetramethyl-p-fenylendiamin)

Respirometrie permeabilizovaných svalových vláken, tkání a buněk je spolehlivou metodou funkční analýzy mitochondrií *in situ*, zachovávající nezbytnou interakci mitochondrií s ostatními komponenty buňky. Je to citlivá metoda vhodná k detekci mitochondriálních onemocnění. Její výhodou je minimalizace velikosti vzorku, který je na analýzu potřeba. Je tedy vhodná zejména na studii vzorků získaných biopsií, kdy je množství dostupné tkáně omezené.

4.1.2.3. Měření spotřeby kyslíku pomocí fluorescenční sondy (z anglického Phosphorescent-based oxygen sensing probe assay)

Vysokokapacitní fluorescenční metoda (z anglického high-throughput fluorescence-based methodology), analyzující spotřebu kyslíku, přináší informace o celkovém funkčním

stavu tvorby energie v mitochondriích. Na rozdíl od polarografie využívající Clarkovu elektrodu má tato metoda vyšší kapacitu. Lze jí využít k analýze různých typů buněk. Měření se provádí ihned po permeabilizaci buněk, přidáním substrátů (pyruvát + malát), fluorescenční sondy, s nebo bez přidání ADP (k určení maximální respirační kapacity je ADP přidáváno v nadbytku). K regeneraci ADP se používá kreatin. Dále se k izolaci vzorku od okolního kyslíku (mohl by zničit kyslíkový gradient) používá minerální olej (Will et al., 2006). Vzorky jsou měřeny v 96 jamkové destičce pomocí přístroje (Viktor 2; PerkinElmer), snímajícího fluorescenci každých 5 minut po dobu 55 min, při teplotě 37 °C. Relativní spotřeba kyslíku (ROCR) se odečte z nejrychleji vzrůstající lineární části fluorescenční křivky, což umožňuje porovnání respirace různých vzorků mezi sebou (Jonckheere et al., 2010). Výsledky jsou normalizované na aktivitu CS.

K měření jsou přidávány specifické inhibitory: rotenon (KI), antimycin A (KIII), azid (KIV), oligomycin (KV), atraktylosid (ANT), α-hydroxykyanocinamát (pyruvátový přenašeč) a arsenit (PDH a α-ketoglutarát dehydrogenáza). Všechny tyto inhibitory výrazně snižují spotřebu kyslíku (Jonckheere et al., 2010).

Tuto metodu lze využít i jako doplňující, rychlý a efektivní, diagnostický nástroj při vyšetření kultivovaných buněk pacienta (například fibroblasty). Je ale třeba měřit časnou pasáž a měřit nejméně ve dvou nezávislých pokusech. Deficit ATP syntázy lze detekovat přidáním rozpřahovače (CCCP). Lze měřit jak na permeabilizovaných buňkách, tak na izolovaných mitochondriích (Jonckheere et al., 2010).

U některých pacientů se sníženou produkcí ATP byla identifikována snížená spotřeba kyslíku, avšak normální aktivita komplexů OXPHOS a PDH. Toto zjištění naznačuje, že jsou další, zatím neidentifikované, defekty energetického metabolismu odpovědné za nižší spotřebu kyslíku. Dále některé defekty, identifikované ve svalech, vykazují normální respiraci ve fibroblastech (*POLG* mutace (gen pro mitochondriální DNA polymerázu γ) nebo také sekundární dysfunkce mitochondriálního energetického metabolismu – anorexie, malnutrice (Morava et al., 2006)).

Výhody této metody oproti oxidaci substrátu jsou zejména: jednoduchost, menší požadavek na buněčný materiál a absence izotopů. Na rozdíl od klasické polarografie, je díky omezení zpětné difuze, míra spotřeby kyslíku monitorována s větší přesností. Vyžaduje relativně malý objem vzorku a umožňuje měření při různých podmínkách současně. Navíc lze

využít i k měření buněčných linií s relativně nižší mitochondriální aktivitou (například fibroblasty) (Jonckheere et al., 2010).

4.2. Tkáně, z kterých se analýza provádí

U myopatií je kosterní svalovina nejvhodnějším typem tkáně. Nejčastěji se využívají svaly *musculus quadriceps femoris*, *musculus tibialis anterior* a *musculus deltoideus*. U pacientů, kteří mají zasažený hematopoetický systém může být analýza provedena na lymfocytech periferní krve (shrnuto v Grazina, 2012). U chorob postihujících játra a srdce se doporučuje biopsie jater a myokardu. U nemocí s postižením orgánů, ke kterým je náročný přístup (mozek, retina, endokrinní žlázy, hladká svalovina) se na analýzu využívají periferní tkáně (kosterní svalovina, kultivované fibroblasty a lymfocyty). Vždy, nezávisle na tkáni, která je zasažena, se provádí kožní biopsie k získání buněčné kultury (shrnuto v Grazina, 2012). Na analýzu lze použít i autoptickou tkáň, je-li odebrána do 2 hodin po smrti.

Ve většině případů se pro analýzu OXPHOS používají vzorky svalové biopsie. Vzhledem k tomu, že v některých případech (mtDNA mutace genu pro ND6 a deficit KI) nemusí být deficit ve svalu identifikovatelný, ale naopak může být identifikovatelný ve fibroblastech (Ugalde et al., 2003), je vhodné analýzu provést paralelně na dvou tkáních (svalová a fibroblasty).

5. Závěr

Vzhledem k heterogenitě klinických projevů mitochondriálních onemocnění a slabé korelaci mezi genotypem a fenotypem se upřednostňuje provedení několika funkčních analýz k charakterizaci deficitu OXPHOS. Současně se k analýze OXPHOS používají metody: měření enzymatických aktivit komplexů OXPHOS, měření kapacity mitochondriálního energetického metabolismu a měření spotřeby kyslíku.

Spektrofotometrická data přináší cenné informace o maximální enzymatické aktivitě jednotlivých komplexů OXPHOS. Analýza však poskytuje široké rozmezí výsledků u pacientů s poruchou některého z komplexů dýchacího řetězce, přičemž někteří pacienti vykazují i normální enzymatickou aktivitu. Tato skutečnost může být způsobena použitím syntetických substrátů v podmínkách *in vitro*, které nekorespondují s přirozeným prostředím buňky.

Proto samotná spektrofotometrická analýza k diagnostice mitochondriálních onemocnění nestačí a je následována dalšími metodami, které analyzují celkovou funkčnost OXPHOS.

Měření kapacity mitochondriálního energetického metabolismu přináší důležité informace, vedoucí k lokalizaci primárního deficitu. Tato metoda se ukazuje být citlivější na detekci mitochondriálního onemocnění oproti měření enzymatických aktivit jednotlivých komplexů OXPHOS. Během studie 24 pacientů s MELAS syndromem, 8 pacientů vykazovalo snížený jeden nebo více parametrů kapacity mitochondriálního energetického metabolismu, zatímco enzymatické měření těchto pacientů poskytovalo hodnoty jako u zdravého jedince.

Další metodou sloužící pro celkovou funkční charakteristiku OXPHOS je polarografická metoda detekce spotřeby kyslíku. Výhodou této metody, oproti oxidaci substrátu, je zejména to, že není třeba práce s radioaktivním materiálem. Nepokrývá však tak široké spektrum metabolických drah.

Vysokokapacitní fluorescenční metoda ve srovnání s klasickou polarografií, využívající Clarkovu elektrodu, umožňuje detekci spotřeby kyslíku s vyšší přesností, vyžaduje menší množství vzorku a navíc umožňuje měření za různých podmínek současně.

Pro co nejpřesnější funkční charakterizaci OXPHOS u pacientů s podezřením na mitochondriální onemocnění by měly být zhotoveny alespoň 2 výše zmíněné funkční analýzy a to nejlépe na dvou různých tkáních zároveň.

6. Přehled použité literatury

Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., et al. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature *290*, 457–465.

Angerer, H., Zwicker, K., Wumaier, Z., Sokolova, L., Heide, H., Steger, M., Kaiser, S., Nübel, E., Brutschy, B., Radermacher, M., et al. (2011). A scaffold of accessory subunits links the peripheral arm and the distal proton-pumping module of mitochondrial complex I. Biochem. J. *437*, 279–288.

Azzu, V., and Brand, M.D. (2010). The on/off switches of the mitochondrial uncoupling proteins. Trends Biochem. Sci. *35*, 298–307.

Balsa, E., Marco, R., Perales-Clemente, E., Szklarczyk, R., Calvo, E., Landázuri, M.O., and Enríquez, J.A. (2012). NDUFA4 is a subunit of complex IV of the mammalian electron transport chain. Cell Metab. *16*, 378–386.

Barragán-Campos, H.M., Vallée, J.-N., Lô, D., Barrera-Ramírez, C.F., Argote-Greene, M., Sánchez-Guerrero, J., Estañol, B., Guillevin, R., and Chiras, J. (2005). Brain magnetic resonance imaging findings in patients with mitochondrial cytopathies. Arch. Neurol. *62*, 737–742.

Barragán-Campos H, Vallée J, Lô D, and et al (2005). BRain magnetic resonance imaging findings in patients with mitochondrial cytopathies. Arch. Neurol. *62*, 737–742.

Barrientos, A. (2002). In vivo and in organello assessment of OXPHOS activities. Methods San Diego Calif *26*, 307–316.

Brand, M.D., and Nicholls, D.G. (2011). Assessing mitochondrial dysfunction in cells. Biochem. J. *435*, 297–312.

Brandt, U. (1996). Bifurcated ubihydroquinone oxidation in the cytochrome bc1 complex by proton-gated charge transfer. FEBS Lett. *387*, 1–6.

Cairns, R.A., Harris, I.S., and Mak, T.W. (2011). Regulation of cancer cell metabolism. Nat. Rev. Cancer *11*, 85–95.

Capaldi, R.A. (1990). Structure and Function of Cytochrome c Oxidase. Annu. Rev. Biochem. *59*, 569–596.

Carroll, J., Fearnley, I.M., Skehel, J.M., Shannon, R.J., Hirst, J., and Walker, J.E. (2006). Bovine Complex I Is a Complex of 45 Different Subunits. J. Biol. Chem. *281*, 32724–32727.

Cecchini, G. (2003). Function and structure of complex II of the respiratory chain. Annu. Rev. Biochem. *72*, 77–109.

Čížková, A., Stránecký, V., Mayr, J.A., Tesařová, M., Havlíčková, V., Paul, J., Ivánek, R., Kuss, A.W., Hansíková, H., Kaplanová, V., et al. (2008). TMEM70 mutations cause isolated ATP synthase deficiency and neonatal mitochondrial encephalocardiomyopathy. Nat. Genet. *40*, 1288–1290.

Cree, L.M., Samuels, D.C., and Chinnery, P.F. (2009). The inheritance of pathogenic mitochondrial DNA mutations. Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis. *1792*, 1097–1102.

Diaz, F., Kotarsky, H., Fellman, V., and Moraes, C.T. (2011). Mitochondrial disorders caused by mutations in respiratory chain assembly factors. Semin. Fetal. Neonatal Med. *16*, 197–204.

DiMauro, S., and Schon, E.A. (2003). Mitochondrial respiratory-chain diseases. N. Engl. J. Med. *348*, 2656–2668.

Dröse, S., Krack, S., Sokolova, L., Zwicker, K., Barth, H.-D., Morgner, N., Heide, H., Steger, M., Nübel, E., Zickermann, V., et al. (2011). Functional dissection of the proton pumping modules of mitochondrial complex I. PLoS Biol. *9*, e1001128.

Frazier, A.E., and Thorburn, D.R. (2012). Biochemical analyses of the electron transport chain complexes by spectrophotometry. Methods Mol. Biol. Clifton NJ *837*, 49–62.

Frey, T.G., and Mannella, C.A. (2000). The internal structure of mitochondria. Trends Biochem. Sci. *25*, 319–324.

Goodsell, D.S. (2010). Mitochondrion. Biochem. Mol. Biol. Educ. *38*, 134–140.

Gray, M.W. (2012). Mitochondrial Evolution. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *4*, a011403–a011403.

Grazina, M.M. (2012). Mitochondrial respiratory chain: biochemical analysis and criterion for deficiency in diagnosis. Methods Mol. Biol. Clifton NJ *837*, 73–91.

Haas, R.H., Parikh, S., Falk, M.J., Saneto, R.P., Wolf, N.I., Darin, N., and Cohen, B.H. (2007). Mitochondrial Disease: A Practical Approach for Primary Care Physicians. Pediatrics *120*, 1326–1333.

Haas, R.H., Parikh, S., Falk, M.J., Saneto, R.P., Wolf, N.I., Darin, N., Wong, L.-J., Cohen, B.H., and Naviaux, R.K. (2008). The in-depth evaluation of suspected mitochondrial disease. Mol. Genet. Metab. *94*, 16–37.

Habersetzer, J., Larrieu, I., Priault, M., Salin, B., Rossignol, R., Brèthes, D., and Paumard, P. (2013). Human F1F0 ATP synthase, mitochondrial ultrastructure and OXPHOS impairment: a (super-) complex matter? PloS One *8*, e75429.

Hejzlarová, K., Mráček, T., Vrbacký, M., Kaplanová, V., Karbanová, V., Nůsková, H., Pecina, P., and Houštěk, J. (2014). Nuclear genetic defects of mitochondrial ATP synthese. Physiol. Res. Acad. Sci. Bohemoslov. *63 Suppl 1*, S57–71.

Van den Heuvel, L., and Smeitink, J. (2001). The oxidative phosphorylation (OXPHOS) system: nuclear genes and human genetic diseases. BioEssays *23*, 518–525.

Hirano, M., Marti, R., Ferreiro-Barros, C., Vilà, M.R., Tadesse, S., Nishigaki, Y., Nishino, I., and Vu, T.H. (2001). Defects of intergenomic communication: autosomal disorders that cause multiple deletions and depletion of mitochondrial DNA. Semin. Cell Dev. Biol. *12*, 417–427.

Hirst, J. (2013). Mitochondrial complex I. Annu. Rev. Biochem. *82*, 551–575.

Houštěk, J., Kmoch, S., and Zeman, J. (2009). TMEM70 protein — A novel ancillary factor of mammalian ATP synthase. Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg. *1787*, 529–532.

Chaban, Y., Boekema, E.J., and Dudkina, N.V. (2013). Structures of mitochondrial oxidative phosphorylation supercomplexes and mechanisms for their stabilisation. Biochim. Biophys. Acta.

Chretien, D., Gallego, J., Barrientos, A., Casademont, J., Cardellach, F., Munnich, A., Rötig, A., and Rustin, P. (1998). Biochemical parameters for the diagnosis of mitochondrial respiratory chain deficiency in humans, and their lack of age-related changes. Biochem. J. *329 (Pt 2)*, 249–254.

Iwata, S., Lee, J.W., Okada, K., Lee, J.K., Iwata, M., Rasmussen, B., Link, T.A., Ramaswamy, S., and Jap, B.K. (1998). Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc1 complex. Science *281*, 64–71.

Janssen, A.J.M., Trijbels, F.J.M., Sengers, R.C.A., Wintjes, L.T.M., Ruitenbeek, W., Smeitink, J.A.M., Morava, E., Engelen, B.G.M. van, Heuvel, L.P. van den, and Rodenburg, R.J.T. (2006a). Measurement of the Energy-Generating Capacity of Human Muscle Mitochondria: Diagnostic Procedure and Application to Human Pathology. Clin. Chem. *52*, 860–871.

Janssen, A.J.M., Schuelke, M., Smeitink, J.A.M., Trijbels, F.J.M., Sengers, R.C.A., Lucke, B., Wintjes, L.T.M., Morava, E., van Engelen, B.G.M., Smits, B.W., et al. (2008). Muscle 3243A-->G mutation load and capacity of the mitochondrial energy-generating system. Ann. Neurol. *63*, 473–481.

Janssen, R.J.R.J., Nijtmans, L.G., van den Heuvel, L.P., and Smeitink, J.A.M. (2006b). Mitochondrial complex I: structure, function and pathology. J. Inherit. Metab. Dis. *29*, 499–515.

Jonckheere, A.I., Huigsloot, M., Janssen, A.J.M., Kappen, A.J.H., Smeitink, J.A.M., and Rodenburg, R.J.T. (2010). High-throughput assay to measure oxygen consumption in digitonin-permeabilized cells of patients with mitochondrial disorders. Clin. Chem. *56*, 424–431.

Jonckheere, A.I., Smeitink, J.A.M., and Rodenburg, R.J.T. (2012). Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology. J. Inherit. Metab. Dis. *35*, 211–225.

Kirby, D.M., Crawford, M., Cleary, M.A., Dahl, H.H., Dennett, X., and Thorburn, D.R. (1999). Respiratory chain complex I deficiency: an underdiagnosed energy generation disorder. Neurology *52*, 1255–1264.

Kirby, D.M., Thorburn, D.R., Turnbull, D.M., and Taylor, R.W. (2007). Biochemical assays of respiratory chain complex activity. Methods Cell Biol. *80*, 93–119.

Kuznetsov, A.V., Veksler, V., Gellerich, F.N., Saks, V., Margreiter, R., and Kunz, W.S. (2008). Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. Nat. Protoc. *3*, 965–976.

Lamprecht, W., Stein, P., Heinz, F., and Weisser, H. (1974). Determination with creatine kinase, hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. In Methods of Enzymatic Analysis, pp. 1777–1781.

Li, Z., and Graham, B.H. (2012). Measurement of mitochondrial oxygen consumption using a Clark electrode. Methods Mol. Biol. Clifton NJ *837*, 63–72.

Logan, D.C. (2006). The mitochondrial compartment. J. Exp. Bot. *57*, 1225–1243.

Lönnqvist, T., Paetau, A., Valanne, L., and Pihko, H. (2009). Recessive twinkle mutations cause severe epileptic encephalopathy. Brain *132*, 1553–1562.

Luft, R., Ikkos, D., Palmieri, G., Ernster, L., and Afzelius, B. (1962). A case of severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: a correlated clinical, biochemical, and morphological study. J. Clin. Invest. *41*, 1776–1804.

Milone, M., and Wong, L.-J. (2013). Diagnosis of mitochondrial myopathies. Mol. Genet. Metab. *110*, 35–41.

Morava, E., Rodenburg, R., van Essen, H.Z., De Vries, M., and Smeitink, J. (2006). Dietary intervention and oxidative phosphorylation capacity. J. Inherit. Metab. Dis. *29*, 589.

Nelson, D.L., Cox, M.M., and Lehninger, A.L. (2008). Lehninger principles of biochemistry (New York, NY [u.a.: Freeman).

Palade, G.E. (1952). The fine structure of mitochondria. Anat. Rec. *114*, 427–451.

Pitceathly, R.D.S., Rahman, S., Wedatilake, Y., Polke, J.M., Cirak, S., Foley, A.R., Sailer, A., Hurles, M.E., Stalker, J., Hargreaves, I., et al. (2013). NDUFA4 mutations underlie dysfunction of a cytochrome c oxidase subunit linked to human neurological disease. Cell Rep. *3*, 1795–1805.

Quinzii, C.M., and Hirano, M. (2010). Coenzyme Q and mitochondrial disease. Dev. Disabil. Res. Rev. *16*, 183–188.

Robertson, D.E., Ding, H., Chelminski, P.R., Slaughter, C., Hsu, J., Moomaw, C., Tokito, M., Dutton, P.L., and Daldal, F. (1993). Hydroubiquinone-cytochrome c2 oxidoreductase from Rhodobacter capsulatus: Definition of a minimal, functional isolated preparation. Biochemistry (Mosc.) *32*, 1310–1317.

Rodenburg, R.J.T. (2011). Biochemical diagnosis of mitochondrial disorders. J. Inherit. Metab. Dis. *34*, 283–292.

Rustin, P., Chretien, D., Bourgeron, T., Gérard, B., Rötig, A., Saudubray, J.M., and Munnich, A. (1994). Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem. *228*, 35–51.

Schaefer, A.M., Taylor, R.W., Turnbull, D.M., and Chinnery, P.F. (2004). The epidemiology of mitochondrial disorders—past, present and future. Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg. *1659*, 115–120.

Schapira, A.H.V. (2002). Primary and secondary defects of the mitochondrial respiratory chain. J. Inherit. Metab. Dis. *25*, 207–214.

Schultz, B.E., and Chan, S.I. (2001). Structures and proton-pumping strategies of mitochondrial respiratory enzymes. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. *30*, 23–65.

Senoo-Matsuda, N., Yasuda, K., Tsuda, M., Ohkubo, T., Yoshimura, S., Nakazawa, H., Hartman, P.S., and Ishii, N. (2001). A Defect in the Cytochrome b Large Subunit in Complex II Causes Both Superoxide Anion Overproduction and Abnormal Energy Metabolism in Caenorhabditis elegans. J. Biol. Chem. *276*, 41553–41558.

Sleigh, A., Raymond-Barker, P., Thackray, K., Porter, D., Hatunic, M., Vottero, A., Burren, C., Mitchell, C., McIntyre, M., Brage, S., et al. (2011). Mitochondrial dysfunction in patients with primary congenital insulin resistance. J. Clin. Invest. *121*, 2457–2461.

Spinazzi, M., Casarin, A., Pertegato, V., Salviati, L., and Angelini, C. (2012). Assessment of mitochondrial respiratory chain enzymatic activities on tissues and cultured cells. Nat. Protoc. *7*, 1235–1246.

Srinivasan, S., and Avadhani, N.G. (2012). Cytochrome c oxidase dysfunction in oxidative stress. Free Radic. Biol. Med. *53*, 1252–1263.

Sun, F., Huo, X., Zhai, Y., Wang, A., Xu, J., Su, D., Bartlam, M., and Rao, Z. (2005). Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. Cell *121*, 1043–1057.

T Yagi, T.Y. (1998). Procaryotic complex I (NDH-1), an overview. Biochim. Biophys. Acta *1364*, 125–133.

Thorburn, D.R., Chow, C.W., and Kirby, D.M. (2004). Respiratory chain enzyme analysis in muscle and liver. Mitochondrion *4*, 363–375.

Trounce, I.A., Kim, Y.L., Jun, A.S., and Wallace, D.C. (1996). Assessment of mitochondrial oxidative phosphorylation in patient muscle biopsies, lymphoblasts, and transmitochondrial cell lines. Methods Enzymol. *264*, 484–509.

Tseng, Y.-H., Cypess, A.M., and Kahn, C.R. (2010). Cellular Bioenergetics as a Target for Obesity Therapy. Nat. Rev. Drug Discov. *9*, 465–482.

Tulinius, M., Darin, N., Wiklund, L.-M., Holmberg, E., Eriksson, J.E., Lissens, W., Meirleir, L.D., and Holme, E. (2005). A family with pyruvate dehydrogenase complex deficiency due to a novel C>T substitution at nucleotide position 407 in exon 4 of the X-linked E1α gene. Eur. J. Pediatr. *164*, 99–103.

Tulinius, M.H., Holme, E., Kristiansson, B., Larsson, N.G., and Oldfors, A. (1991). Mitochondrial encephalomyopathies in childhood. I. Biochemical and morphologic investigations. J. Pediatr. *119*, 242–250.

Turunen, M., Olsson, J., and Dallner, G. (2004). Metabolism and function of coenzyme Q. Biochim. Biophys. Acta *1660*, 171–199.

Ugalde, C., Triepels, R.H., Coenen, M.J.H., van den Heuvel, L.P., Smeets, R., Uusimaa, J., Briones, P., Campistol, J., Majamaa, K., Smeitink, J.A.M., et al. (2003). Impaired complex I assembly in a Leigh syndrome patient with a novel missense mutation in the ND6 gene. Ann. Neurol. *54*, 665–669.

Valanne, L., Ketonen, L., Majander, A., Suomalainen, A., and Pihko, H. (1998). Neuroradiologic findings in children with mitochondrial disorders. Am. J. Neuroradiol. *19*, 369–377.

Venditti, P., Di Stefano, L., and Di Meo, S. (2013). Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. Mitochondrion *13*, 71–82.

Walker, U.A., Collins, S., and Byrne, E. (1996). Respiratory Chain Encephalomyopathies: A Diagnostic Classification. Eur. Neurol. *36*, 260–267.

Watt, I.N., Montgomery, M.G., Runswick, M.J., Leslie, A.G.W., and Walker, J.E. (2010). Bioenergetic cost of making an adenosine triphosphate molecule in animal mitochondria. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *107*, 16823–16827.

Wenchich, L., Drahota, Z., Honzík, T., Hansíková, H., Tesarová, M., Zeman, J., and Houstek, J. (2003). Polarographic evaluation of mitochondrial enzymes activity in isolated mitochondria and in permeabilized human muscle cells with inherited mitochondrial defects. Physiol. Res. Acad. Sci. Bohemoslov. *52*, 781–788.

Will, Y., Hynes, J., Ogurtsov, V.I., and Papkovsky, D.B. (2006). Analysis of mitochondrial function using phosphorescent oxygen-sensitive probes. Nat. Protoc. *1*, 2563–2572.

Wolf, N.I. (2010). Suspected Mitochondrial Disorder. In Inherited Metabolic Diseases, (Springer), pp. 325–333.

Yang, D., Oyaizu, Y., Oyaizu, H., Olsen, G.J., and Woese, C.R. (1985). Mitochondrial origins. Proc. Natl. Acad. Sci. *82*, 4443–4447.

Zheng, X.X., Shoffner, J.M., Voljavec, A.S., and Wallace, D.C. (1990). Evaluation of procedures for assaying oxidative phosphorylation enzyme activities in mitochondrial myopathy muscle biopsies. Biochim. Biophys. Acta *1019*, 1–10.