

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní obor: Fyziologie živočichů a člověka (NFYZZIV)



Bc. Žaneta Dosoudilová

**ANALÝZA VYBRANÝCH MITOCHONDRIÁLNÍCH PROTEINŮ VE
SVALOVÉ TKÁNI PRASEČÍHO MODELU HUNTINGTONOVY CHOROBY**

PROTEIN ANALYSIS OF SELECTED MITOCHONDRIAL PROTEINS
IN THE MUSCLE TISSUE OF PORCINE MODEL OF HUNTINGTON'S
DISEASE

Diplomová práce

vedoucí práce: MUDr. Jiří Klempíř, Ph.D.

Praha, 2016

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

V Praze dne 1. 8. 2016

.....

Poděkování

Děkuji RNDr. Haně Hansíkové, CSc. za umožnění vykonání praktické části této diplomové práce v Laboratoři pro studium mitochondriálních poruch a za její odborný dozor s cennými připomínkami. Velice také děkuji svému školiteli MUDr. Jiřímu Klempíři, Ph.D. za vedení této diplomové práce a neocenitelné rady po celý její průběh. Dále děkuji týmu prof. MVDr. Jana Motlíka, DrSc. z ÚŽFG AVČR v Liběchově za biologický materiál, pocházející z prasečího modelu HN, který poskytl ke studii. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat skupině pracovníků Laboratoře pro studium mitochondriálních poruch 1. LF UK za pomoc při provádění experimentů a vytvoření přátelské atmosféry, zejména Mgr. Haně Štufkové.

Diplomová práce vznikla s podporou grantových projektů CHDI Foundation (A-8248), Czech-Norwegian Research Programme (7F14308), 28477/2014 - "HUNTINGTON" 7F14308 (MŠMT), ExAM (CZ.1.05./2.1.00/03.0124) a RVO-VFN 64165, COST LD (15099), NPU L01609 (MŠMT).

Obsah

Abstrakt	6
Seznam použitých zkratek	8
Úvod	10
1. Mitochondrie	11
1.1 Struktura mitochondrií	11
1.2 Systém oxidativní fosforylace	13
1.2.1 Komplex I - NADH-koenzym Q oxidoreduktáza	13
1.2.2 Komplex II - sukcinát-koenzym Q oxidoreduktáza	15
1.2.3 Komplex III - ubichinol-cytochrom c oxidoreduktáza	16
1.2.4 Komplex IV - cytochrom c oxidáza	17
1.2.5 Komplex V - F ₀ F ₁ ATP syntáza	19
1.2.6 Superkomplexy	20
1.2.7 Pyruvátdehydrogenázový komplex	21
1.3 Mitochondriální genom	22
1.4 Mitochondriální poruchy	24
2. Huntingtonova nemoc	25
2.1 Symptomy Huntingtonovy nemoci	25
2.2 Huntingtin	27
2.2.1 Mutovaný huntingtin v mitochondriích	27
2.3 Patologie kosterního svalu při Huntingtonově nemoci	29
2.4 Modely Huntingtonov nemoci	29
3. Cíle práce	31
4. Materiál a metody	32
4.1 Použité přístroje	32
4.2 Software	33
4.3 Použité chemikálie	33
4.3.1 Komerční chemikálie a směsi	33
4.3.2 Roztoky připravené v laboratoři	34

4.4	Biologický materiál	35
4.5	Metody	36
4.5.1	Příprava homogenátu a mitochondriální frakce z kosterního svalu	37
4.5.2	Příprava vzorků na SDS-PAGE	37
4.5.3	Stanovení koncentrace proteinů dle Bradfordové	38
4.5.4	SDS-PAGE	39
4.5.5	Semi – dry western blot	39
4.5.6	Barvení a sušení gelu	40
4.5.7	Imunodetekce se specifickou protilátkou	40
4.5.8	Vyhodnocení dat	41
5.	Výsledky	42
5.1	Analýza vybraných mitochondriálních proteinů ve svalové tkáni prasečího modelu Huntingtonovy choroby ve věku 24 měsíců	43
5.2	Analýza vybraných mitochondriálních proteinů ve svalové tkáni prasečího modelu Huntingtonovy choroby ve věku 36 měsíců	48
5.3	Analýza vybraných mitochondriálních proteinů ve svalové tkáni prasečího modelu Huntingtonovy choroby ve věku 48 měsíců	53
5.4	Shrnutí změn exprese sledovaných proteinů	58
6.	Diskuze	69
7.	Závěr	72
8.	Přehled použitých literárních zdrojů	73
9.	Příloha	80

Abstrakt

Huntingtonova nemoc (Huntington's disease; HN) je autozomálně dominantní dědičné neurodegenerativní onemocnění projevující se poruchami hybnosti, kognitivních funkcí a poruchami chování. HN je způsobena expanzí CAG tripletů (cytosin-adenosin-guanin) v genu uloženém na krátkém raménku 4. chromosomu. Tato expanze kóduje aberantní polyglutaminový řetězec v proteinu huntingtin (HTT). Fyziologický HTT a v případě HN mutovaný HTT (mHTT) se exprimují téměř ve všech tkáních a ovlivňují řadu buněčných funkcí. Počet nemocných je zhruba 1 na 10.000 obyvatel. V současnosti je tato nemoc nevyléčitelná a její mechanismy nejsou dostatečně dobře prozkoumány. Postihuje kromě centrální nervové soustavy také periferní tkáň včetně svalstva. Při HN dochází k narušení mitochondriálních funkcí a poškození systému oxidativní fosforylace, jež má za úkol produkci energie ve formě ATP. Výzkum na zvířecím modelu miniaturního transgenního HN prasete by mohl pomoci objasnit mechanismy patogeneze choroby a potenciální léčebnou strategii.

V této práci byly metodou imunodetekce se specifickými protilátkami sledovány změny množství 14 vybraných mitochondriálních proteinů ve svalové tkáni u 3 věkových skupin transgenních HN miniprasat ve věku 24, 36 a 48 měsíců. S rostoucím věkem byla pozorována postupná progrese trendu snižování množství vybraných mitochondriálních proteinových enzymů patřící do systému oxidativní fosforylace i proteinů souvisejících s oxidativním stresem či destabilizací mitochondriální struktury.

Klíčová slova:

Huntingtonova choroba, huntingtin, mitochondrie, systém oxidativní fosforylace, OXPHOS, prasečí model Huntingtonovy choroby, transgenní model

Abstract

Huntington's disease (HD) is an autosomal dominant hereditary neurodegenerative disease characterized by motor, cognitive and behavioral disorders. HD is caused by expansion of CAG triplet (cytosine-adenosine-guanine) located in a gene on the short arm of the fourth chromosome. This expansion encodes an aberrant polyglutamine chain in the protein huntingtin. Physiological and mutated huntingtin (in case of HD) are expressed in almost all tissues and influences many cellular functions. The prevalence of HD in population is about 1 per 10.000. The disease is currently incurable and its mechanisms are not sufficiently understood. Besides affecting the central nervous system HD also affects peripheral tissues, including skeletal muscles. HD disrupts mitochondrial function and damages oxidative phosphorylation system, which has the task of producing energy in the form of ATP in cells. Research of transgenic minipig model for HD could help elucidate the mechanisms of disease's pathogenesis and potential therapeutic strategy.

In this diploma thesis, immunodetection with help of specific antibodies to detect changes in amount of 14 selected mitochondrial proteins in skeletal muscle tissue of three age groups of transgenic HD minipigs - 24, 36 and 48 months old was used. Gradual progression in reduced amounts of selected mitochondrial enzymes belonging to the oxidative phosphorylation and proteins associated with oxidative stress and mitochondrial structure destabilization was found increasing with age.

Keywords:

Huntington's disease, huntingtin, mitochondria, oxidative phosphorylation system, OXPHOS, porcine model of Huntington's disease, transgenic model

Seznam použitých zkratek

- ADP adenosindifosfát
- APS persíran amonný (*ammonium persulfate*)
- ATP adenosintrifosfát
- bp páry bází (*base pair*)
- BSA hovězí sérový albumin (*bovine serum albumin*)
- CAG cytosin-adenin-guanin
- Ca²⁺ vápenatý kationt
- CORE1 podjednotka 1 komplexu III
- COX1, 5 α podjednotka 1 nebo 5 α cytochrom c oxidázy (komplexu IV)
- ddH₂O destilovaná voda
- DNA deoxyribonukleová kyselina (*deoxyribonucleic acid*)
- e⁻ elektron
- EDTA kyselina ethylendiamintetraoctová
- F1 α podjednotka F1 α komplexu V
- FAD⁺ flavinadenindinukleotid (oxidovaná forma)
- FADH₍₂₎ flavinadenindinukleotid (redukováná forma)
- FH fumaráza (*fumarase hydratase*)
- H⁺ molekula vodíku
- HCl kyselina chlorovodíková
- HN (HD) Huntingtonova nemoc (*Huntington's disease*)
- HTT huntingtin
- KCl chlorid draselný
- kDa kiloDalton (1 Da=10⁻³ kDa)
- KI, KII, KIII, KIV, KV komplexy I, II, III, IV, V systému oxidativní fosforylace
- mHTT mutovaný huntingtin
- mRNA mediátorová RNA (*messenger RNA*)
- mtDNA mitochondriální DNA
- NaCl chlorid sodný
- NAD⁺ nikotinamidadenindinukleotid (oxidovaná forma)

- NADH₍₂₎ nikotinamidadeninukleotid (redukovaná forma)
- NDUFA9 podjednotka NDUFA9 komplexu I
- O₂ molekula kyslíku
- OPA1 dynaminu podobný mitochondriální protein (*optic atrophy*)
- OSCP oligomycin senzitivní protein (*oligomycin sensitivity-conferring protein*), podjednotka komplexu V
- OXPPOS systém oxidativní fosforylace (*oxidative phosphorylation system*)
- PBS fosfátový pufr (*phosphate buffered saline*)
- PDH pyruvát dehydrogenáza
- P_i organický fosfát
- PIC koktejl inhibitorů proteáz (*protease inhibitor cocktail*)
- PMSF phenylmethylsulfonyl fluorid
- PVDF polyvinylidendifluorid
- Q ubichinon
- RIPA pufr pro přípravu vzorku na SDS-PAGE
- RNA ribonukleová kyselina (*ribonucleic acid*)
- ROS reaktivní formy kyslíku (*reactive oxygen species*)
- rRNA ribozomální ribonukleová kyselina
- SDH30,70 podjednotka komplexu II velikosti 30 nebo 70 kDa
- SDS dodecylsírán sodný (*sodium dodecyl sulfate*)
- SDS-PAGE elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS
- TBS tris-pufr (*tris-buffered saline*)
- TBST tris-pufr s přídavkem Tween20
- TEMED N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
- tRNA transferová ribonukleová kyselina
- VDAC napětově řízený aniontový kanál ze třídy iontových porinových kanálů (*Voltage-dependent anion-selective channel*) = porin
- v/v objemová procenta

Úvod

Huntingtonova nemoc (HN) je nejčastějším neurodegenerativním onemocněním ze skupiny „vzácných neurodegenerativních chorob“, která je způsobená mutací v jediném genu kódujícím protein huntingtin. Expanzí cytosin-alanin-guaninového řetězce v tomto proteinu dochází k tvorbě mutovaného huntingtinu, jež narušuje fyziologické funkce téměř ve všech tkáních. Nejvíce je postižena centrální nervová soustava, v pozadí nezůstávají ani další energeticky náročné tkáně včetně svalstva. U pacientů s HN dochází k masivním úbytkům svalové tkáně, jehož mechanismus nebyl zatím uspokojivě popsán. Možnými příčinami mohou být mitochondriální dysfunkce a zvýšená míra oxidativního stresu. Také nastává narušení mitochondriální struktury a dochází k poškozením komplexů systémů oxidativní fosforylace.

Možnost studia svalových buněk pacientů *in vitro* je pouze *post mortem*, proto je kladen důraz na studium onemocnění na odpovídajících zvířecích modelech HN. Vzhledem k podobnosti prasete s člověkem (podobná velikost orgánů, imunologie, velikost těla, stavba mozku, dlouhověkost) se ke studii patogeneze HN v mitochondriích nabízí využití tohoto modelu. Před 7 lety byl v ČR vyvinut model transgenního prasete nesoucího N-terminální část lidského mutantního HTT genu se 124 tripletů CAG. Podařilo se vytvořit dostatečně velký vícegenerační soubor transgenních i wild-type prasat nesoucích mutaci a odebrat vzorky postižených tkání, vč. svalstva. Zabývali jsme se analýzou vybraných mitochondriálních proteinů ve vzorcích kosterního svalstva prasat tří věkových skupin F₂ generace, souvisejících s oxidačním stresem, tvorbou ATP a mitochondriální strukturou. K analýze množství proteinů byla vybrána metoda imunodetekce se specifickými protilátkami.

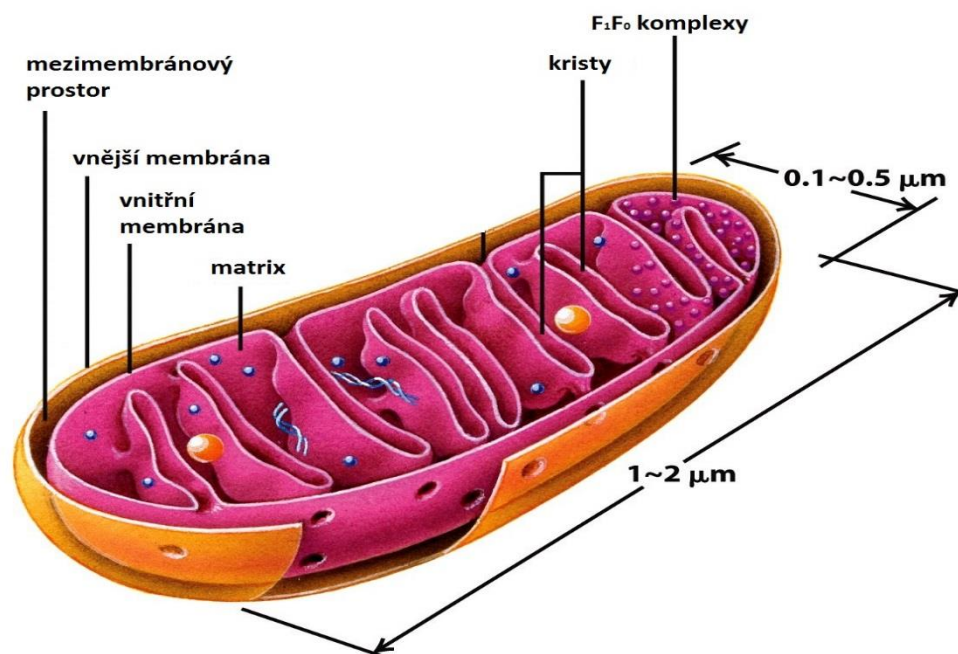
1. Mitochondrie

Mitochondrie jsou semiautonorní membránové organely, které zastávají v eukaryotických buňkách různorodé funkce. Významnou roli hrají v energetickém metabolismu (Wilson, 2013), při buněčné smrti apoptózou (Brenner et Mak, 2009) nebo při stresové odpovědi (Kroemer et al., 2010). Podle uznávané endosymbiotické teorie vznikly mitochondrie před 1,2 miliardou let endocytózou α -proteobakterie protoeukaryotickým organismem, čemuž nasvědčuje přítomnost vlastního mitochondriálního genomu (Margulis, 1975). V buňce vytváří tyto semiautonorní organely dynamickou strukturu zvanou mitochondriální síť. Jednotlivé mitochondrie spolu neustále fúzí a dělí se (Amchenkova et al., 1988). Jejich množství v buňkách se liší v závislosti na buněčném typu a stavu organismu. V různých buněčných typech najdeme od několika set až po tisíce mitochondrií. Velikostí i tvarem se mohou od sebe lišit, ale vnitřní struktura se za fyziologických podmínek nemění. Běžně jsou mitochondrie 0,5-1 μ m dlouhé organely skládající se ze 4 kompartmentů (**obr. 1**), jejich oddělením zde vzniká několik mikroprostředí, ve kterých vedle sebe probíhají odlišné metabolické procesy, např. Krebsův cyklus, β -oxidace mastných kyselin, glukoneogeneze, ketogeneze či metabolismus aminokyselin. Hlavní úlohou mitochondrií v energetickém metabolismu je pak syntéza ATP, který slouží jako hlavní energetický zdroj živočišných buněk (Scheffler, 2007). Další významnou roli mají mitochondrie ve vápníkové signalizaci. Společně s endoplazmatickým retikulem slouží jako hlavní vnitrobuněčná zásobárna Ca^{2+} (Rizzuto et al., 2012).

1.1 Struktura mitochondrií

Mitochondrie se skládají ze dvou membrán - vnější a vnitřní, z mezimembránového prostoru a matrixu. **Vnější mitochondriální membrána** odděluje cytosol buňky od mezimembránového prostoru a zprostředkovává komunikaci s cytolem. Díky přítomnosti porinů je vysoce propustná pro částice do velikosti 5 kDa (Zalman et al., 1980). Membrány ohraničují tzv. **mezimembránový prostor**. Zde jsou uloženy enzymy, které využívají ATP uvolňované z matrix k fosforylaci dalších nukleotidů. Mezimembránový prostor také propojuje mitochondriální procesy s ostatními procesy v buňce prostřednictvím výměny

molekul mezi matrix a cytosolem buňky. Důležitou roli hraje také v apoptóze. Nachází se zde totiž značné množství cytochromu *c*, jehož vylití do cytosolu iniciuje aktivaci kaspáz a s tím dále spřažené procesy vedoucí k apoptóze (Brenner et Mak, 2009).



Obr. 1 – Jednoduché grafické znázornění struktury mitochondrie, zdroj: <http://www.bio.miami.edu/>

Druhou membránou je **membrána vnitřní**. Tvoří struktury zvané kristy vyběhající do matrix, které jsou navzájem propojené, a tak zvětšují povrch vnitřní membrány a zvětšují prostor pro průběh metabolických reakcí. Na rozdíl od vnější membrány je tato vnitřní velmi málo propustná a její propustnost je regulovaná specifickými přenašeči. Složením se tyto dvě membrány také odlišují - vnitřní mitochondriální membrána obsahuje cca 75% proteinů, oproti běžnému membránovému hmotnostnímu poměru 50% proteinů:50% lipidů (Lodish et al., 2008). Tak vysoké množství souvisí s přítomností mnoha proteinových přenašečů a také jednotlivých komponent systému oxidativní fosforylace (OXPHOS) v této membráně.

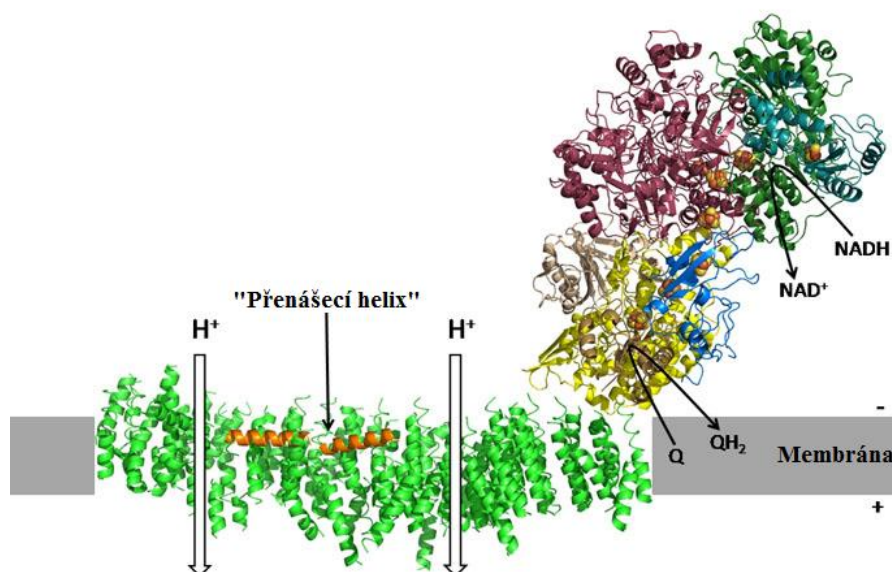
Posledním mitochondriálním kompartmentem je již zmiňovaná **matrix**, v níž nalezneme řadu solubilních enzymů, které katalyzují metabolické procesy probíhající v mitochondriích, ribozomy a také mitochondriální genom - mtDNA (Scheffler, 2007).

1.2 Systém oxidativní fosforylace

Systém oxidativní fosforylace (zkráceně OXPHOS) je lokalizován na vnitřní mitochondriální membráně a skládá se ze **4 komplexů dýchacího řetězce** (komplex I - IV), **2 elektronových přenašečů** (koenzymu Q a cytochromu *c*) a **ATP-syntázy** (také zvané komplex V nebo F_0F_1 ATP-syntáza). Jednotlivé komplexy dýchacího řetězce budou blíže popsány dále. Hlavní úlohou OXPHOS je oxidace redukovaných koenzymů NADH a $FADH_2$ vznikajících během metabolických procesů v mitochondriích (hlavně během glykolýzy a Krebsova cyklu), proto je také nazýván elektrontransportním řetězcem. Elektrony jsou od těchto koenzymů přenášeny přes jednotlivé komplexy ke koncovému akceptoru elektronů, ke kyslíku (molekula O_2). Komplexy se navzájem liší svým redoxním potenciálem, což zajišťuje správný směr toku elektronů a současně s jejich přenosem dochází k pumpování protonů (H^+) do mezimembránového prostoru, kde se nachází komplexy I, III a IV, a tím ke tvorbě protonového gradientu mezi matrix a mezimembránovým prostorem. Vzniklý gradient je využit komplexem V - F_0F_1 ATP-syntázou k syntéze ATP z ADP a P_i (Ferguson et Nicholls, 2013), jak je vyznačeno na **obr. 2** dále.

1.2.1 Komplex I - NADH-koenzym Q oxidoreduktáza

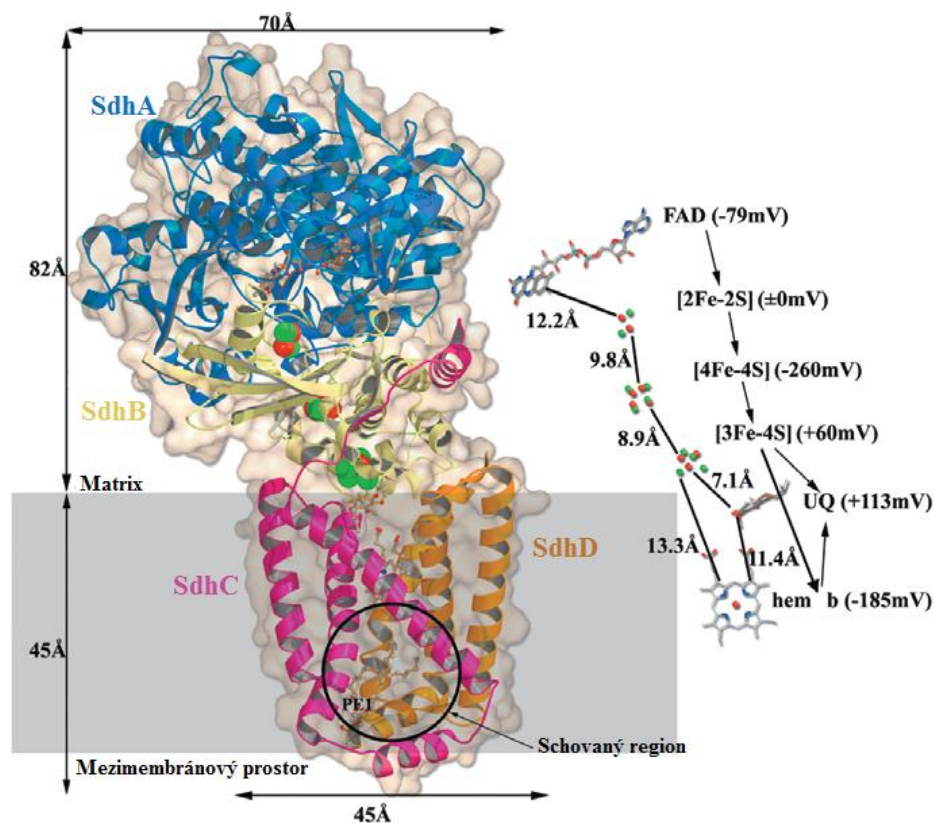
Prvním komplexem systému OXPHOS, systematicky pojmenovaný NADH-koenzym Q oxidoreduktáza, je u savců zároveň největší enzym dýchacího řetězce o velikosti cca 1 MDa. V redukované podobě má tvar písmene „L“ a u savců se skládá ze 44 podjednotek (14 základních a 30 přídatných) (Vinothkumar et al., 2014), z nichž je pouze 7 (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 a ND6) kódovaných mtDNA (Brandt, 2006). Celý komplex I se skládá z 2 domén - hydrofilní, vyčnívající periferně do matrix s místem vazby NADH (kratší rameno „L“), a hydrofobní (delší rameno písmena „L“) zanořené do vnitřní mitochondriální membrány (Sazanov et Walker, 2000). Jeho hlavní funkcí je příjem elektronů ($2e^-$) od redukovaného koenzymu NADH a předávka těchto elektronů dále elektrontransportním řetězcem na flavinmononukleotid (FMN), navázaný nekovalentně na periferní hydrofilní části. Následně jsou elektrony přeneseny přes 9 železo-sírných (Fe-S) center až na koenzym Q (ubichinon) a přes něj pokračují ke komplexu III. Společně s přenosem $2e^-$ dochází k přesunu $4H^+$ z matrix do mezimembránového prostoru (Baradaran et al., 2013).



Obr. 3 - **Struktura savčího komplexu I** včetně znázornění toku protonů přes membránu; QH₂ - ubichinol; Q - ubichinon (podle Hunte et al. 2010).

1.2.2 Komplex II - sukcinát-koenzym Q oxidoreduktáza

Komplex II, systematicky zvaný sukcinát-koenzym Q oxidoreduktáza nebo také funkčně jako sukcinát dehydrogenáza, se skládá ze 4 podjednotek kódovaných pouze jadernou DNA a rozlišujeme u něj velkou - solubilní a malou - membránově vázanou doménu. Patří mezi menší enzymy, jeho molekulová hmotnost je 127 kDa. Jeho největší podjednotkou je SDH70 (odvozené od molekulové hmotnosti 70 kDa), někdy nazývaná SDHA. Komplex II je kromě OXPHOS také součástí Krebsova cyklu a propojuje ho tak s dýchacím řetězcem. V dýchacím řetězci zprostředkovává redukci koenzymu Q (ubichinonu) na ubichinol. Komplex II je jediným komplexem, u kterého nedochází s přenosem elektronů k pumpování protonů do mezimembránového prostoru (Iverson, 2013). Umožňuje přenos 2e⁻ uvolněných během oxidace sukcinátu na fumarát, které následně redukují kovalentně navázaný flavinadenindinukleotid (FAD). Tyto elektrony poté pokračují přes železo-sírná (Fe-S) centra ke koenzymu Q. Z něj jsou následně přes prostetické skupiny přeneseny na komplex III (Kenney, 1975).

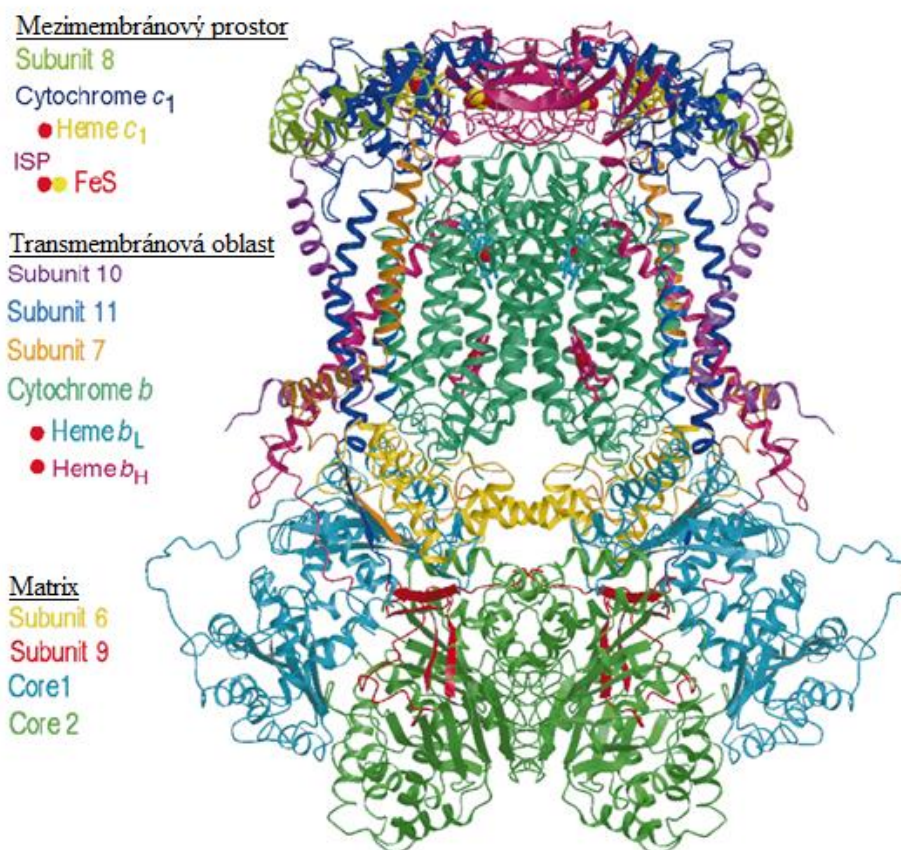


Obr. 4 - **Struktura savčího komplexu II.** Vpravo schéma přenosu elektronů přes komplex II (podle Sun et al., 2005).

1.2.3 Komplex III - ubichinol-cytochrom c oxidoreduktáza

Systematicky se třetí komplex OXPHOS nazývá ubichinol-cytochrom c oxidoreduktáza. Je funkční v podobě dimeru o velikosti 480 kDa a každý z monomerů se skládá z 11 podjednotek (CORE1, CORE2, cytochrom b, cytochrom c_1 , Fe-S protein, „hinge“ protein a 5 dalších malých polypeptidů), z nichž jen 1 je kódována mtDNA (Crofts, 2004). Tento komplex katalyzuje přenos elektronů z ubichinolu na cytochrom c. V prvním cyklu je vázán oxidovaný ubichinon a redukovaný ubichinol na cytochrom b . Následně redoxní Fe-S centrum s hemem b_L uvolní z ubichinolu $2e^-$, první z nich je přenesen na cytochrom c_1 a druhý na cytochrom b_H . V tomto kole se do mezimembránového prostoru uvolní $2H^+$. Jeden elektron pokračuje z cytochromu c_1 na cytochrom c a druhý elektron z cytochromu b_H k ubichinonu, kde z něj vzniká částečně redukovaný semichinon, který zde zůstává navázaný, zatímco cytochrom c a ubichinon se uvolňují. Ve druhém kole přenosu se nejprve další ubichinol navazuje na cytochrom b . Redoxní centrum Fe-S s hemem b_L uvolní $2e^-$ z ubichinolu, první z nich je přenesen na cytochrom c_1 a druhý je přenesen na cytochrom b_H a opět se do

mezimembránového prostoru uvolní 2H^+ . Cytochrom c_1 předá $1e^-$ cytochromu c , ten je uvolněn a pokračuje ke komplexu IV, druhý elektron je opět přenesený do blízkosti vázaného semichinonu, zde se váže se 2H^+ z matrix a oxiduje se na ubichinon, který je následně uvolněn a použit pro další cyklus. Během redukce molekuly O_2 dojde k přenosu celkem 4H^+ z matrix do mezimembránového prostoru (Crofts et al., 2008; Ferguson et Nicholls., 2013).

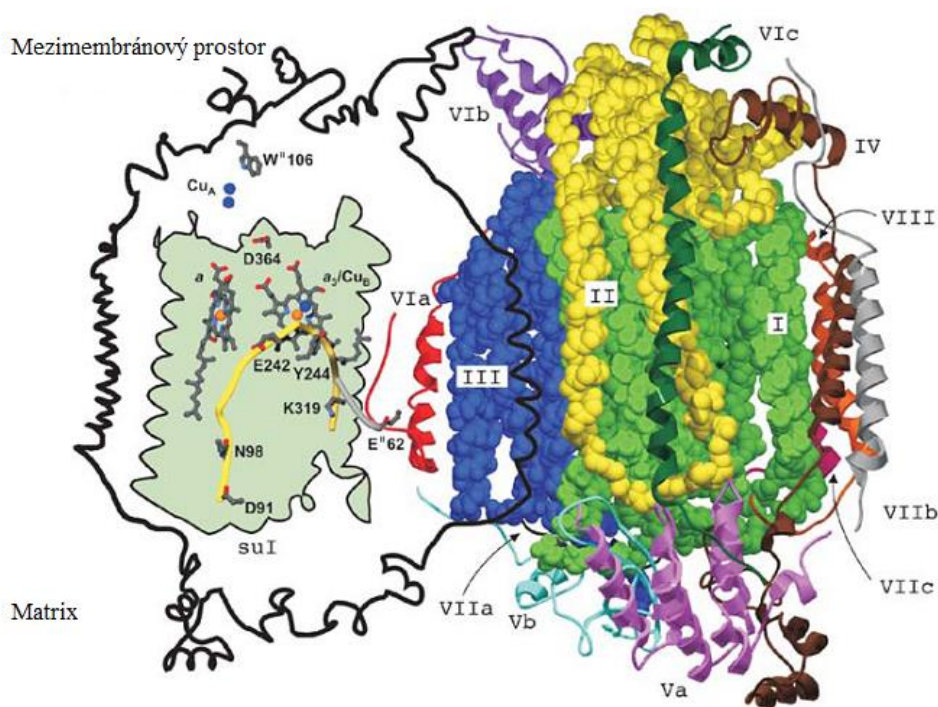


Obr. 5 – Struktura savčího komplexu III v nativní dimerní podobě (podle Iwata et al., 1998).

1.2.4 Komplex IV - cytochrom c oxidáza

Cytochrom c přenáší po jednom elektronu na poslední z komplexů dýchacího řetězce, cytochrom c oxidázu (COX; komplex IV) – enzym, který redukovanému cytochromu c přinesené elektrony odebírá. Funguje ve formě dimeru o velikosti 410 kDa. Tento komplex se skládá z 13 podjednotek, z nichž pouze 3 (COX1, 2, 3) jsou kódované mtDNA a jejich funkce je

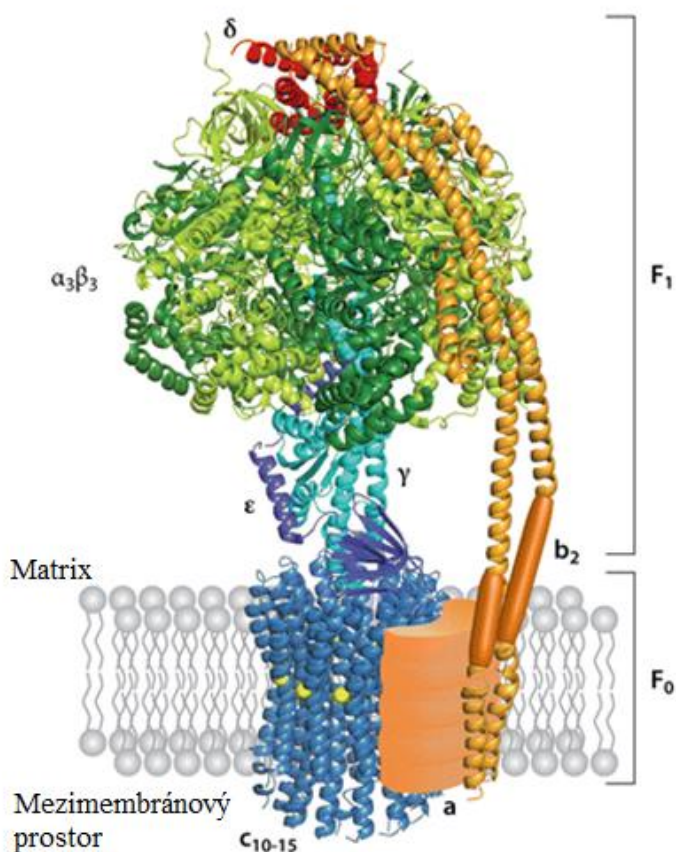
především katalytická a strukturní. Zbylé podjednotky (COX4, 5 α , 5b, 6a, 6b, 6c, 7a, 7b, 7c) jsou kódovány v jádře a funkci mají zejména stabilizační a asemblační. Podjednotky COX1, COX2 a COX3 představují redoxní centrum komplexu a obsahují pro katalýzu nezbytné kofaktory v podobě iontů mědi, zinku, hořčíku, sodíku a několika hemů. Funkcí COX je redukce molekulárního O₂ na 2 molekuly vody za pomoci elektronů získaných z cytochromu *c*, přenášené přes několik center (Cu_a, cytochrom *a*, cytochrom *a*₃, Cu_b) na finální akceptor elektronů, jímž je O₂, ze kterého zde vzniknou 2 molekuly vody. Energie, která se průchodem elektronů uvolní, je využita k translokaci H⁺ přes vnitřní mitochondriální membránu. Pro redukci 1 molekuly O₂ jsou zapotřebí 4e⁻, které cytochrom *c* donese postupně. V průběhu redukce molekuly O₂ dojde k přenosu 4H⁺ z matrix do mezimembránového prostoru (Brzezinski et Gennis, 2008).



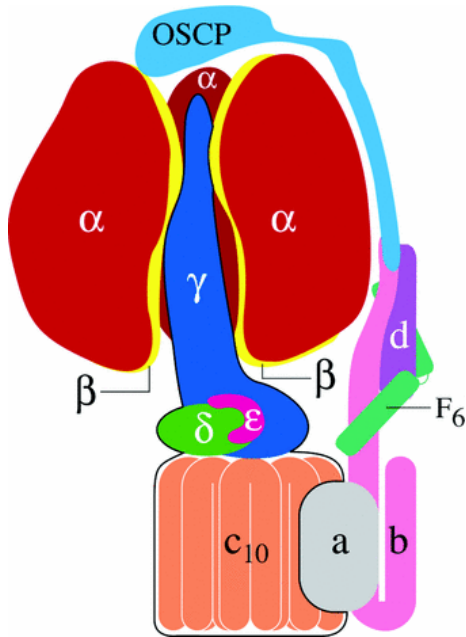
Obr. 6 - Struktura dimerní cytochrom c oxidázy. Nalevo katalytická místa enzymu, napravo proteinová struktura (podle Richter et Ludwig, 2003).

1.2.5 Komplex V - F₀F₁ ATP syntáza

Přenosem elektronů přes jednotlivé komplexy systému OXPHOS dochází ke vzrůstu protonového gradientu mezi matrix a mezimembránovým prostorem mitochondrie. Vzniklý gradient je využit posledním z komplexů OXPHOS k syntéze ATP z ADP a anorganického fosfátu (Mitchell, 1961). Pátý komplex se nazývá F₀F₁ ATP-syntáza a jeho molekulová velikost je u savců 600 kDa. Skládá se z 16-18 podjednotek, z nichž pouze 2 (A a A6L) jsou kódované mtDNA. Savčí F₀F₁ ATP-syntáza má 2 funkční celky - F₁ a F₀ propojené stopkou. F₁ se skládá z 6 podjednotek (α_3 , β_3 , γ , δ , ϵ , inhibičního proteinu 1 - IF1) a vyčnívá směrem do matrix. Obsahuje vazebná místa pro ATP, ADP a P_i. Část F₀ je ukotvena ve vnitřní mitochondriální membráně a skládá se z 10 podjednotek (a, b₂, c₈, d, e, f, g, F6, A6L a OSCP), její funkcí je řízení zpětného toku protonů přes stopku (Boyer, 1997). Přenos protonů z mezimembránového prostoru zpět do matrix prostřednictvím F₀F₁ ATP-syntázy je spojen s konformačními změnami obou jejích podjednotek. Průchod protonů způsobí rotaci c-prstence a γ podjednotky, která přenese změny na podjednotku β v F₁ části. Tyto změny podjednotky β umožní tvorbu ATP (Menz et al., 2001).



Obr. 7 - Struktura savčí F₁F₀ ATP-syntázy
(podle von Ballmoos et al., 2009)



Obr. 8 – Organizace podjednotek mitochondriální F_1F_0 -ATP syntázy s barevně odlišenými podjednotkami - F_1 globulární katalytická doména je tvořena podjednotkami α, β a 3 podjednotkami centrální stopky γ, δ a ϵ . F_0 doména je složena z oligomeru c (v 10 kopiích), podjednotky a (ATP6) a z podjednotek periferní stopky b, d, F_6 a OSCP. (podle Menz et Walker 2006).

1.2.6 Superkomplexy

Jednotlivé komplexy systému OXPHOS nejsou v membráně rozmístěny náhodně, ale tvoří spolu takzvané superkomplexy (Bianchi et al., 2004). Tvorby superkomplexů se účastní komplexy I, III, IV a V, nebyl zatím identifikován superkomplex tvořený komplexem II. Rozdělujeme je do 4 hlavních skupin - tvořené $KI+KIII_2$, $KIII_2+KIV_{1-2}$, $KI+KIII_2+KIV_{1-4}$ a KV_2 (Chaban et al., 2014). V dýchacím řetězci člověka jsou superkomplexy nejčastěji tvořeny komplexem I a III, v uspořádání zvaném respirazom. Často se k těmto dvěma komplexům přidružuje také komplex IV. Tímto uspořádáním dochází k přiblížení jednotlivých komplexů a k jejich stabilizaci (Schägger et al., 2004), k účinnějšímu směřování substrátů (Schägger, 2001) a také ke kontrole produkce volných radikálů (Winge, 2012). Tvorba superkomplexů společně s uspořádáním komplexu V do dimerů na konci mitochondriálních krist umožňuje vytvářet lokální gradient protonů, který je poté efektivně využit k syntéze ATP (Davies et al., 2011).

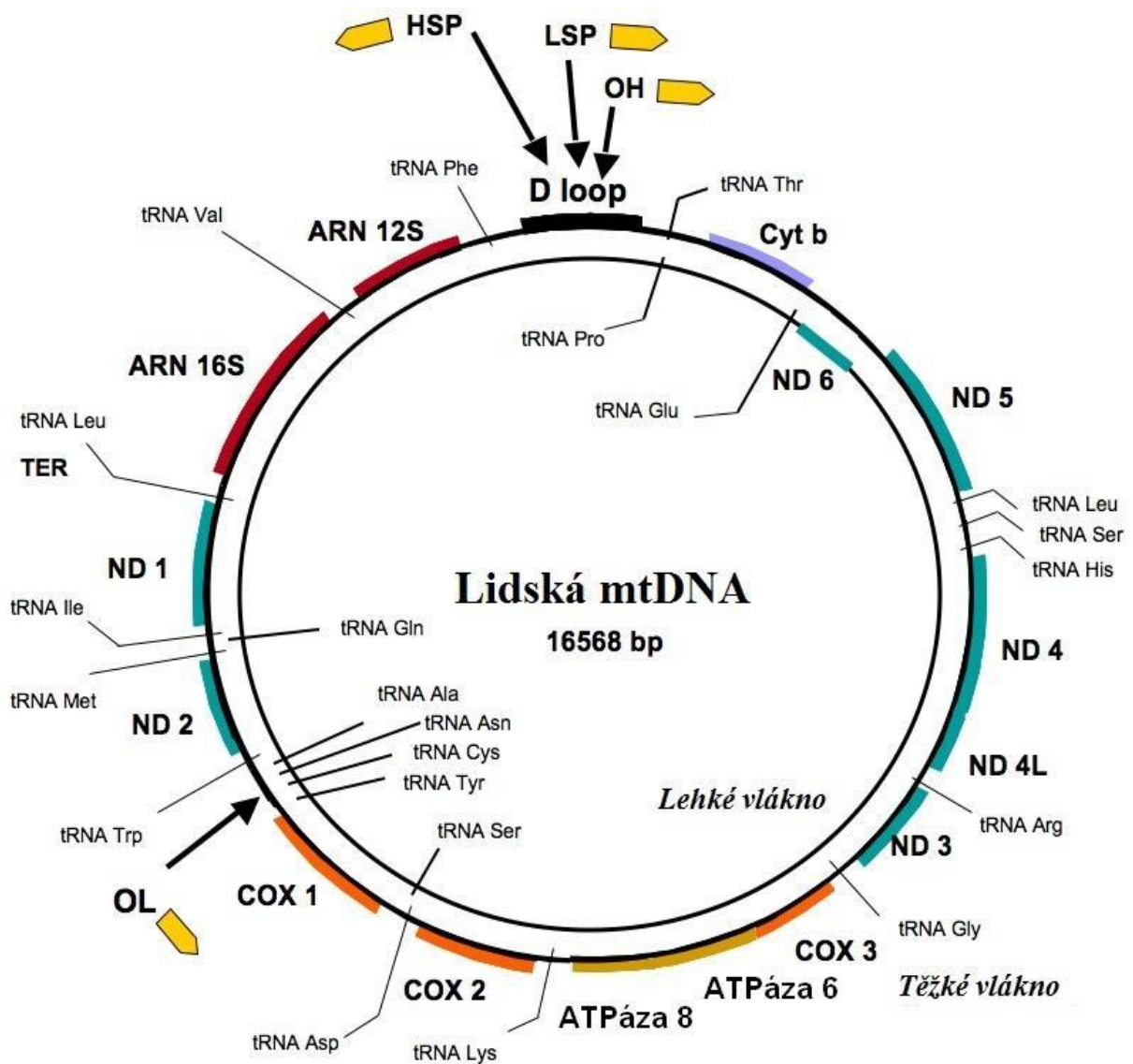
1.2.7 Pyruvát dehydrogenázový komplex

Pyruvátdehydrogenázový komplex (PDH) je soubor 20-30 enzymů o celkové velikosti 7-10 MDa lokalizovaný u savců v mitochondriální matrix. Jeho funkcí je katalýza rozkladné redoxní reakce pyruvátu za vzniku acetylkoenzymu A a oxidu uhličitého (oxidativní dekarboxylace). Tato reakce je jedním z ústředních kroků v energetickém metabolismu, dochází zde ke spojení finálního produktu glykolýzy – pyruvátu s acetylkoenzymem A, který může vstoupit do Krebsova cyklu či být součástí dalších metabolických drah. PDH se jako multienzymatický komplex skládá kromě několika hlavních bílkovinných podjednotek také z nebílkovinných kofaktorů (hlavními jsou thiamindifosfát, lipoát, koenzym A, FAD, NAD^+) a regulačních proteinů. Nejvýznamnější podjednotky komplexu jsou E1 (se subpodjednotkami E1 α , E1 β) tvořící heterotetramery v počtu 20-30 na jeden komplex. Dále E2 (dihydrolipoamid acetyltransferáza) a E3 (lipoamid dehydrogenáza).

Tvorba acetylkoenzymu A zde probíhá v 5 krocích - nejprve se pyruvát váže s thiamindifosfátem a na enzymu E1 dochází k dekarboxylaci. Ve druhém kroku dochází k oxidaci hydroxyskupiny na oxoskupinu za současné redukce lipoátu na dihydrolipoát a meziprodukt je předán enzymu. Ve třetí fázi je enzymem E3 přenesen acetyl z dihydrolipoátu na koenzym A a vznikne tak acetylkoenzym A. Další fáze slouží k regeneraci enzymu a oxidaci dihydrolipoátu na lipoát za současné redukce disulfidového můstku. V posledním pátém kroku se elektrony přenesou na FAD (vznikne FADH_2) a z něj na NAD^+ (vznikne NADH)(Gray et al., 2013).

1.3 Mitochondriální genom

Mitochondriální DNA je dvouvláknová, 16 569 bp dlouhá, kruhová molekula (Anderson et al., 1981). Jednotlivá vlákna mtDNA dělíme podle obsahu bazí na lehké (L - *light*), který obsahuje větší podíl cytosinů a těžké (H - *heavy*) s větším podílem guanosinů. MtDNA celkem kóduje 37 genů, z toho 2 geny pro ribozomální RNA (12S rRNA a 16S rRNA), 22 genů pro tRNA a nejméně 13 genů pro peptidy, které jsou součástí jednotlivých komplexů systému OXPHOS (Lee et al., 2013). Běžně se v mitochondriích obratlovců nachází mtDNA v počtu 10^3 - 10^4 kopií na buňku (Shadel et Clayton 1997). Její množství se může lišit v závislosti na typu tkáně a na fyziologickém stavu buněk. Oxidativní stres a různá onemocnění přispívají ke změnám počtu mitochondrií stejně jako k ovlivnění integrity jejich DNA (Lee et al., 2013). V průběhu ontogeneze obratlovců došlo k přesunu mnohých, původně mitochondriálních genů, do jádra (Martin, 1998). V mtDNA zcela chybí introny a některé geny se mohou překrývat. Tato úsporná organizace způsobuje, že její genom sestává výhradně z kódujících sekvencí. Výjimku představují významná regulační oblast zvaná D-smyčka, místo počátku replikace obou vláken (Shadel et Clayton, 1997) a kontrolní region (Lightowers et al., 1997). D-smyčka je struktura DNA, kde je oddělen úsek se dvěma vlákny dvouřetězcové DNA třetím jednovláknovým řetězcem, který je komplementární k jednomu z nich a tato oblast má strukturu triple-dvouvláknové DNA (Kasamatsu et al., 1971) – viz **obr. 9**. Kontrolním regionem je polymorfní nekódující oblast mtDNA, která v sobě obsahuje počátek replikace jednoho vlákna a počátek transkripce obou řetězců (Anderson et al., 1981). Mutace v jaderných genech pro podjednotky systému OXPHOS a mutace v samotné mtDNA vedou k mitochondriálním onemocněním. U dědičnosti mtDNA se neuplatňuje klasický mendelovský typ. MtDNA je do dalších generací předávána uniparentálně, a to vždy po maternální linii. MtDNA se nachází v matrix mitochondrií a je spojena s vnitřní mitochondriální membránou a vytváří zde nukleoproteinové komplexy - nukleoidy (Legros, 2004) v těsné blízkosti komplexů systému OXPHOS, při čemž během reakcí probíhajících v těchto komplexech dochází ke tvorbě vedlejších produktů jako například reaktivních forem kyslíku (ROS, volné kyslíkové radikály). Jejich přítomnost v blízkosti mtDNA má zřejmě za následek zvýšený vznik mutací této DNA, který úzce souvisí s mnoha mitochondriálními onemocněními (Wallace, 1999). Vzhledem k tomu, že je mtDNA v buňkách ve vysokém počtu kopií, nemusí se dopad těchto mutací vždy ihned projevit. Rozhodující roli v projevu dané mutace poté hraje překročení určitého prahového množství mutované mtDNA (Rossignol et al., 2003)



Obr. 9 - Lidská mitochondriální DNA – LSP - promotor lehkého vlákna (*light-strand promoter*); HSP - promotor těžkého vlákna (*heavy-strand promoter*); OH - počátek replikace bohatý na purinové báze na těžkém vlákně; OL - počátek replikace na lehkém vlákně; ND1-6 – geny pro podjednotky NADH dehydrogenázy; COX1-3 - podjednotky cytochrom c oxidázy; ATP6 a 8 - podjednotky ATP syntázy; ARN 12S a ARN 16S - mitochondriální RNA (podle Bellance et al., 2009).

1.4 Mitochondriální poruchy

Mitochondrie hrají důležitou roli v mnohých metabolických procesech, v udržení buněčné homeostázy a fyziologie. Narušením těchto procesů dochází ke vzniku sekundárních mitochondriálních poruch, projevujících se změnami v biogenezi mitochondrií, narušením Ca^{2+} signalizace i extramitochondriální signalizace a neméně významná je také zvýšená tvorba volných radikálů (ROS), které mohou mitochondrie a jejich funkce výrazně poškodit (Schapira, 2012).

Sekundárními mitochondriálními onemocněními souhrnně nazýváme patologické změny vznikající v souvislosti s celou řadou neurodegenerativních poruch, mezi něž patří například Huntingtonova choroba, Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, amyotrofická laterální skleróza a další (Duchen et Szabadkai, 2010). Mitochondriální onemocnění mohou postihnout kteroukoli tkáň v organismu, nejcitlivější jsou však energeticky náročné tkáně – centrální nervová soustava, myokard, svalstvo. Klinické příznaky mitochondriálních onemocnění se odvíjí od typu molekulárního defektu a aktivity postiženého enzymu. Diagnostika je vždy založena na spolupráci postižené rodiny s lékařem a specializovanou laboratoří, využívá se zde celá řada zobrazovacích a elektrofyziologických metod a také molekulární vyšetření bioptované tkáně (sval, kožní fibroblasty) (Browne, 2008).

2. Huntingtonova nemoc

Huntingtonova nemoc (HN) je neurodegenerativní autozomálně dominantně dědičné onemocnění, projevující se progresivní poruchou hybnosti, změnami chování a kognitivním deficitem. Motorická složka se obvykle vyznačuje choreickými nechtěnými pohyby, který se postupně šíří do všech svalů a ovlivňuje tedy psychomotorické procesy (Novak et Tabrizi, 2010). Pacienti vykazují řadu závažných psychiatrických poruch a postupnou demenci. Mezi další, méně nápadné, ale neméně významné dysfunkce patří marginální úbytky na váze, poruchy spánku a cirkadiálních rytmů, neplodnost a dysfunkce autonomního nervového systému (Bates, 2005; Novak et Tabrizi, 2010). Toto onemocnění bylo roku popsáno před více, než 140 lety, lékařem Georgem Huntingtinem z Ohia, po němž také dostala nemoc svůj název (Huntington, 1872). Průlom ve studiu HN přinesly nové genetické metody. V roce 1983 byla nalezena spojitost se 4. chromozomem a roku 1993 byl objeven konkrétní gen, jehož mutace zodpovídá za onemocnění. Celosvětová prevalence je mezi 5-10:100.000 obyvatel (Kumar et al., 2010). Průměrný věk nástupu prvních pozorovatelných klinických příznaků je mezi 35.-50. rokem. Vzácně nemoc počíná před 10. rokem života, nazývá se juvenilní/Westphalova varianta HN (5% případů) a po 70. roce života (5% případů). S rostoucím počtem CAG tripletů lze očekávat časnější klinický počátek a rychlejší progresi nemoci. Při přenosu po paternální linii může docházet k anticipaci - výraznému zvýšení počtu CAG tripletů u potomků (Trottier et al., 1994). Průměrná doba trvání nemoci je 17-20 let. Progrese onemocnění vede k úplné závislosti na péči druhé osoby v každodenním životě. Nejčastější příčinou úmrtí pacientů HN je pneumonie, následována sebevraždou (Roos, 2010).

2.1 Symptomy Huntingtonovy nemoci

Charakteristické **změny v motorice** představují zejména mimovolní nechtěné pohyby, obvykle začínající u distálních končetin – u prstů na rukou i nohou a v malých obličejových svalech. Pacient je při chůzi nestabilní a může se pro okolí jevit podnapile. Postupně se nechtěné pohyby šíří do ostatních svalů od distálních do více proximálních a axiálních oblastí. Nechtěné pohyby obličejových svalů vedou ke kontinuálním pohybům, je například zavíráno oko, zvedáno obočí, hlava se naklání na stranu, špulí se rty a jazyk vyčnívá z úst. Mluvení a

polykání se postupně stávají problematické a později může dojít až k dušení (Roos, 2010). Objevuje se dysartrie a dysfagie. U všech pacientů se rozvíjí hypokineze, akineze a ztuhlost svalstva vede k pomalejšímu vykonávání aktivit. Rovnováha mezi choreou a hypokinezí je individuální s extrémem na jedné straně u mladších pacientů s velkou pohyblivostí a na druhé straně u starších pacientů v posledním stadiu onemocnění s dlouhou dobou trvání nemoci, upoutaných na lůžko, s příznačnou ztuhlostí končetin. Dystonie se vyznačuje pomalejšími pohyby se zvýšeným svalovým napětím, vedoucím k abnormálnímu držení těla a k nepřírozenému otáčení trupu a končetin. Dále se vzácněji objevují tiky, srovnatelné s tiky pozorovanými při Tourettově syndromu. Přítomnost hyperkineze a hypokineze má za následek obtíže při chůzi i stání a vede k častým pádům (Purdon, 1993).

Psychiatrické symptomy bývají přítomny v raném stadiu onemocnění, často ještě před nástupem příznaků motorických. Nejčastěji se vyskytujícím symptomem je deprese. Diagnóza je však obtížná, protože její projevy nejsou nijak specifické pro HN. Dále pozorujeme zvýšenou apatii a nečinnost, obvyklé jsou pocity viny a úzkosti. Přibližně ve stejné době, kdy je pacient geneticky testován na HN, se objevují sebevražedné sklony. Vyskytují se také stavy obsese a nutkání, vedoucí k podráždění a agresi. Mohou se objevit psychózy, a to zejména v pozdějších stádiích onemocnění ruku v ruce s poklesem kognitivních funkcí. Kompletní klinický obraz je srovnatelný s paranoidní schizofrenií (Roos, 2010).

Pokles **kognitivních funkcí** je dalším hlavním znakem HN a může být pozorován dlouho předtím, než se objeví první příznaky motorických dysfunkcí. Mění se zejména funkce exekutivní. Pacienti nejsou dopředu schopni plánovat ani jednoduché věci. S progresí HN se psychomotorické procesy stávají těžce retardované (Purdon, 1993).

Mezi **sekundární příznaky** onemocnění patří již od začátku úbytek váhy z nejasných příčin. Ačkoliv se zdá logické domnívat se, že na vině je chorea, bylo prokázáno, že neexistuje žádný vztah mezi hubnutím a choreou. Byl však popsán vztah úbytku váhy s délkou CAG repetice (Aziz et al., 2008). Další roli mohou hrát snížení chuti k jídlu, obtíže při polykání jídla a manipulace s potravou. Pravou příčinou hubnutí doposud neznáme a spekuluje se o dvou hlavních faktorech – první je apoptóza neuronů v hypotalamu, řídicím centru příjmu potravy, druhá z příčin pak zahrnuje mitochondriální dysfunkce a změny energetického metabolismu (Zuccato, 2010).

2.2 Huntingtin

Huntingtin (HTT) je velký solubilní protein velikosti přibližně 348 kDa skládající se z několika subdomén. Na N-konci se polyglutaminový (polyQ) úsek kódovaný CAG opakuje a u savců za polyQ doménou následuje polyprolinová sekvence, která stabilizuje konformaci celého proteinu. Následují 3 hlavní klastry HEAT repetice (tandemové konzervativní sekvence), které jsou nezbytné pro vazbu interagujících proteinů (DiFigglia, 1995). Na molekulární úrovni může HTT interagovat s různými proteiny, včetně některých transkripčních faktorů, synaptických komplexů, s plasmatickou membránou a cytoskeletárními proteiny (DiFigglia, 1995; Zuccato et Cattaneo, 2010). Wild-type huntingtin má v organismu řadu nezastupitelných funkcí. Vyskytuje se v cytoplazmě většiny buněk lidského těla, jeho veškerý význam pro vývoj a funkci organismu není dosud uspokojivě objasněn (Munoz-Sanjuan et Bates, 2011). Hraje roli v synaptických funkcích, je nezbytný pro správný embryonální vývoj mozku (Hoogeveen et al., 1993), má antiapoptotický a ochranný účinek proti toxickým vlivům mutovaného huntingtinu (Roos, 2010). Huntingtin je v nemutované formě exprimován u všech obratlovců včetně člověka (Zuccato et Cattaneo, 2007). Mutace huntingtinu je spojována se selektivní atrofií striata a astrogliózou (Vonsattel et al., 1985). Atrofické změny postihují také další oblasti centrálního nervového systému (Rub et al., 2014) a periferní tkáně (Squitieri et al., 2010). HN je způsobena expanzí CAG tripletů (cytosin-adenosin-guanin) v genu 4p16.3, lokalizovaném na krátkém raménku chromozomu 4, kódujícím polyglutaminový řetězec v proteinu huntingtin (Gusella et al., 1983; Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993). Nemoc se může projevit u osob, které mají alelu s 36 a více tripletů CAG, při 40 CAG opakováních dochází téměř vždy ke klinické manifestaci onemocnění (Roos, 2010). Mutací v genu pro huntingtin dochází k prodloužení polyglutaminové sekvence a ke změně struktury proteinu a tím pádem i ke změně jeho funkcí. Fragmenty mutovaného HTT jsou translokovány do buněčného jádra, což vede k vyvolání apoptotických mechanismů (Hendersen et al., 2001).

2.2.1 Mutovaný huntingtin v mitochondriích

V průběhu HN dochází k odumírání neuronů, HTT ve své mutované formě poškozuje mitochondrie a způsobuje tak narušení dodávky energie do těchto energeticky náročných buněk. MHTT způsobuje poruchu mitochondriální homeostázy Ca^{2+} , jedné z hlavních funkcí

těchto organel. Mitochondrie jsou schopny akumulovat velké množství Ca^{2+} a v případě potřeby ho velice rychle dodat do buňky. Transport vápníku z mitochondrií je poháněn protonovým gradientem (Choo et al., 2004). Narušení této rovnováhy má za důsledek snížení mitochondriálního membránového potenciálu, otevření mitochondriálního permeabilního transitorního póru (Panov et al., 2002), uvolňuje se cytochrom c a je aktivována kaskáda vedoucí k buněčné apoptóze (Zeron et al., 2004).

Během HN dochází také k narušení funkce enzymů systému komplexů oxidativní fosforylace a ke změnám buněčné respirace (Costa et Scorrano, 2012). V mozkové tkáni (konkrétně *nucleus caudatus* a *putamen*) pacientů bylo zjištěno snížené množství exprese II. a III. komplexu OXPHOS a také snížená aktivita komplexu IV (Gu et al., 1996), důsledkem čehož klesá tvorba ATP na V. komplexu (Seong et al., 2005). Jelikož nebyla zatím prokázána přímá asociace mHTT s komplexy OXPHOS, je jejich poškození pravděpodobně důsledkem dalšího fenoménu patogeneze HN – rostoucího oxidativního stresu. Zvýšená aktivita mitochondriální superoxid dismutázy a katalázy poukazuje na aktivaci obranných antioxidantních mechanismů buněk (Sorolla et al., 2008). V mozku pacientů HN byl pozorován pokles aktivity akonitázy – enzymu Krebsova cyklu, jehož aktivita je regulována změnou množství reaktivních forem kyslíku (ROS). S rostoucím množstvím ROS je funkce akonitázy rychle inhibována. Na nárůst ROS poukazuje dále akumulace lipofuscinu – produktu peroxidace nenasycených mastných kyselin v postižené tkáni (Sohal et al., 1989). Mutovaný HTT může způsobovat fragmentaci mitochondrií a rozpad mitochondriální sítě (Song et al., 2011). Dělení a fúze mitochondrií jsou dynamické procesy, regulované skupinou GTPáz z rodiny příbuzné dynaminu. MHTT interaguje na vnější mitochondriální membráně s cytoplasmatickým proteinem Drp1, který zodpovídá za průběh mitochondriálního dělení. Dalším mitochondriálním proteinem řídícím opačný proces – fúzi mitochondrií je OPA1, který se nachází ve vnitřní mitochondriální membráně a zodpovídá za strukturu této membrány stejně jako za strukturu krist (Van der Bliek et al., 2013).

V neposlední řadě mutovaný HTT narušuje transport proteinů do matrix a vnitřní mitochondriální membrány, což také nejspíš přispívá k patologii onemocnění (Yano et al., 2014).

2.3 Patologie kosterního svalu při HN

Kosterní sval je tkáň velice s důležitým významem pro regulaci celkové metabolické homeostázy organismu, s velkou metabolickou plasticitou (Egan et Zierath, 2013). U pacientů s HN často pozorujeme zvýšení hladiny kreatinu v presymptomatickém stadiu onemocnění, tedy ještě před projevy prvních motorických příznaků (Browne, 2008). Mění se také poměr ATP a fosfokreatinu k organickému fosfátu, u pacientů s HN hladina fosfokreatinu i ATP klesá již v presymptomatickém stadiu. Pacienti mají zvýšenou hladinu laktátu v plasmě (Ciammola et al., 2011), což může značit zvýšenou glykolýzu a menší efektivitu mitochondrií (Browne, 2008). *In vitro* studie prokázaly zvýšenou produkci laktátu v buňkách (Ciammola et al., 2011) a dále zvýšené hladiny kaspáz 3, 8 a 9. Inkluze mHTT v myších myotubech způsobují změny potenciálu mitochondriální membrány, defektní diferenciaci myotub (Ciammola et al., 2006) a mnohé další defekty jako např. abnormálně dlouhé mitochondrie, změny struktury krist a vakuolizaci buněk (Ciammola et al., 2011).

Při HN nacházíme ve svalové tkáni snížené aktivity mitochondriálních enzymů, například sukcinát dehydrogenázy (SDH; komplex II), cytochrom c oxidázy (komplex IV), akonitázy a pyruvát dehydrogenázy (PDH) (Vonsattel et al., 2007). Několik studií prokázalo snížení obou podjednotek komplexu II zároveň – 30 kDa podjednotky SDH a 70 kDa SDH (Benchoua et al., 2006; Vonsattel et al., 2007).

2.4 Modely Huntingtonovy nemoci

U neurodegenerativních onemocnění lze získat některé vzorky pro laboratorní vyšetření pouze *post mortem* a proto je velký tlak na potřebu vyvinout modelové organismy. HN je podmíněna mutací pouze v jediném genu, proto lze vložit mutovaný gen metodou transgeneze do modelového organismu a studovat průběh onemocnění. Pro HN existuje celá řada modelů, vč. modelů chemických napodobujících excitotoxické změny (například vstříkávání mitochondriálních toxinů – kyseliny malonové a kyseliny nitropropionové do mozku potkanů (Brouillet et al., 1999)), vhodných spíše ke studiu neuroreparačních a neuroprotektivních terapií, jelikož nezahrnují patofyziologické mechanismy nemoci vyvolané mutovaným genem (Zuccato et al., 2010). K expresi mutace způsobující HN bylo geneticky upraveno široké

spektrum živočišných druhů - počínaje *Drosophilou* (Marsh et al., 2003) a *Caenorhabditis elegans* (Faber et al., 1999) po jednobuněčné kvasinky *Sacharomyces cerevisiae* (Wang et Qin, 2006). Prvním savčím modelem byla myš a dnes je k dispozici celá řada HN linií, bohužel většina z nich nevykazuje patologie mozku, apoptické neurony s DNA fragmenty a další projevy běžné u pacientů s HN (Yang et al., 2010). Nevýhodu malých modelů je také nesrovnatelná stavba mozku, délka života a rozdílná velikost oproti člověku. Jakýkoliv zvířecí model je optimální jenom tehdy, když pozorovaný fenotyp onemocnění koreluje se symptomy pacientů. Hlavní fokus je z těchto důvodů na modely velkých savců. Mají velký mozek stavbou podobný lidskému, obdobně velké orgány, žijí dostatečně dlouho, aby se projevil toxické účinky mHTT, shodují s imunologicky a lze u nich provádět řadu behaviorálních testů. „*Large animal models*“ skupina zahrnuje modely ovčí (Jacobsen et al., 2010), opičí (Yang et al., 2008) a modely prasečí (Aigner et al., 2010). Jsou úspěšně vyvíjeny a používány k objasnění patogeneze nemoci (Zuccato et al., 2010). Každý z těchto modelů se potýká se svými hranicemi. Výzkum na primátech je v mnohých státech z etických důvodů zakázán. Ovce a prasata se snadno množí a jejich chov je poměrně nenáročný. Transgenní model ovce může přežívat jako zdravý jedinec s pouze mírným aktivitou neuronů striata, ačkoliv exprimuje plnou délku mHTT (Jacobsen et al., 2010). Modely transgenních miniaturních prasat jsou rychle a snadno množitelné, ekonomicky nenáročné a v mnoha aspektech se jedná o člověku velice blízký model.

V České republice byl před 7 lety vyvinut model miniaturního prasete exprimující prvních 548 aminokyselin HTT genu pod kontrolou lidského HTT promotoru. Model byl vytvořen metodou lentivirové transdukce embryí. Vektor s N-terminální zkrácenou formou lidského HTT genu nesoucího prvních 548 aminokyselin HTT se 145 CAG repeticemi byl vpraven do periviteliního prostoru jednobuněčných embryí a embrya byla *in vitro* kultivována do fáze blastocysty, hned poté byla laparoskopicky injikována do akceptorových prasnic a po standardní době březosti přirozeně porozena. U 4 měsíčního prasete F2 generace byla provedena analýza mozkové tkáně a byly objeveny fragmenty mHTT v motorické kůře, putamenu, *nucleus caudatus*, hipokampu, hypothalamu, thalamu, mozečku, míše a periferních tkáních (Baxa et al., 2013).

3. Cíle

Cílem práce bylo analyzovat změny v množství mitochondriálních proteinů ve třech věkových skupinách prasat transgenního modelu pro HN ve svalu a určit možný počátek změn jednotlivých komplexů OXPHOS a dalších mitochondriálních proteinů souvisejících s poškozením energetického metabolismu a oxidačním stresem, způsobeným mutovaným huntingtinem, metodou elektroforézy na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS s následným Western blotem a imunodetekcí se specifickými protilátkami proti těmto proteinům.

Specifickým cílem diplomové práce bylo:

- Stanovit změny množství proteinů komplexů I – V OXPHOS ve vzorcích kosterního svalstva transgenních prasat ze tří různých věkových skupin a srovnání s wild-type kontrolami
- Stanovit změny množství proteinů komplexu PDH ve vzorcích kosterního svalstva transgenních prasat ze tří různých věkových skupin a srovnání s wild-type kontrolami
- Stanovit změny množství proteinů OPA1, mitofilinu a akonitázy ve vzorcích kosterního svalstva transgenních prasat ze tří různých věkových skupin a srovnání s wild-type kontrolami

4. Materiál a metody

4.1 Použité přístroje

- 3D míchačky, Hettich (Německo)
- analytické váhy, ScalTec (USA)
- aparatura na vertikální elektroforézu MiniPROTEAN 3 Cell, BioRad (USA)
- automatické pipety Eppendorf (Německo); Gilson (USA); Thermo Electron (USA)
- blotovací aparatura Trans Turbo blot, BioRad (USA)
- centrifugy Biofuge 28RS, Heraeus (Německo)
- elektroforetické zdroje PowerPac 1000, BioRad (USA)
- homogenizátor, Labortechnik (Německo)
- chladicí a mrazicí boxy Liebherr (Švýcarsko); Sanyo (Japonsko); Zanussi (Itálie)
- ledovač, Brema Ice Makers (Itálie)
- magnetická míchačka AREX, P-Lab (ČR)
- odstředivka, Hettich (Německo)
- pH-metr 774, Metrohm (Švýcarsko)
- předvážky, ScalTec (USA)
- scanner CanonScan 9950F, Canon (Kanada)
- spektrofotometr UV-2401PC, Shimadzu (Japonsko)
- sušička gelů Whatman, Biometra (Německo)
- SynGene G:Box, Syngene (USA)
- termoblok, Lab-Met (ČR)
- vakuová vývěva, Labortechnik (Německo)
- Vortex-Genie 2, Scientific Industries (USA)

- pro experimenty bylo používáno běžné laboratorní sklo (Simax, ČR), plastové kyvety (BRAND GmbH, Německo) a plast (Axygen, USA; Eppendorf, Německo; Gilson, USA; TPP, Švýcarsko; Verkon, ČR; Schoeller, ČR). Dále pak Whatman® filtrační papír, Whatman (Německo).

4.2 Software

- Adobe Photoshop®, Adobe Systems (USA)
- GeneSys, Syngene (USA)
- Quantity One Basic 1D Analysis Software, BioRad (USA)

4.3 Použité chemikálie

4.3.1 Komerční chemikálie a směsi

- | | |
|---|------------------------|
| • 2-merkaptoethanol | Sigma-Aldrich, USA |
| • akrylamid | Sigma-Aldrich, USA |
| • aprotinin | Sigma-Aldrich, USA |
| • APS | Sigma-Aldrich, USA |
| • bis-tris-HCl | Sigma-Aldrich, USA |
| • Bradfordovo činidlo | BioRad, USA |
| • bromfenolová modř | Sigma-Aldrich, USA |
| • BSA | Sigma-Aldrich, USA |
| • Coomassie brilliant Blue R-250 | Sigma-Aldrich, USA |
| • EDTA | Sigma-Aldrich, USA |
| • glycerol | Penta, ČR |
| • glycin | Sigma-Aldrich, USA |
| • HCl | Penta, ČR |
| • isopropylalkohol | Penta, ČR |
| • KCl | Lachema, ČR |
| • kyselina octová | Penta, ČR |
| • luminiscenční substrát SuperSignal WestFemto Sensitivity Substrate Thermo | Life Technologies, USA |
| • methanol | Penta, ČR |
| • N'N'-metylen-bis-akrylamid | Sigma-Aldrich, USA |
| • NaCl | Penta, ČR |

- PIC Sigma-Aldrich, USA
- PMSF Sigma-Aldrich, USA
- PVDF Sigma-Aldrich, USA
- primární monoklonální protilátky:
anti-NDUFA9, CORE 1, SDH70, SDH30, COX1, COX5 α , F1 α , OSCP, OPA1, VDAC1/porin,
PDH koktejl, akonitáza, mitofilin vše Abcam, USA
- SDS Sigma-Aldrich, USA
- SeeBlue Plus2 Prestained Protein Marker Invitrogen, USA
- sekundární myší protilátka - *anti-mouse IgG peroxidase conjugate*
Sigma-Aldrich, USA
- sodium deoxycholát Sigma-Aldrich, USA
- sušené odtučněné mléko Laktino, ČR
- TEMED Sigma-Aldrich, USA
- tricín Sigma-Aldrich, USA
- Trisma base (Tris-HCl) Sigma-Aldrich, USA
- Triton X-100 Sigma-Aldrich, USA
- Tween-20 Sigma-Aldrich, USA

4.3.2 Roztoky připravené v laboratoři

- anodový pufr (SDS-PAGE) – 100mM Tris-Cl, pH 8,9
- barvicí roztok na gely – 0,25% (w/v) Coomassie brilliant Blue R-250; 45% (v/v) methanol; 10% (v/v) octová kyselina
- gelový pufr (pro SDS-PAGE) koncentrovaný 3x – 3 M Tris-Cl, pH 8,45; 0,3 % SDS
- isolační médium – 50mM Tris-Cl, pH 7,5; 150mM KCl, 2mM EDTA
- katodový pufr (SDS-PAGE) – 100 mM Tris-Cl, pH 8,9; 100 mM tricín; 0,1 % SDS
- odbarvovací roztok na gely – 25% (v/v) methanol; 10% (v/v) octová kyselina; dH₂O
- RIPA pufr – 50 mM Tris-Cl, pH 7,4; 150 mM NaCl; 1 mM PMSF; 1 mM
- TBS pufr (koncentrovaný 10x) – 20mM Tris-Cl; 130mM NaCl; pH 7,6
- TBST pufr – 1x TBS, pH 7,5; 0,1% Tween20
- transferový pufr – 25mM Tris-Cl; 192mM glycin; 10% (v/v) methanol; 0,02% SDS

- vzorkový pufr (SDS-PAGE) 4x koncentrovaný – 50 mM Tris-Cl, pH 6,8; 12 % (v/v) glycerol; 4 % (v/v) SDS; 2 % (v/v) β -merkaptoetanol; 0,01 % (v/v) bromfenolová modř
- zásobní roztok aprotininu – 0,01M Tris-Cl, pH 8,0

4.4 Biologický materiál

K experimentům byl využit materiál pocházející z modelu miniaturního prasete exprimujícího prvních 548 aminokyselin HTT genu pod kontrolou lidského HTT promotoru. Model byl vytvořen metodou transdukce embryí lentivirovým vektorem s N-terminální zkrácenou formou lidského HTT genu nesoucího prvních 548 AK HTT se 145 CAG repeticemi (HIV-1-HN-548aaHTT-145Q)(Baxa et al., 2013).



Obr. 10 – Model transgenního miniaturního prasete vyvinutý ÚŽFG v Liběchově (<http://www.iapg.cas.cz/>)

Transgenní i wild-type selata byla generována mikroinjekcemi s vektory do periviteliního prostoru jednobuněčných embryí (v počtu 50-100 vektorů na 1 zygotu). Takto oplozená embrya byla *in vitro* kultivována do fáze blastocysty a následně laparoskopicky aplikována do akceptorových prasnic, kde se dále vyvíjela jako při klasické březosti (Baxa et al., 2013).

Mitochondriální frakce využitě k experimentům pocházely z biopsií svalové tkáně (*musculus quadriceps femoris*) modelových transgenních prasat (Tg) a kontrolních wild-type (WT) jedinců tří skupin různého stáří – 24, 36 a 48 měsíců z F2 generace obojího pohlaví – **tab. 1**. Biopsie byla provedena v celkové anestezii a vzorek byl tentýž den zpracován. Zásobní alikvoty mitochondriálních frakcí byly uchovávány v -80°C pro pozdější použití.

Tab. 1 – Seznam probandů jednotlivých věkových skupin

24 měsíců	36 měsíců	48 měsíců
WT_K54 ♂	WT_K48 ♀	WT_K14 ♂
WT_K363 ♀	WT_K64 ♂	WT_K97 ♀
WT_K556 ♂	WT_K103 ♂	WT_K99 ♂
Tg_K10 ♀	Tg_K63 ♂	WT_K154 ♀
Tg_K55 ♀	Tg_K100 ♀	WT_K207 ♂
Tg_K557 ♀	Tg_K104 ♂	WT_K208 ♀
Tg_K558 ♀		Tg_K101 ♀
		Tg_K102 ♀
		Tg_K162 ♂
		Tg_K209 ♀

4.5 Metody

Metodou elektroforézy v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE) následovanou Western blotem a imunodetekcí (někdy tuto metodu též nazýváme imunoblot), jsme pomocí protilátek detekovali vybrané proteiny ve svalové tkáni (celkem jsme značili 14 odlišných protilátek/proteinů). Jednotlivé proužky („bandy“) představují vždy jeden specifický protein u zdravých kontrol i transgenních jedinců. Pro každý komplex systému OXPHOS I-V byl vybrán nejméně jeden protein, dále jsme značili proteiny související

s oxidativním stresem (např. akonitáza) a energetickým metabolismem (např. PDH – pyruvátdehydrogenázový komplex) a jako „loading control“ protein, tedy kontrolní protein, jehož koncentrace se ve tkáni neměnila, byl použit porin.

4.5.1 Příprava homogenátu a mitochondriální frakce z kosterního svalu

Do izolačního média byly přidány 2ul zásobního aprotininu. Ze zvážené svalové tkáně, odebrané v lokální anestezii, byly mechanicky (pinzetou a nůžkami) vypreparovány šlachy a tuková tkáň a sval byl přemístěn na Petriho misku na led, kde byl opláchnut isolačním médiem k odstranění zbytků krve. Po přidání 0,5 ml nového média byl sval očnými nůžkami rozstříhán na velice malé kousky a ustříženou špičkou na pipetě přenesen do vychlazené homogenizační nádoby homogenizátoru. Tkáň byla homogenizována dvakrát po dobu 15s na 4. stupeň na Ultrathoraxu a 15x homogenizována teflonovým pístem za neustálého chlazení. Homogenát byl následně promíchán na vortexu a rozpipetován do mikrozkušavek, ve kterých byl centrifugován při 4°C po dobu 10 min, 600g. Supernatant byl přes sítko zfiltrován do vychlazené 50 ml falkony, zbylý sediment byl resuspendován v ½ původního objemu homogenitu v novém médiu v homogenizátoru a opět centrifugován. Následně byl přes sítko zfiltrován k supernatantu z první centrifugace a spojený supernatant byl centrifugován při 4°C po dobu 10 min při 10000g, při čemž sedimentují mitochondrie. Sedimentované mitochondrie byly resuspendovány médiem a opět zcentriugovány při 4°C po dobu 10 min při 10000g. Vzniklá peleta mitochondrií byla naředěna homogenizačním médiem v poměru 100mg původní tkáně na 25ml média, resuspendována špičkou a uložena do -80°C.

4.5.2 Příprava vzorků na SDS-PAGE

Izolované mitochondrie z tkání (srdce, mozek, kosterní svaly) byly resuspendovány v RIPA pufru (RIPA + 1% PIC), uloženy na ledu, během 20 minut 3x promíchány na vortexu a centrifugovány při 4°C při 51 000 g / 28 000 rpm po dobu 20 minut. Supernatant byl poté odpipetován do čistých označených mikrozkušavek, z nichž byly odebrány 1 µl na stanovení koncentrace proteinů podle Bradfordové (Bradford et al., 1976). Podle naměřené koncentrace byly připraveny vzorky na SDS-elektroforézu (10µg/gel/jamka). Také byly připraveny blanky

(slepé vzorky) k doplnění prázdných jamek na gelu o složení 2,5 μ l 4xSB + 7,5 μ l RIPA pufru s 1% PIC. Merkaptoethanol, který je součástí vzorkového pufru (*sample buffer*), zde funguje jako redukující činidlo a způsobuje denaturaci proteinů ve vzorku. K denaturaci přispívá také SDS, který obaluje proteiny a zajistí, že mají všechny záporný náboj.

Takto připravený vzorek byl ihned inkubován při 37°C po dobu 30 minut a následně proběhlo loadování vzorku do jamek polyakrylamidového gelu a následovala elektroforéza. (protokol upraven podle Sambrook et Russell, 2006).

4.5.3 Stanovení koncentrace proteinů dle Bradfordové

Stanovení proteinu ve vzorku bylo měřeno v dubletu metodou dle Bradfordové. K 799 μ l ddH₂O byl přidán 1 μ l vzorku a 200 μ l Bradfordova barviva. Kalibrační křivka byla vytvořena podle následující tabulky:

Tab. 2 – Příprava kalibrační křivky pro stanovení koncentrace proteinů dle Bradfordové

Zkumavka č.	Výsledná koncentrace proteinu	Destilovaná voda (μ l)	BSA (μ l)	Bradfordovo barvivo (μ l)
1	0	800	0	200
2	1	795	5	200
3	2	790	10	200
4	3	785	15	200
5	4	780	20	200
6	5	775	25	200

Takto připravené vzorky i blanky byly 5 min inkubovány při pokojové teplotě a před měřením promíchány na vortexu. Spektrofotometrickým měřením nárůstu absorbance při 595nm bylo stanoveno množství komplexu Bradfordovo činidlo:protein, odpovídající koncentraci proteinu ve vzorku podle standardního protokolu (Bradford et al., 1976).

4.5.4 SDS-PAGE

Dělení proteinů podle molekulové hmotnosti probíhá v separačním polyakrylamidovém gelu, ve kterém je polymerace akrylamidu katalyzována APS, jež dodává reakci volné radikály a TEMED, jež polymerační reakci stabilizuje.

Po sestavení aparatury na elektroforézu byl na ledu připraven 12% separační polyakrylamidový gel (*tab. 3*) a po převrstvení ddH₂O 1 hodinu polymeroval při pokojové teplotě. Na něj byl navrstven 4% zaostřovací polyakrylamidový gel (*tab. 3*), 30 minut tuhl s žebříčkem a po sestavení aparatury byla skla s gelem přenesena do elektroforetické vany s pufru. Do jamek, vzniklých vyndáním hřebenu z gelu, byly napipetovány jednotlivé vzorky a blanky a elektroforézou byly rozděleny proteiny. Pro kontrolu separace podle molekulové hmotnosti byly použity 4 μ l markeru molekulové hmotnosti (SeeBlue Plus2, Invitrogen). Použité napětí při separaci proteinů v zaostřovacím gelu bylo 40 V po dobu 30 min a 90 V po dobu 1,5 – 2 hod v gelu separačním (protokol upraven podle Sambrook et Russell, 2006).

Tab. 3 – Složení gelů pro SDS-elektroforézu

komponenta	Separací gel - 12%	Zaostřovací gel - 4%
ddH ₂ O	4,2 ml	5,8 ml
3x GB	3,3 ml	3,3 ml
AB	2,4 ml	0,8 ml
APS 10%	50 μ l	120 μ l
TEMED	5 μ l	12 μ l

4.5.5 Semi – dry western blot (polosuchý elektrotransfer proteinů z gelu na PVDF membránu)

Po proběhnutí elektroforézy byl gel ekvilibrován 30 minut v transferovém pufru na 3D míchačce při 20 rpm. PVDF membrána stejného rozměru jako gel byla mezitím aktivována 15 sekund ve 100 % methanolu, následně inkubována 5 minut v ddH₂O a 10-15 minut v transferovém pufru.

Pro přenos elektroforeticky separovaných proteinů z gelu na PVDF membránu byla využita blotovací aparatura Trans Turbo Blot (BioRad,USA). Postupovalo se podle výrobcem doporučeného návodu. Přenos proteinů na membránu probíhal 7 min za konstantního napětí a proměnného proudu. Po skončení přenosu proteinů byla PVDF membrána s přebloťovanými proteiny vysušena na vzduchu a imunodetekována se specifickými protilátkami (viz dále).

4.5.6 Barvení a sušení gelu

Jeden gel v každé sérii byl obarven přes noc v barvicím roztoku na 3D míchačce při 20 rpm, druhý den následně odbarven odbarvovacím roztokem, dokud nebyly patrné pouze proužky proteinů. Gel byl opláchnut v ddH₂O, přenesen na Whatmanův papír a vysušen při 80°C po dobu 1 hodiny na sušičce gelů Whatman. Po vysušení a vyrovnání gelu byla data oskenována do počítače.

4.5.7 Imunodetekce se specifickou protilátkou

Vysušená PVDF membrána byla aktivována vložením na 15 s do methanolu, následně opláchnuta ddH₂O po dobu 5-15 minut a 2 h blokována na 3D míchačce při 10 rpm v 5 % odtučněném mléce v 50 ml TBS při pokojové teplotě, nebo přes noc při 4°C. Blokováním je zabráněno vazbě protilátek na nespecifická vazebná místa a bráněno šumu při vyhodnocování výsledků.

Poté byla membrána promyta 3x 10 min v 1x TBS a inkubována 2 h s primární protilátkou (*tab. 4*), opláchnuta 3x 10 min 1x TBST a inkubována 1 hodinu se sekundární myší protilátkou (1:4000 ve 2 % mléce v TBST; 20 ml) a opláchnuta 3x 10 min TBST a 10min TBS. Využitím SuperSignal WestFemto Sensitivity Substrate kitu (Thermo Scientific) byla na značené PVDF membráně vyvolána luminiscenční reakce. Signál byl snímán prostřednictvím GeneSys zobrazovacího softwaru přístrojem Syngene.

Tab. 4 – Seznam použitých primárních a sekundárních protilátek

Zařazení proteinu	Primární protilátka	množství ve 20 ml TBST (μ l)	Sekundární protilátka
Komplex I	NDUFA9	7	myš
Komplex II	SDH30	10	myš
	SDH70	1,5	myš
Komplex III	CORE 1	1	myš
Komplex IV	COX1	3	myš
	COX5 α	5	myš
Komplex V	F1 α	6	myš
	OSCP	10	myš
další proteiny	OPA1	10	myš
	PDH koktejl*	5	myš
	akonitáza	8	myš
	mitofilin	20	myš
kontrolní protein	porin	6	myš

*PDH koktejl zahrnuje tyto podjednotky - PDH E2, PDH E2/E3 bp, PDH E1 α , PDH E1b

4.5.8 Vyhodnocení dat

Snímky získané zobrazovacím softwarem SynGene, představující jednotlivé proužky specifických proteinů, byly zpracovány kvantifikačním softwarem QuantityOne Basic, kterým byla kvantifikována intenzita signálu jednotlivých protilátek. Tyto intenzity byly zpracovány v programu Excel (Microsoft Office) a vyneseny do grafů.

5. Výsledky

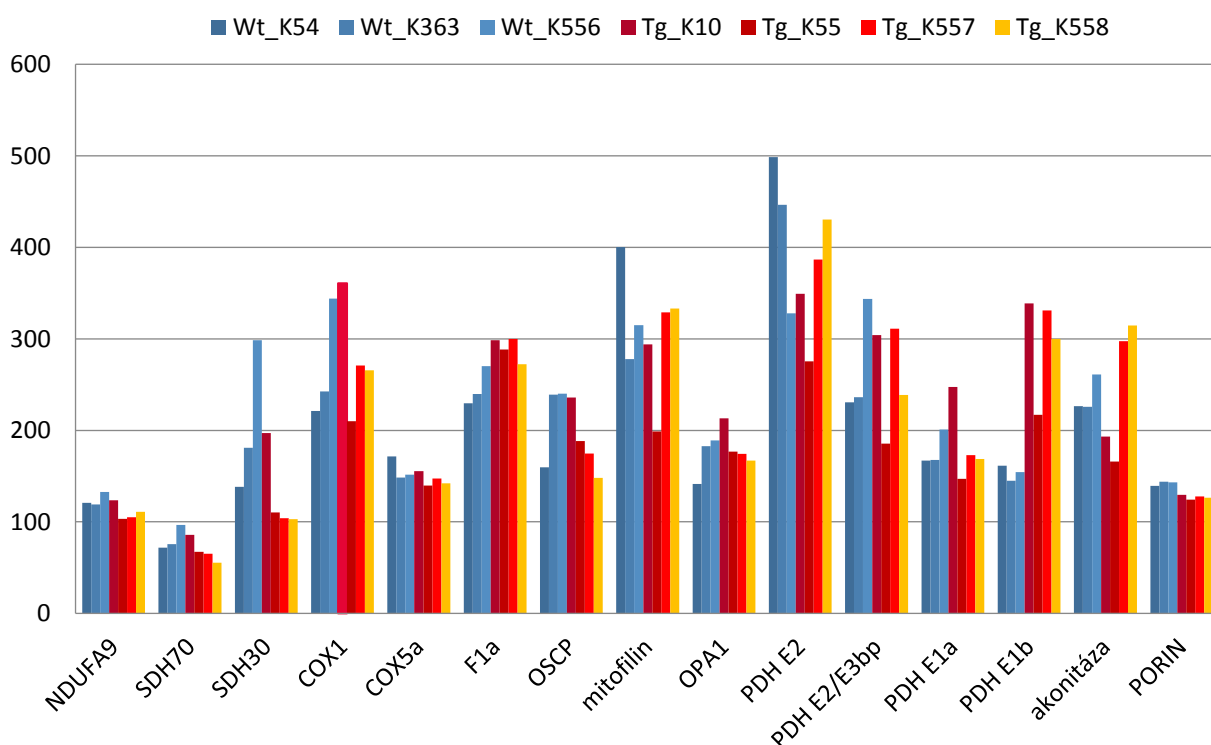
K dispozici jsme měli vzorky svalové tkáně (*musculus quadriceps femoris*) tří věkových skupin prasečího modelu HN ve věku 24, 36 a 48 měsíců. V každé věkové skupině jsme měli rovnoměrný počet kontrolních wild-type a transgenních jedinců, minimální počet probandů byl 6, vždy byli v souboru nejméně 3 kontrolní a 3 transgenní jedinci.

Při přípravě vzorků jsme postupovali podle předem daného protokolu a 10 μ l mitochondriální frakce z každého vzorku jsme rozdělili pomocí SDS elektrofrézy na polyakrylamidovém gelu. Na každý gel byly přeneseny vzorky jedné věkové skupiny v pořadí marker – kontroly - transgenní jedinci a po přenesení rozdělených proteinů na PVDF membránu metodou semi-dry Western blot byla každá membrána značená jednou protilátkou metodou imunodetekce. Následně byl na značenou membránu nanesen luminiscenční roztok (SuperSignal WestFemto Sensitivity Substrate Thermo), došlo k vyvolání peroxidázové reakce a membrána byla vyfocena přístrojem Syngene, který snímá intenzitu signálu proteinů a vyhodnocena softwarem GeneSys.

Snímky membrán získané přístrojem Syngene jsme kvantifikovali softwarem Quantity One Basic a v programu Microsoft Excel jsme z těchto dat vytvořili grafy, ze kterých lze určit poměr mezi intenzitou signálu zdravých kontrol (wild-type) a transgenních jedinců. Ukázalo se, že u prasat se kromě vlivu mutace projevuje také variabilita mezi jedinci v rámci skupiny kontrol a předpokládáme variabilitu také mezi transgenními jednotlivci. Sledovali jsme celkem 14 proteinů, které souvisí s oxidačním stresem a hrají roli v elektrontransportním řetězci a tvorbě ATP.

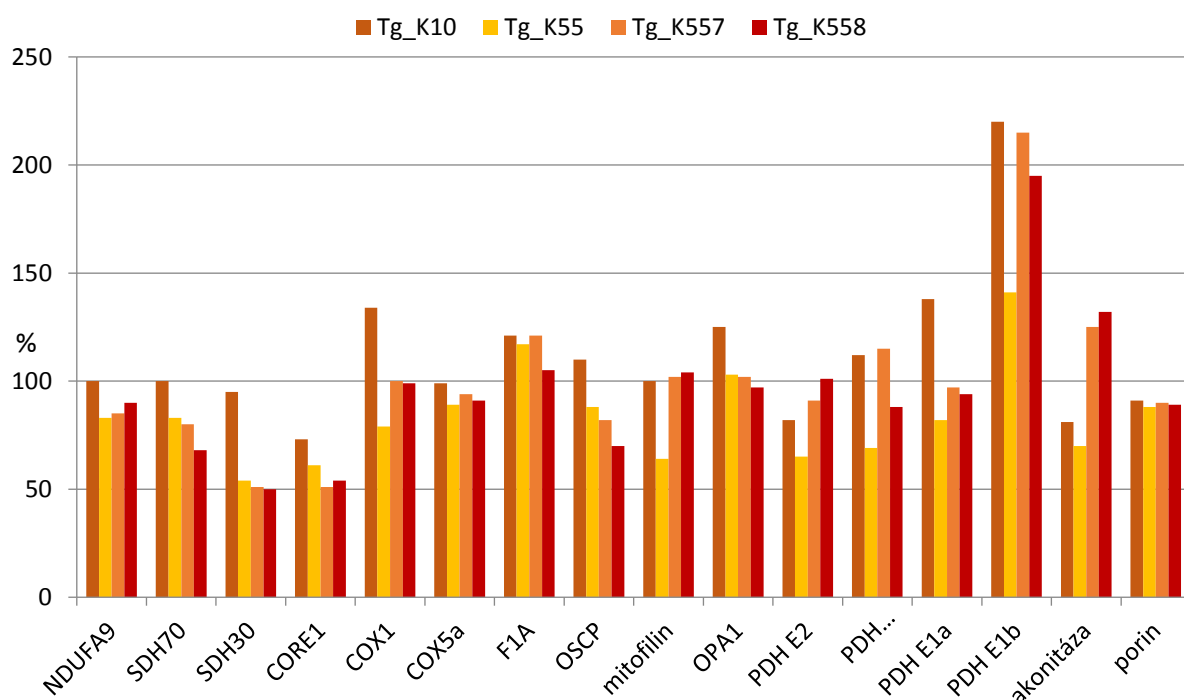
5.1 Analýza vybraných mitochondriálních proteinů ve svalové tkáni prasečího modelu Huntingtonovy choroby ve věku 24 měsíců

Jako první skupinu vzorků prasečího kosterního svalu jsme analyzovali 24 měsíců stará prasata. K experimentům jsme použili vzorky svalové tkáně pocházející od 7 jedinců, 4 z nich byla transgenní (Tg_K10, Tg_K55, Tg_557, Tg_K558) a 3 byla kontrolní *wild-type* prasata (WT_K54, WT_K363, WT_K556). 10 μg z každého vzorku bylo separováno pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE), vybrané proteiny byly detekovány pomocí semi – dry Western blotu s následnou imunodetekcí (celkem jsme značili 14 odlišných protilátek). Jako kontrola množství nanášeného proteinu na gel (*loading control*) byl použit protein porin, jehož množství se během HN nemění. Signál jsme zachytili pomocí luminiscenčního substrátu přístrojem Syngene (**obr. 11**). Pro vyhodnocení intenzity signálu jsme zvolili program Quantity One Basic a základní data jsme převedli do grafu (**graf 1**).

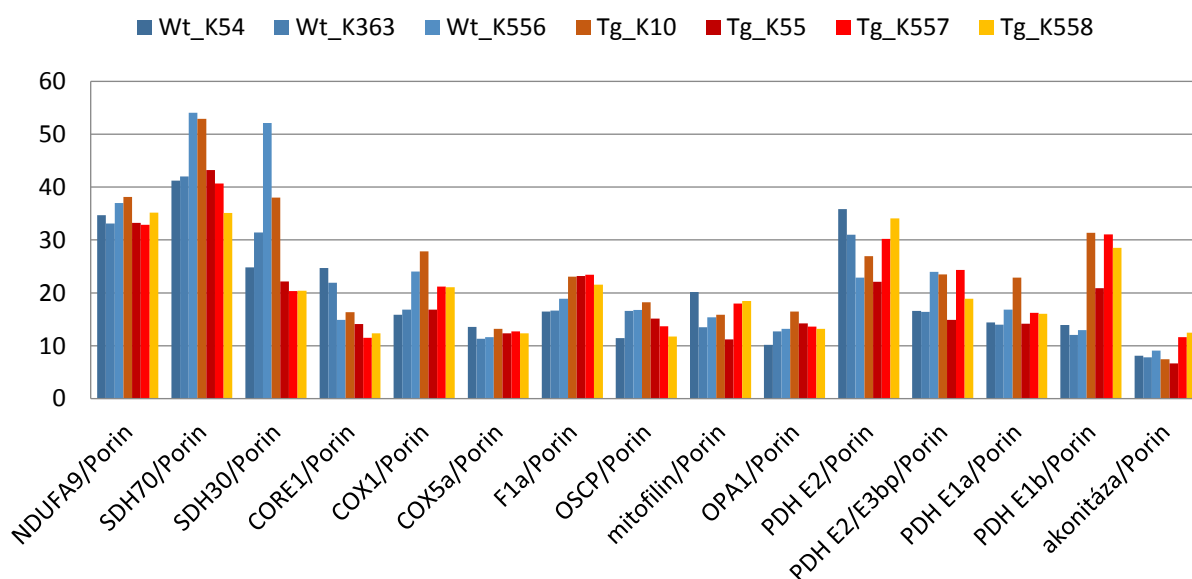


Graf 1 - Kvantifikace vybraných mitochondriálních proteinů ve svalové tkáni prasat věku 24 měsíců analyzovaných SDS-PAGE s následným Western blotem. Intenzita signálu jednotlivých protilátek u kontrolních WT prasat (modré sloupce, n=3) a transgenních prasat (odstíny červené, n=4). Na ose x je vynesena intenzita signálu získaná v programu Syngene.

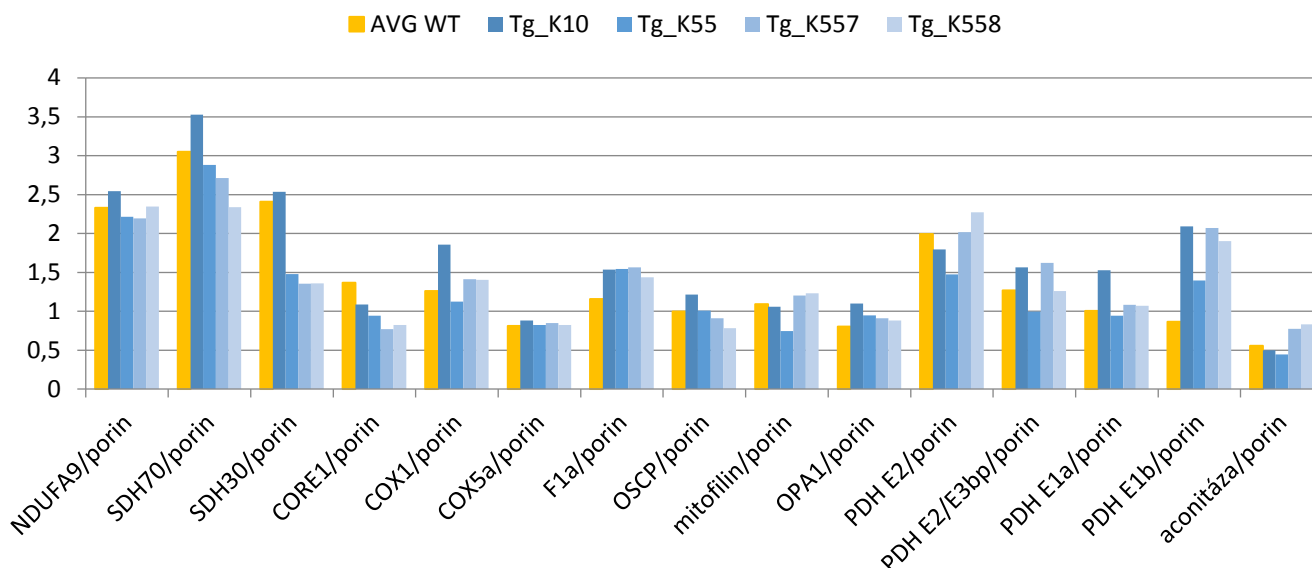
Dalším krokem bylo zprůměrování hodnot kontrolních vzorků (WT_K54, WT_K363, WT_K556) k porovnání s transgenními jedinci (**graf 2**). Normalizaci dat jsme provedli vynesemím základních dat k porinu – námi vybraný kontrolní protein (**graf 3**).



Graf 2 - Kvantifikace vybraných mitochondriálních proteinů ve svalové tkáni prasat věku 24 měsíců analyzovaných SDS-PAGE s následným Western blotem. Intenzita signálu jednotlivých proužků transgenních prasat (n=4, odstíny červené) vztažená k průměru kontrol (představující 100% na ose y).



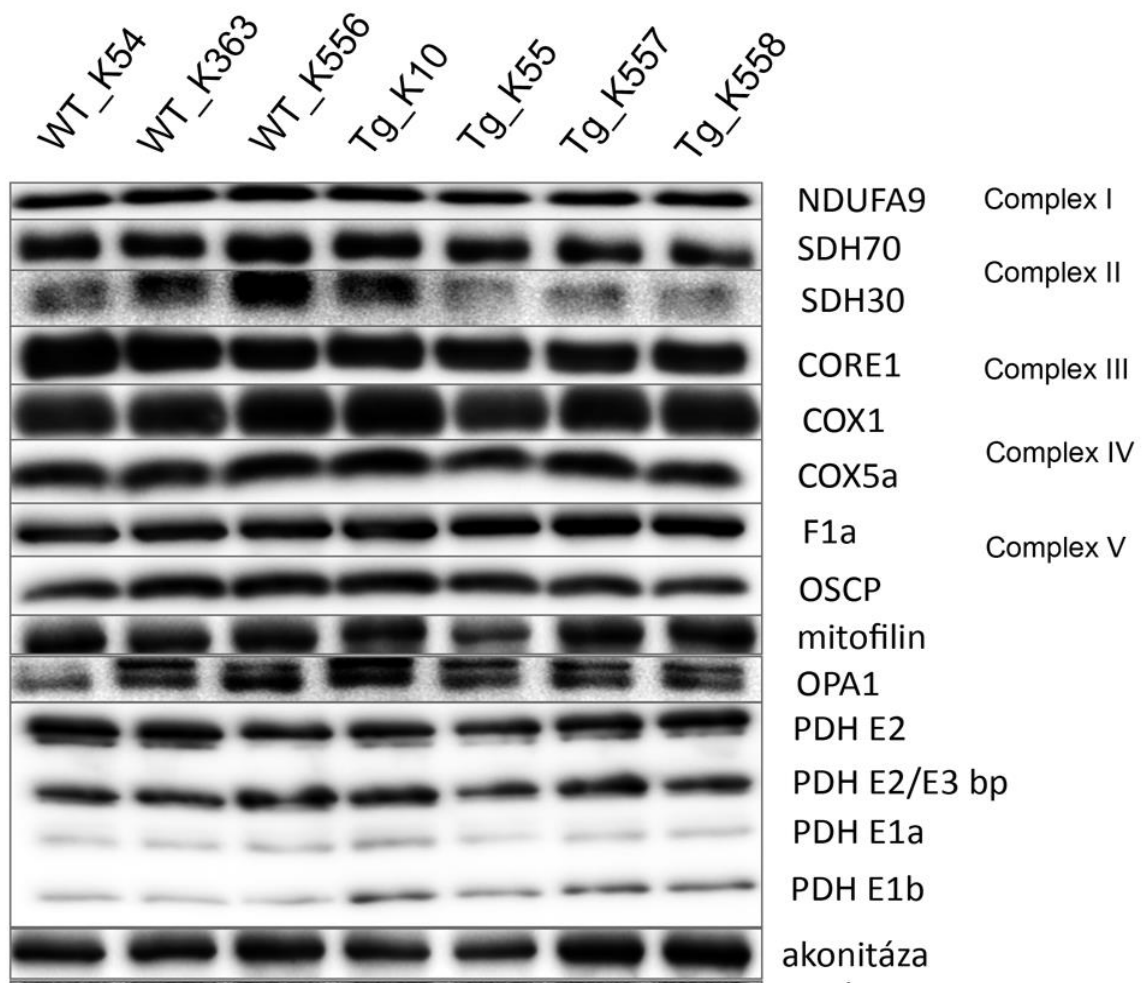
Graf 3 - Kvantifikace vybraných mitochondriálních proteinů ve svalové tkáni prasat věku 24 měsíců analyzovaných SDS-PAGE s následným Western blotem. Intenzita signálu jednotlivých proužků u kontrolních WT prasat (modré sloupce, n=3) a transgenních prasat (odstíny červené, n=4) normalizovaná na kontrolní protein porin. Na ose x je vynesena intenzita signálu získaná v programu



Graf 4 - Kvantifikace vybraných mitochondriálních proteinů ve svalové tkáni prasat věku 24 měsíců analyzovaných SDS-PAGE s následným Western blotem. Intenzita signálu jednotlivých proužků normalizovaná s kontrolním proteinem porinem, u kontrolních WT prasat je intenzita signálu zprůměrována (žlutý sloupec), modře transgenní prasata (n=4)

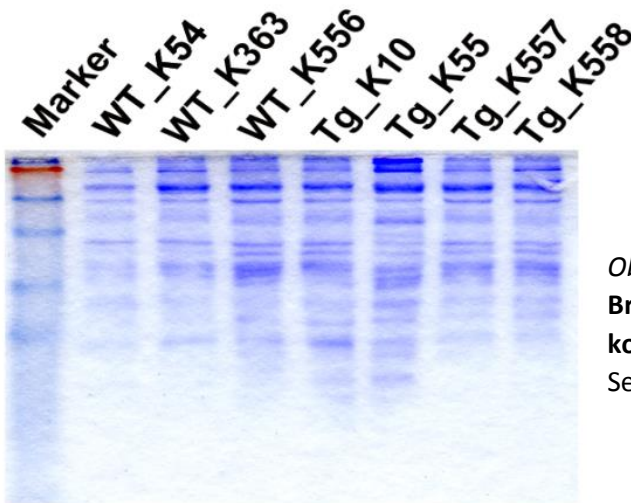
U prasat ve věku 24 měsíců jsme nedetekovali signifikantní změny postihující všechny transgenní jedince. Rozsah změn se lišil napříč transgenními jedinci i zdravými kontrolami, důvodem je spíše variabilita mezi jednotlivci, než vliv mutace. Z grafů 1 a 2 je patrné, že již v tomto raném věku lze pozorovat velmi mírný pokles obou námi sledovaných podjednotek komplexu II – sukcinát dehydrogenázy 70 i 30 (SDH70, SDH30). Z dat získaných kvantifikací jednotlivých proteinových proužků můžeme dále usuzovat na mírný pokles komplexu I reprezentovaného proteinem NDUFA9, komplexu IV - proteinu COX1 (podjednotka 1 cytochrom c oxidázy) a proteinu OSCP (*oligomycin sensitivity-conferring protein*) patřícího ke komplexu V. U pyruvát dehydrogenázy bylo detekováno snížení jednotlivých podjednotek v různé míře, což může být důsledek počátku narušení energetického metabolismu. U takto mladých prasat jsme předem nepředpokládali pozorovatelné změny množství jednotlivých proteinů.

Graf č. 3 reprezentuje výsledky korelace sledovaných proteinů s kontrolním proteinem porinem. Kromě výše zmíněných změn zde lze lépe pozorovat zvýšené množství obou námi sledovaných subpodjednotek podjednotky E1 komplexu pyruvátdehydrogenázy (PDH E1 α i PDH E1b). Pro přehlednější orientaci a interpretaci hodnot jsme v **grafu č.4** zprůměrovali hodnoty 3 kontrolních wild-type jedinců.



Obr. 11 - Stanovení množství vybraných proteinů pomocí SDS-PAGE elektroforézy a Western blotu s následnou imunodetekcí v kosterním svalu prasat TgHN (n=3) and Wt (n=4) z F2 generace ve věku 24 měsíců. Izolované mitochondriální proteiny byly separovány SDS-PAGE elektroforézou a následně přebloťovány metodou Western Blot a imunodetekovány se specifickými protilátkami (Abcam). Pouhým okem nelze detekovat žádné výrazné změny mezi kontrolními a transgenními jedinci s výjimkou malých změn v intenzitě komplexu I (NDUFA9), snížení podjednotky SDH30 a částečně SDH70 komplexu II.

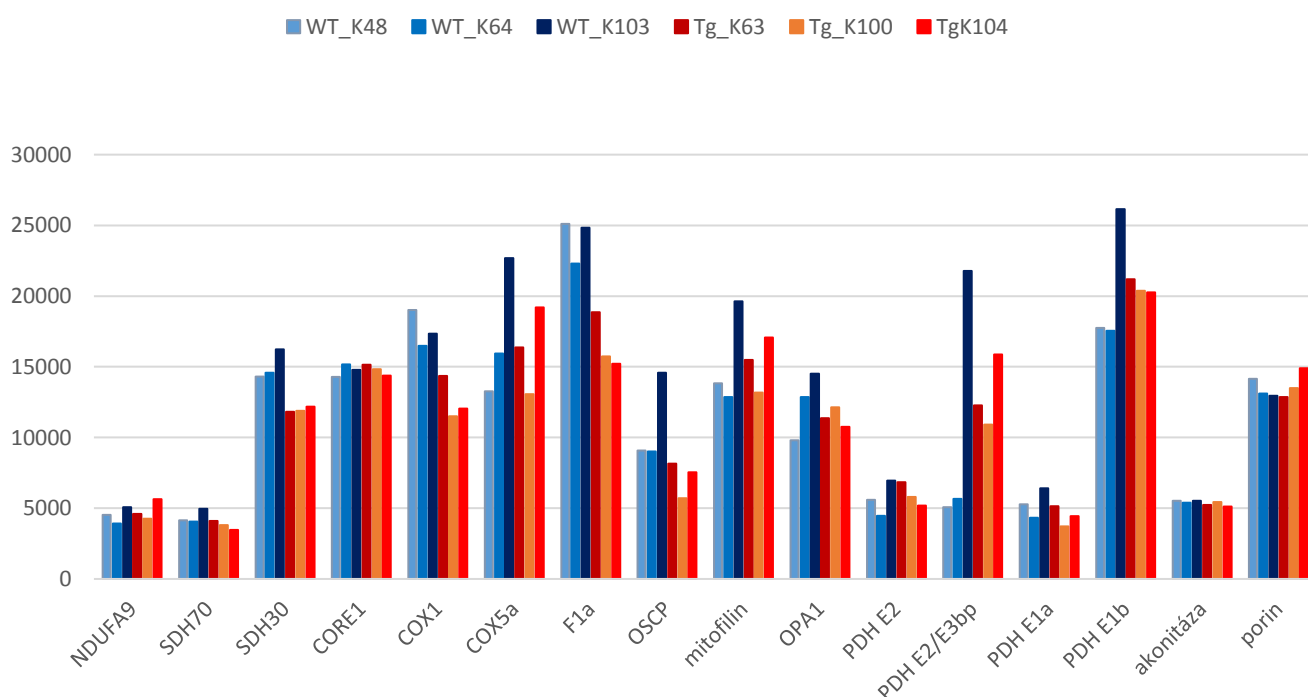
Po dokončení Western Blotu jsme obarvili gel modrým barvivem Coomasie Brilliant Blue a následně ho vysušili na sušičce. Takto připravený gel byl oskenován do počítače (**obr. 12**). Gel nám sloužil jako kontrola správného přenosu a proteinů. Je třeba počítat s možností, že při manipulaci s gelem, barvením a sušením může stejně, jako nekvalitním skenováním, dojít ke zkreslení výsledného obrázku.



Obr. 12 – Gel obarvený Coomasie Brilliant Blue – 24 měsíční prasata, kosterní sval. Jako Marker byl použit SeeBlue Plus2 (Invitrogen)

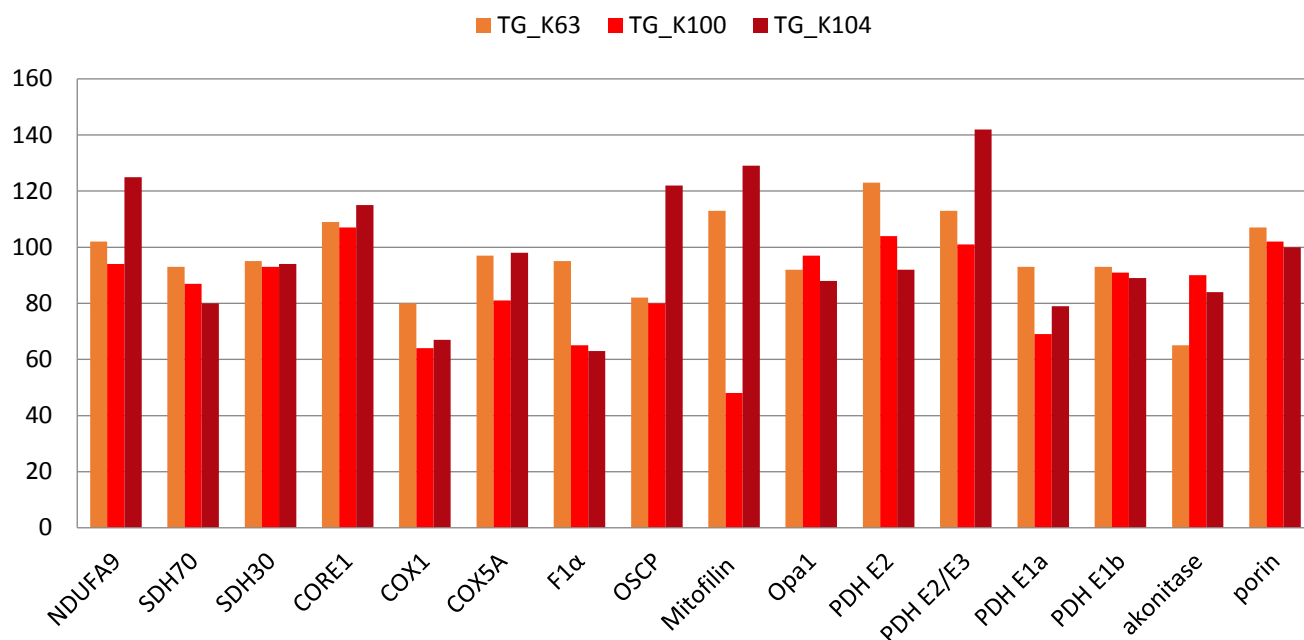
5.2 Analýza vybraných mitochondriálních proteinů ve svalové tkáni prasečího modelu Huntingtonovy choroby ve věku 36 měsíců

Druhou měřenou skupinu tvořily vzorky pocházející od 36 měsíců starých prasat. Měli jsme k dispozici vzorky svalové tkáně pocházející od 6 jedinců, první polovina byla 3 kontrolní *wild-type* prasata (WT_K48, WT_K64, WT_K103) a 3 prasata byla transgenní (Tg_K63, Tg_K100, Tg_104). 10 μg z každého vzorku bylo separováno pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE), vybrané proteiny byly detekovány pomocí Western blotu s následnou imunodetekcí (potupně jsme značili 14 protilátek). Jako kontrola množství nanášeného proteinu na gel (*loading control*) byl použit protein porin. Signál jsme zachytili pomocí luminiscenčního substrátu přístrojem Syngene (**obr. 13**). Pro vyhodnocení intenzity signálu jsme zvolili program Quantity One Basic a základní data jsme převedli do grafu (**graf 5**).

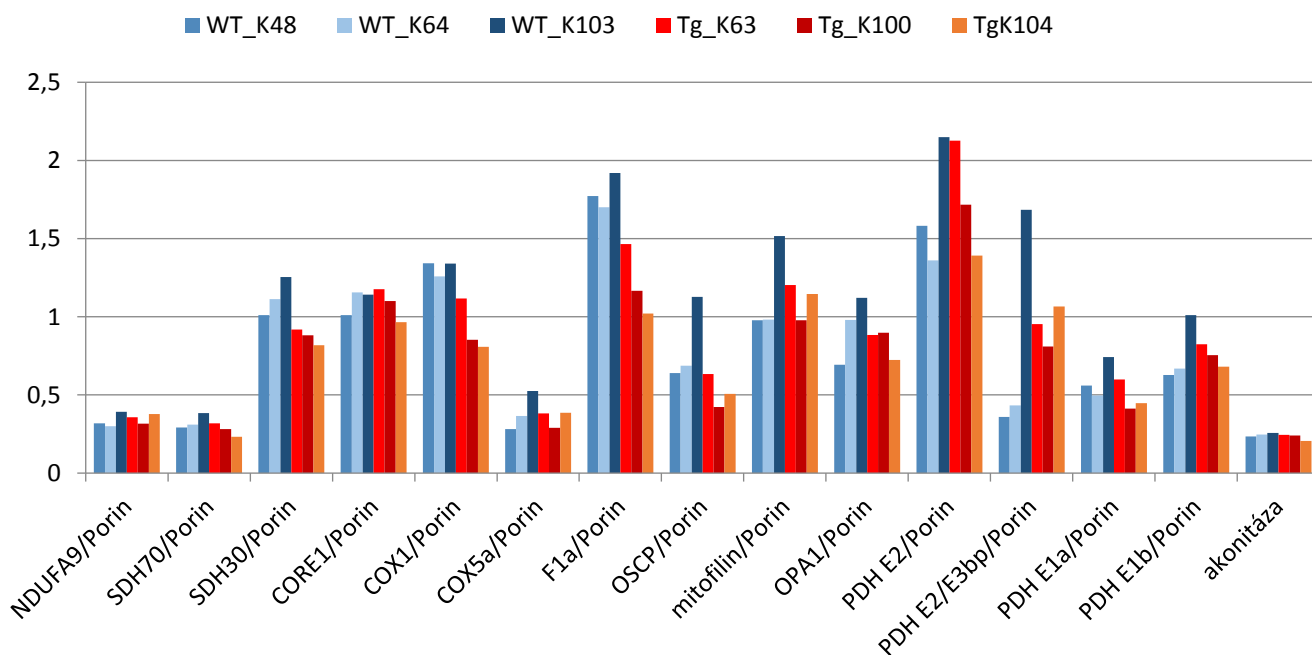


Graf 5 - Kvantifikace vybraných mitochondriálních proteinů ve svalové tkáni prasat věku 36 měsíců analyzovaných SDS-PAGE s následným Western blotem. Intenzita signálu jednotlivých protilátek u kontrolních WT prasat (modré sloupce, n=3) a transgenních prasat (odstíny červené, n=3). Na ose x je vynesena intenzita signálu získaná v programu Syngene.

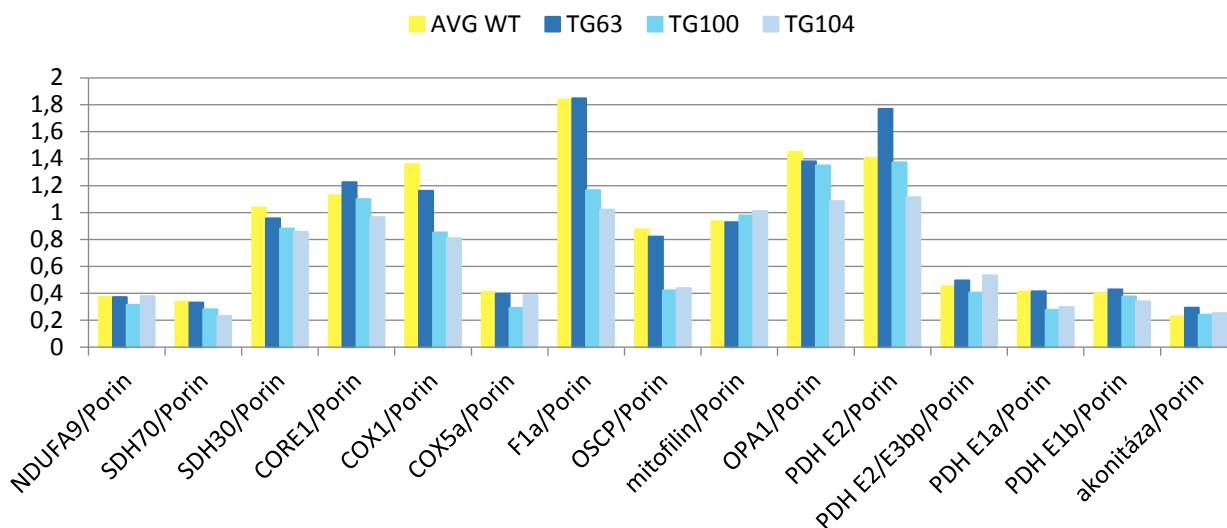
Následovalo zprůměrování hodnot kontrolních vzorků (WT_K48, WT_K64, WT_K103) k porovnání s transgenními jedinci (graf 6).



Graf 6 - Kvantifikace vybraných mitochondriálních proteinů ve svalové tkáni prasat věku 36 měsíců analyzovaných SDS-PAGE s následným Western blotem. Intenzita signálu jednotlivých proužků transgenních prasat (n=3, odstíny červené) vztažená k průměru kontrol (představující 100% na ose y).



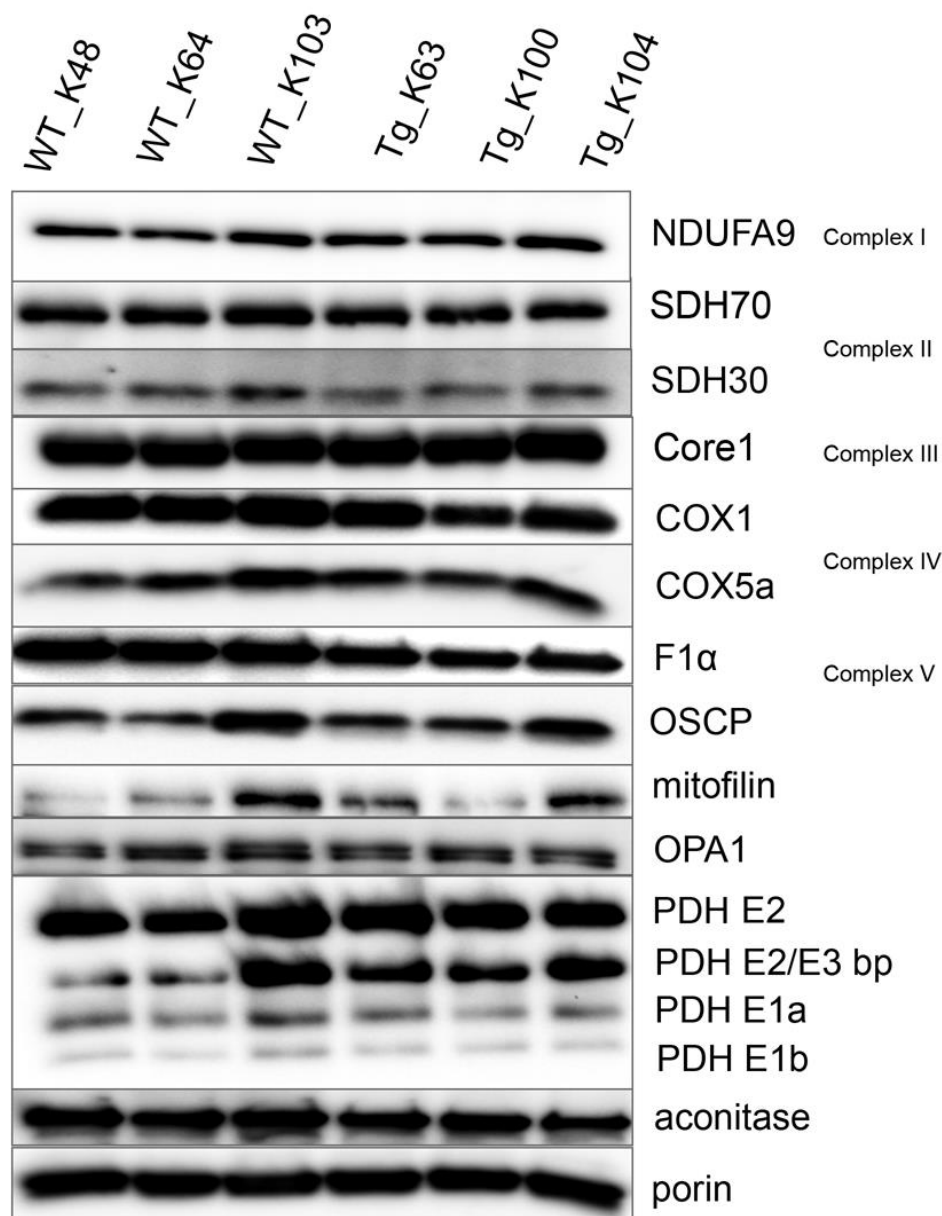
Graf 7 - Kvantifikace vybraných mitochondriálních proteinů ve svalové tkáni prasat věku 36 měsíců analyzovaných SDS-PAGE s následným Western blotem. Intenzita signálu jednotlivých proužků u kontrolních WT prasat (modré sloupce, n=3) a transgenních prasat (odstíny červené, n=3) normalizovaná s kontrolním proteinem porinem. Na ose x je vynesena intenzita signálu získaná v programu Syngene.



Graf 8 - Kvantifikace vybraných mitochondriálních proteinů ve svalové tkáni prasat věku 36 měsíců analyzovaných SDS-PAGE s následným Western blotem. Intenzita signálu jednotlivých protilátek normalizovaná s kontrolním proteinem porinem, u kontrolních WT prasat je intenzita signálu zprůměrována (žlutý sloupec), modře transgenní prasata (n=3). Na ose x je vynesena intenzita signálu získaná v programu Syngene.

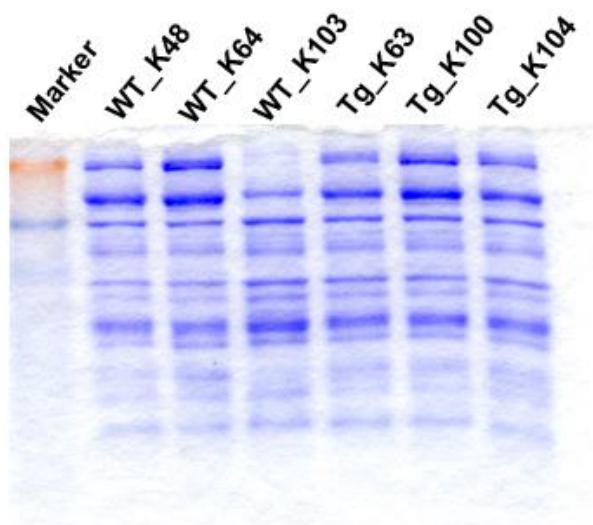
U prasat ve věku 36 měsíců jsme nedetkovali žádnou signifikantní změnu. Lze pozorovat další mírný pokles obou podjednotek komplexu II – SDH70 i SDH30 i komplexu III (protein COX1) a dochází k viditelnějším změnám v množství enzymů komplexu V (klesá protein F1 α). Progresivnější narušení energetického metabolismu má nejspíše za důsledek rozdíly v koncentraci proteinů jednotlivých podjednotek pyruvát dehydrogenázy. Opět lze sledovat rozdílnosti v rámci jednoho proteinu také mezi kontrolními jedinci danou nejspíše genetickou variabilitou jednotlivých modelových prasat.

Vynesením dat do grafu korelace intenzity signálu proteinů k porinu (**graf 7,8**) jsme byli schopni detekovat změny, ač málo významné, u všech námi sledovaných proteinů. Výrazněji, než ve 24 měsících, je změněna intenzita PDH komplexu. Všechny jeho podjednotky se zde nachází ve sníženém množství, kromě podjednotky E2/E3b, kde jsme naopak zaznamenali nárůst množství oproti kontrolám. Vidíme zde také snížení u fúzního proteinu OPA1, což nasvědčuje počátku destabilizace mitochondriální sítě v buňkách a možný počátek apoptózy.



Obr. 13 - Stanovení množství vybraných proteinů pomocí SDS-PAGE elektroforézy a Western blotu s následnou imunodetekcí v kosterním svalu prasat Tg (n=3) and Wt (n=3) z F2 generace stáří 36 měsíců. Izolované mitochondriální proteiny byly separovány SDS-PAGE elektroforézou a následně přebloťovány metodou Western Blot a imunodetekovány se specifickými protilátkami (Abcam). Lze pozorovat pokles množství proteinu SDH30 (komplex II), COX1 (komplex III), OSCP a F1α (komplex V) a viditelné projevy u všech sledovaných podjednotek PDH komplexu. Drobné změny se týkají také fúzního proteinu OPA1, který je lehce snížený.

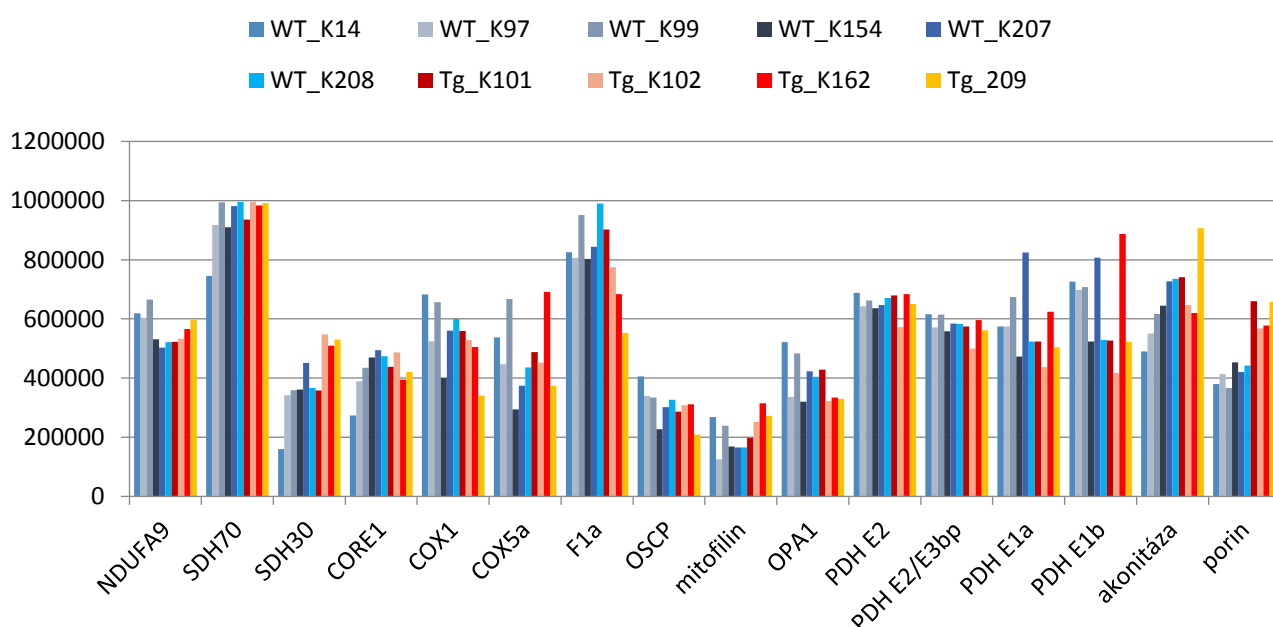
„Přebloťovaný“ gel jsme opět obarvili modrým barvivem Coomasie Brilliant Blue pro kontrolu přenosu proteinů na membránu (**obr. 14**).



Obr. 14 – Gel po proběhnutí SDS-PAGE s následným Western blotem obarvený Coomasie Brilliant Blue – 36 měsíční prasata, kosterní sval.
Jako Marker byl použit SeeBlue Plus2 (Invitrogen)

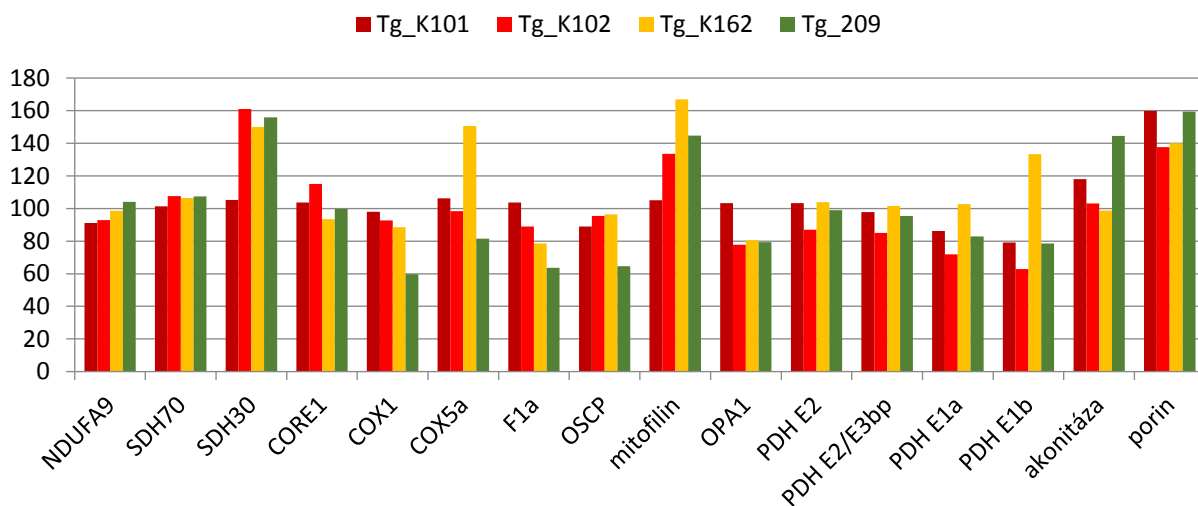
5.3 Analýza vybraných mitochondriálních proteinů ve svalové tkáni prasečího modelu Huntingtonovy choroby ve věku 48 měsíců

Poslední skupina vzorků pocházela od prasat věku 4 let, tedy 48 měsíčních. Vzorků jsme měli k dispozici vyšší počet, pocházely od 10 jedinců, z toho bylo 6 kontrolních wild-type prasat (WT_K14, WT_K97, WT_K99, WT_K15, WT_K207, WT_K208) a 4 prasata byla transgenní (Tg_K101, Tg_K102, Tg_162, Tg_K209). 10 μ g vzorku od každého jedince bylo separováno pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE), vybrané proteiny byly detekovány pomocí Western blotu s následnou imunodetekcí (postupně jsme značili 14 odlišných protilátek). Signál jsme zachytili pomocí luminiscenčního substrátu přístrojem Syngene (**obr. 15**). Jako kontrolní protein (*loading control*) byl použit protein porin. Získaná data jsme kvantifikovali v programu Quantity One Basic a převedli do grafu 9.

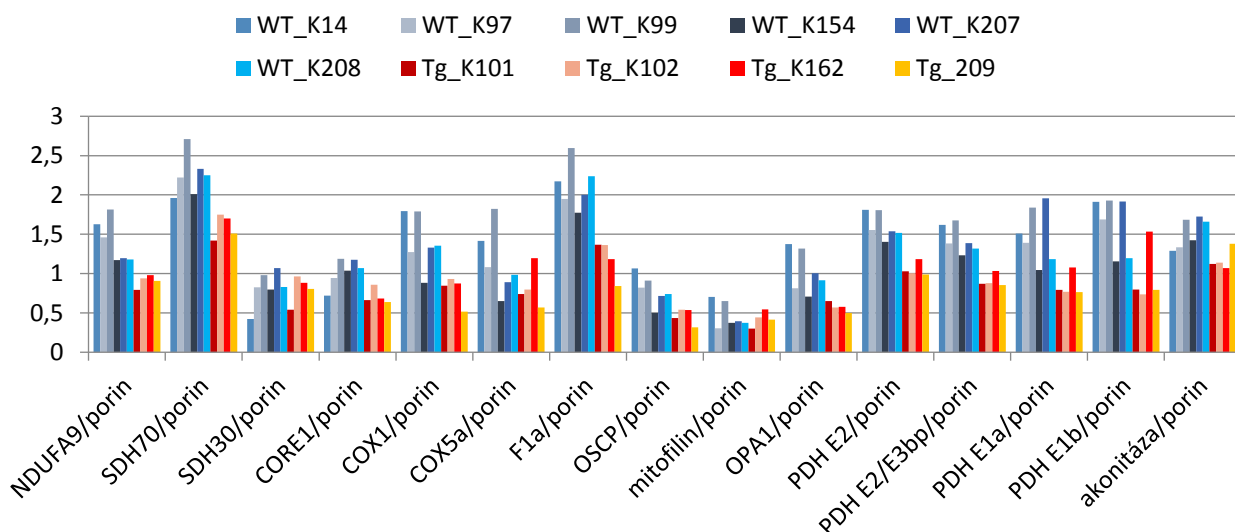


Graf 9- Kvantifikace vybraných mitochondriálních proteinů ve svalové tkáni prasat věku 48 měsíců analyzovaných SDS-PAGE s následným Western blotem. Intenzita signálu jednotlivých protilátek u kontrolních WT prasat (modré sloupce, n=6) a transgenních prasat (odstíny červené, n=4). Na ose x je vynesena intenzita signálu získaná v programu Syngene.

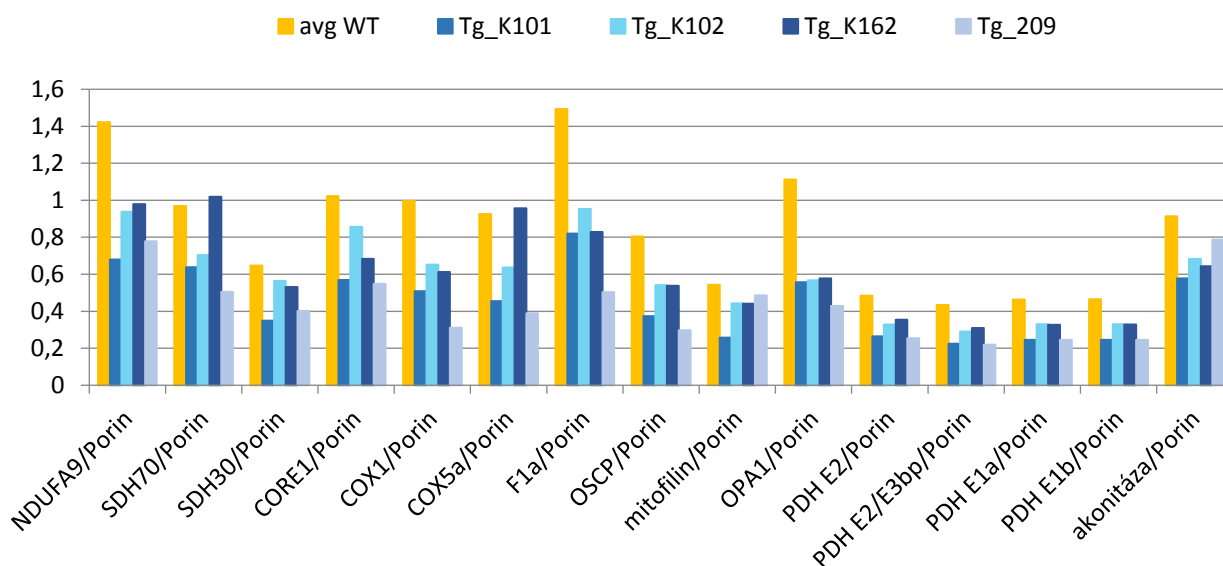
V dalším grafu (**graf 10**) jsme vynesli množství proteinů transgenních jedinců (Tg_K101, Tg_K102, Tg_162, Tg_K209) k průměrné hodnotě množství proteinů všech 6 kontrolních vzorků (WT_K14, WT_K97, WT_K99, WT_K15, WT_K207, WT_K208). **Graf 11 a 12** představují normalizaci dat ke kontrolnímu proteinu porinu.



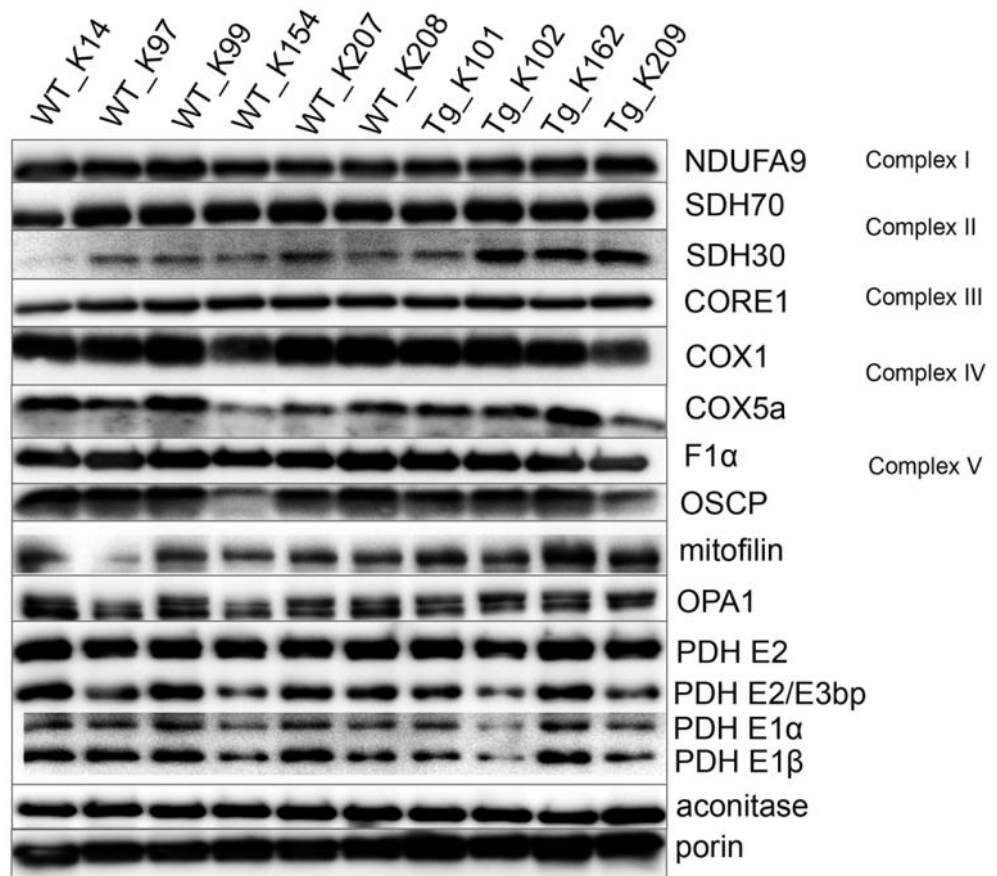
Graf 10 - Kvantifikace vybraných mitochondriálních proteinů ve svalové tkáni prasat věku 36 měsíců analyzovaných SDS-PAGE s následným Western blotem. Intenzita signálu jednotlivých protilátek transgenních prasat ($n=4$, odstíny červené) vztahovaná k průměru kontrol (představující 100% na ose y).



Graf 11- Kvantifikace vybraných mitochondriálních proteinů ve svalové tkáni prasat věku 48 měsíců analyzovaných SDS-PAGE s následným Western blotem. Intenzita signálu jednotlivých protilátek u kontrolních WT prasat (modré sloupce, $n=6$) a transgenních prasat (odstíny červené, $n=4$) normalizovaná s kontrolním proteinem porinem. Na ose x je vynesena intenzita signálu získaná

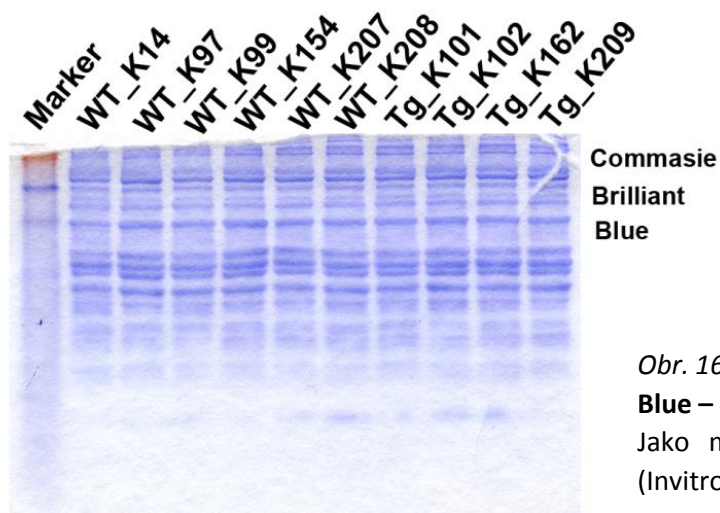


Graf 12 - Kvantifikace vybraných mitochondriálních proteinů ve svalové tkáni prasat věku 48 měsíců analyzovaných SDS-PAGE s následným Western blotem. Intenzita signálu jednotlivých protilátek normalizovaná s kontrolním proteinem porinem, u kontrolních WT prasat je intenzita signálu zprůměrována (žlutý sloupec), modře transgenní prasata (n=4). Na ose x je vynesena intenzita signálu získaná v programu Syngene.



Obr. 15 – Obsah vybraných mitochondriálních proteinů v kosterním svalu transgenních prasat (TgHN, n=6) a kontrol (WT, n=4) věku 48 měsíců. Izolované mitochondriální proteiny byly separované SDS-PAGE a následně přebloťovány a imunodetekovány se specifickými protilátkami (Abcam). Komplex IV, V, OPA1 a všechny podjednotky komplexu PDH jsou zde oproti kontrolním WT jedincům viditelně snižené.

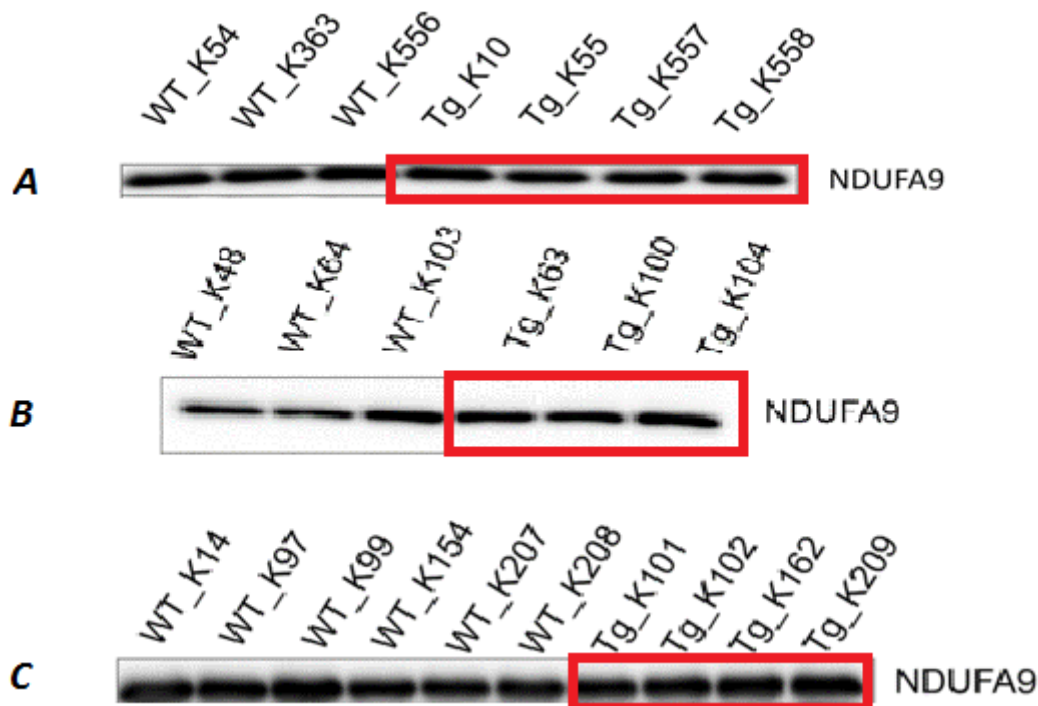
U prasat ve věku 48 měsíců byla zjištěna snížená exprese téměř u všech námi sledovaných proteinů. Nejpatrnější změny byly nalezeny u komplexu I (protein NDUFA9), který se u mladších transgenních prasat neměnil, podjednotky SDH70 komplexu II, fúzního proteinu OPA1, podjednotek PDH komplexu a u proteinu akonitáza, který je markerem zvýšené míry oxidativního stresu uvnitř buněk. Při korelaci signálu proteinů na kontrolní protein porin dochází k zostření rozdílů, detekovali jsme výrazné snížení u všech podjednotek finálních komplexů dýchacího řetězce IV a V.



Obr. 16 – Gel obarvený Coomasie Brilliant Blue – 48 měsíční prasata, kosterní sval. Jako marker byl použit SeeBlue Plus2 (Invitrogen)

5.4 Shrnutí změn exprese sledovaných proteinů

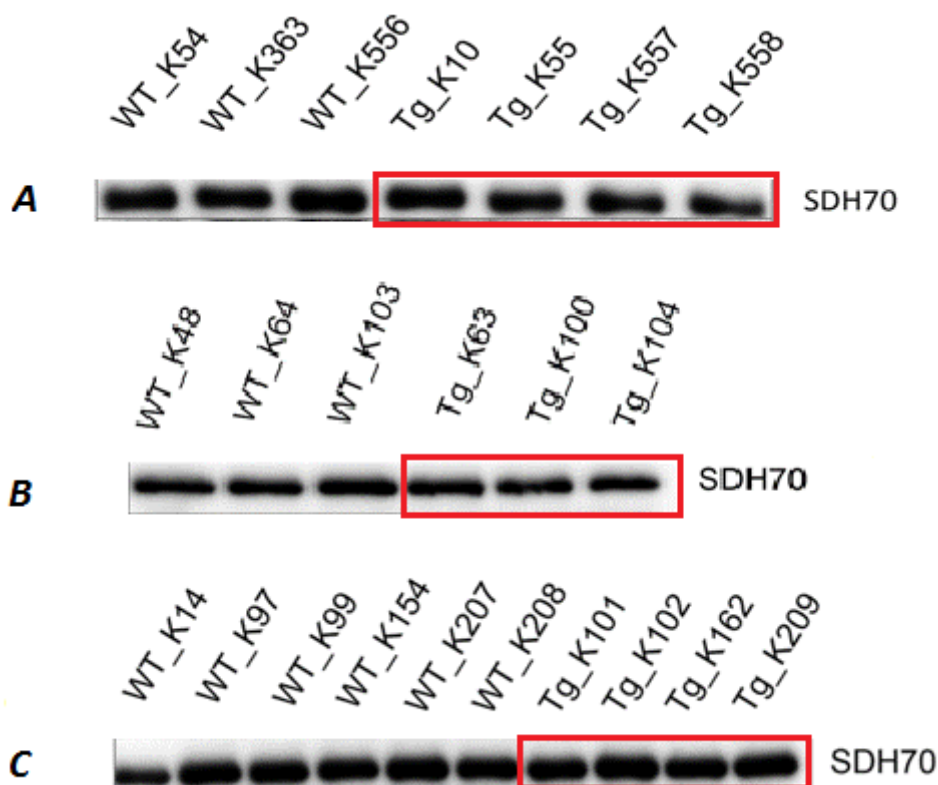
Komplex I (OXPHOS) – reprezentovaný podjednotkou **NDUFA9** – snížení jejího množství jsme pozorovali u prasat nesoucích mutaci ve věku 48 měsíců, do té doby je tento komplex plně funkční. Úkolem komplexu I je příjem 2 elektronů od redukovaného koenzymu NADH a jejich přenos na flavinmononukleotid a dále přes 9 železo-sírných (Fe-S) center až na koenzym Q (ubichinon), odkud pokračují ke komplexu III. Společně s přenosem $2e^-$ dochází k přesunu $4H^+$ z matrix do mezimembránového prostoru (Baradaran et al., 2013), a tento komplex je proto jedním z 3 komplexů OXPHOS podílejícím se na tvorbě protonového gradientu, později využitému k tvorbě ATP (Lodish et al., 2008).



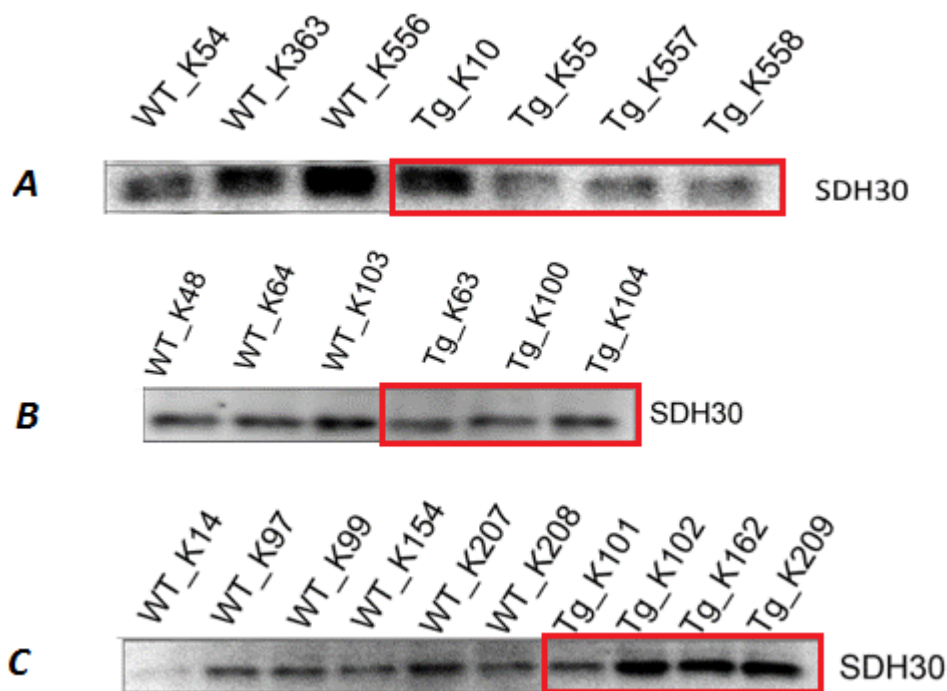
Obr. 17 – *Intenzita signálu množství mitochondriálního proteinu NDUFA9 v kosterním svalu u modelu prasat pro HN ve věku 24 (A), 36 (B) a 48(C) měsíců po proběhnutí SDS-elektroforézy s následným Western blotem. Červeně vyznačení transgenní jedinci.*

Komplex II (OXPHOS) – podjednotka sukcinát dehydrogenázy **SDH70** – již u prasat ve věku 24 měsíců jsme kvantifikací dat získaných z intenzity značení protilátkou anti-SDH70

zjistili snížení u 3 ze 4 transgenních jedinců (Tg_K55, Tg_K557, Tg_K558), později se množství proteinů této podjednotky snižovalo markantněji, až na hodnotu 50% kontrolních jedinců. U prasat ve věku 48 měsíců bylo snížení velmi výrazné u 3 ze 4 transgenních jedinců (Tg_K101, Tg_K162, Tg_K209). Druhá podjednotka **SDH30** byla výrazněji snížena ve věku 24 měsíců (u 3 ze 4 Tg prasat až o 50% oproti kontrolám - Tg_K55, Tg_K557, Tg_K558) a ve 36 měsících byla snížena oproti transgenním jedincům zhruba o 15%. Ve věku 48 měsíců je množství proteinů podjednotky rapidně zvýšené (v průměru oproti kontrolám o více, než 40%), dochází zde nejspíše ke kompenzačnímu efektu a bude zajímavé sledovat tuto podjednotku u starších prasat. Komplex II je kromě OXPHOS také součástí Krebsova cyklu a tyto dvě metabolické dráhy jsou skrze něj propojeny. Časně narušení funkce komplexu II souvisí nejspíše s narušením metabolických funkcí dříve, než jsme schopni zaznamenat první klinické příznaky HN. Obě hlavní podjednotky, tedy SDH70 i 30 jsou jaderně kódované (Iverson, 2013).



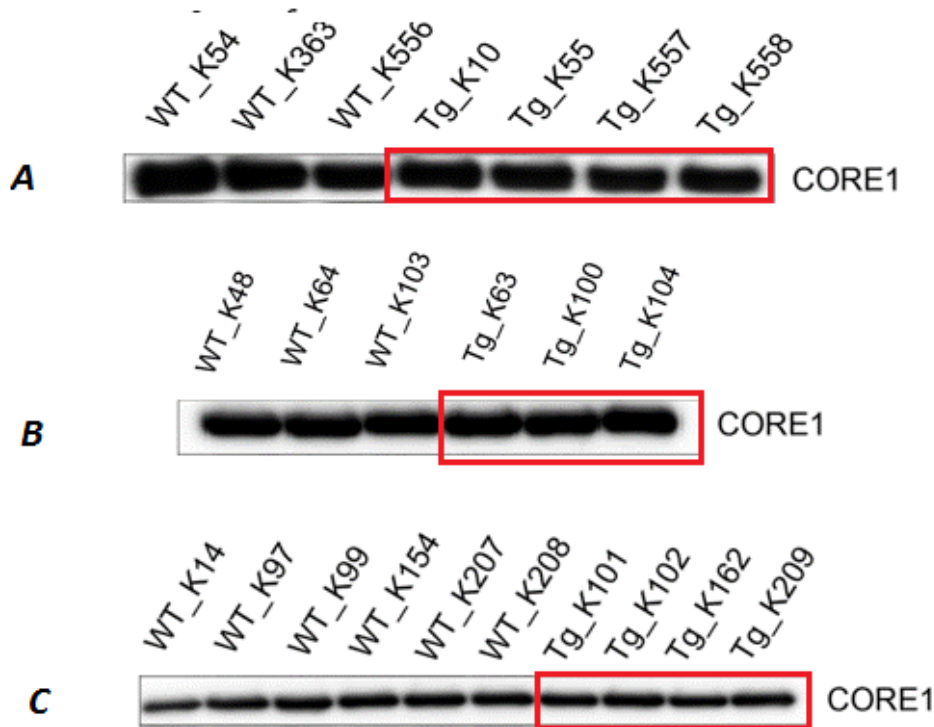
Obr. 18 – *Intenzita signálu množství mitochondriálního proteinu SDH70 v kosterním svalu u modelu prasat pro HN ve věku 24 (A), 36 (B) a 48(C) měsíců po proběhnutí SDS-elektroforézy s následným Western blotem. Červeně vyznačení transgenní jedinci.*



Obr. 19 – *Intenzita signálu množství mitochondriálního proteinu SDH30 v kosterním svalu u modelu prasat pro HN ve věku 24 (A), 36 (B) a 48(C) měsíců* po proběhnutí SDS-elektroforézy s následným Western blotem. Červeně vyznačení transgenní jedinci.

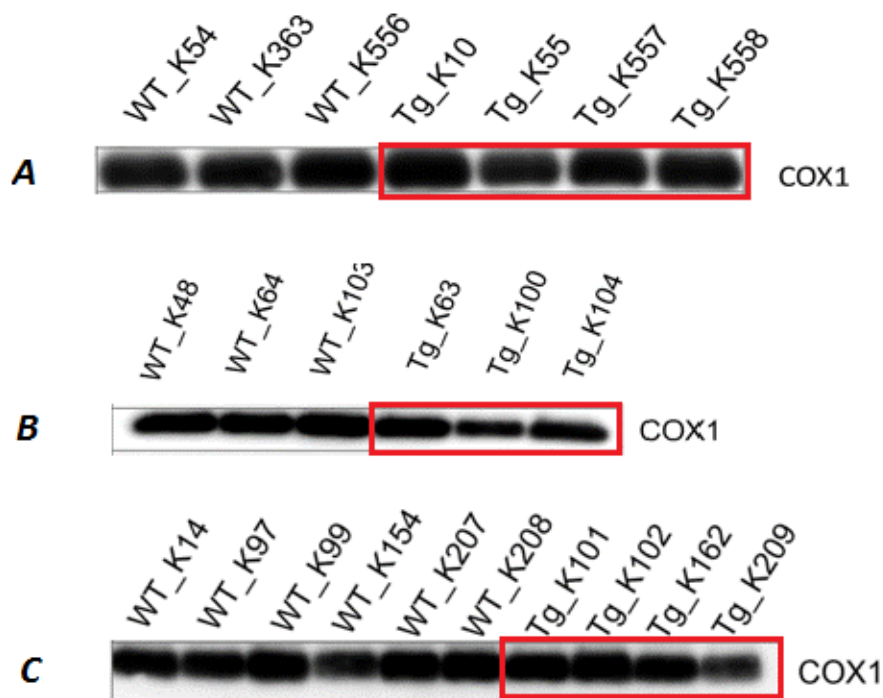
Komplex III (OXPHOS) – zastoupený podjednotkou **CORE1** se u 24 měsíčních jedinců mění sníženým množstvím u všech transgenních jedinců (o maximálně 30%), u vzorků pocházejících ze 36 měsíčních prasat jsme detekovali změnu u 2 ze 3 transgenních jedinců (Tg_K100, Tg_K104), jedná se pouze o mírné snížení množství u obou jedinců. U nejstarších prasat věku 48 měsíců jsme zaznamenali snížení této podjednotky u všech 4 transgenních jedinců.

Funkcí komplexu III je tvorba protonového gradientu (přenesou se celkem $4H^+$ z matrix do mezimembránového prostoru) a transport elektronů na další komplex elektrontransportního řetězce přes redoxní Fe-S centra (Crofts et al., 2008). Jeho dysfunkce také přispívá ke snížení efektivity F_1F_0 ATP-syntázy a nedostatečné tvorbě ATP ve svalové buňce.

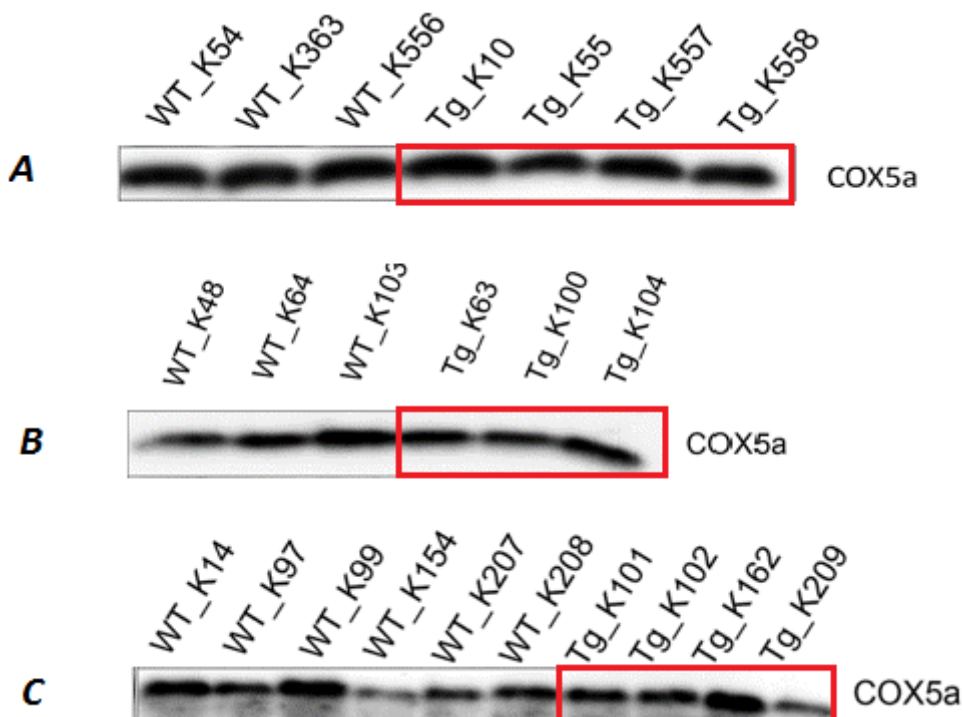


Obr. 20 – *Intenzita signálu množství mitochondriálního proteinu v kosterním svalu u modelu prasat pro HN ve věku 24 (A), 36 (B) a 48(C) měsíců* po proběhnutí SDS-elektroforézy s následným Western blotem. Červeně vyznačení transgenní jedinci.

Komplex IV (OXPHOS) – sledovali jsme podjednotky cytochrom c oxidázy COX1 a COX5 α a u obou jsme u 24 měsíčních prasat nedetkovali rozdíl mezi intenzitou signálu transgenních a *wild-type* jedinců. U prasat ve věku 36 měsíců jsme pozorovali náhlý pokles podjednotky **COX1**, tento trend progresivněji pokračoval u 48 měsíčních transgenních jedinců. Také množství podjednotky **COX5 α** se během experimentů měnilo. Ve 36 měsících bylo u jednoho ze tří transgenních prasat (Tg_K100) sníženo na 80% v porovnání s průměrem *wild-type* kontrol. U nejstarší skupiny prasat věku 48 měsíců bylo množství sníženo u 3 transgenních jedinců ze 4 (Tg_K101, Tg_K102, Tg_K209), naopak u čtvrtého prasete bylo zvýšeno (Tg_K162). Podjednotka COX1 je kódována mtDNA a její funkce jsou především katalytické, představuje část redoxního centra komplexu a ve své struktuře obsahuje kofaktory v podobě iontů kovů. Naopak podjednotka COX5 α je kódována jaderně a stabilizuje komplex IV. Úkolem COX je redukce finálního akceptoru elektronů - O₂ na 2 molekuly vody za pomoci elektronů získaných z cytochromu c (Brzezinski et Gennis, 2008). Změny množství proteinů COX1 a COX5 α měly obdobný průběh, každá z podjednotek se však začala snižovat v jiném časovém období.



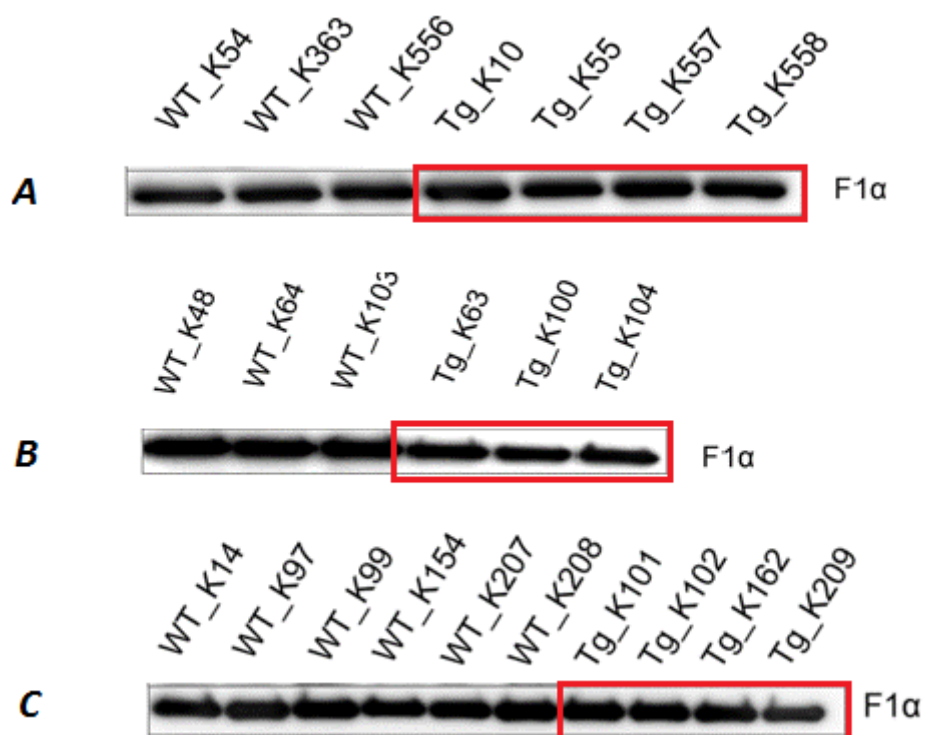
Obr. 21 – *Intenzita signálu množství mitochondriálního proteinu COX1 v kosterním svalu u modelu prasat pro HN ve věku 24 (A), 36 (B) a 48(C) měsíců* po proběhnutí SDS-elektroforézy s následným Western blotem. Červeně vyznačení transgenní jedinci.



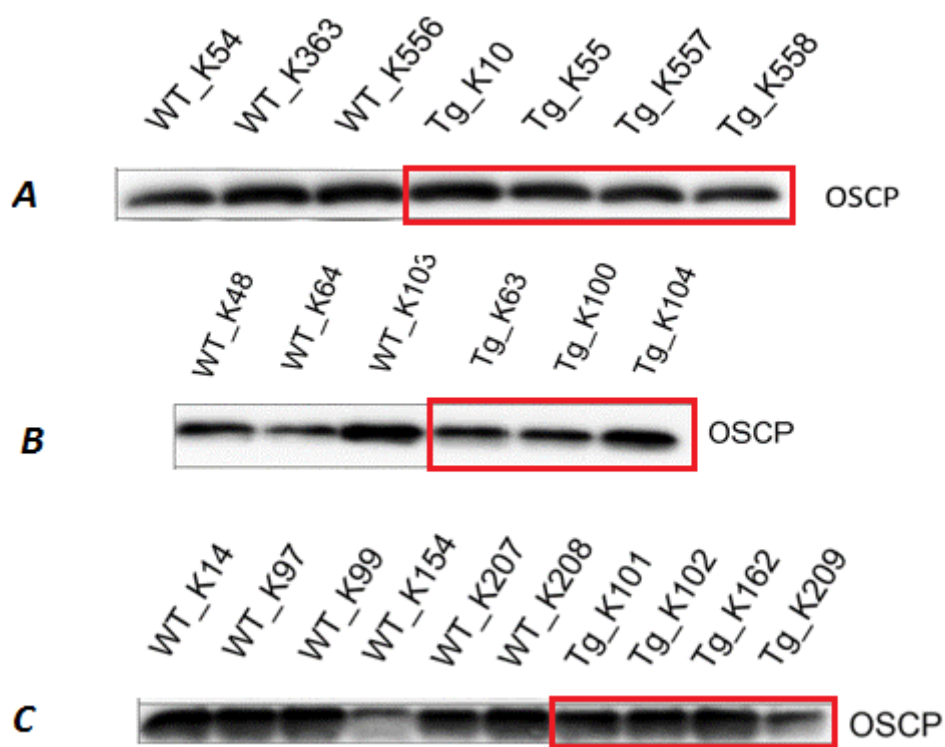
Obr. 22 – *Intenzita signálu množství mitochondriálního proteinu COX5a v kosterním svalu u modelu prasat pro HN ve věku 24 (A), 36 (B) a 48(C) měsíců* po proběhnutí SDS-elektroforézy s následným Western blotem. Červeně vyznačení transgenní jedinci.

Komplex V (OXPHOS) je místem tvorby ATP, k jehož tvorbě využívá protonového gradientu, vytvořeného předchozími komplexy OXPHOS – I, III a IV (Menz et al., 2001).

Vybrali jsme jeho 2 podjednotky - **F1 α** a **OSCP**. Ve věku 24 měsíců neměla transgenní prasata žádné změny v množství podjednotky F1 α , snížení jsme sledovali od věku 36 měsíců a ve věku 48 měsíců byly již oba námi sledované proteiny snižené. Můžeme tedy předpokládat počátek snížení efektivity ATPázy u kosterního svalstva modelového prasete na hranici 24 a 36 měsíců věku.

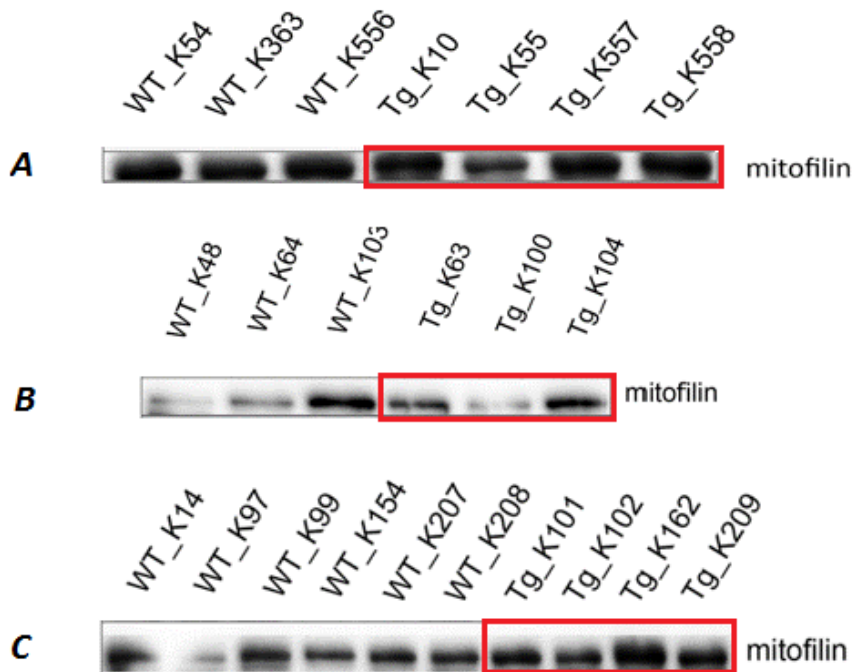


Obr. 23 – *Intenzita signálu množství mitochondriálního proteinu F1 α v kosterním svalu u modelu prasat pro HN ve věku 24 (A), 36 (B) a 48 (C) měsíců po proběhnutí SDS-elektroforézy s následným Western blotem. Červeně vyznačení transgenní jedinci.*



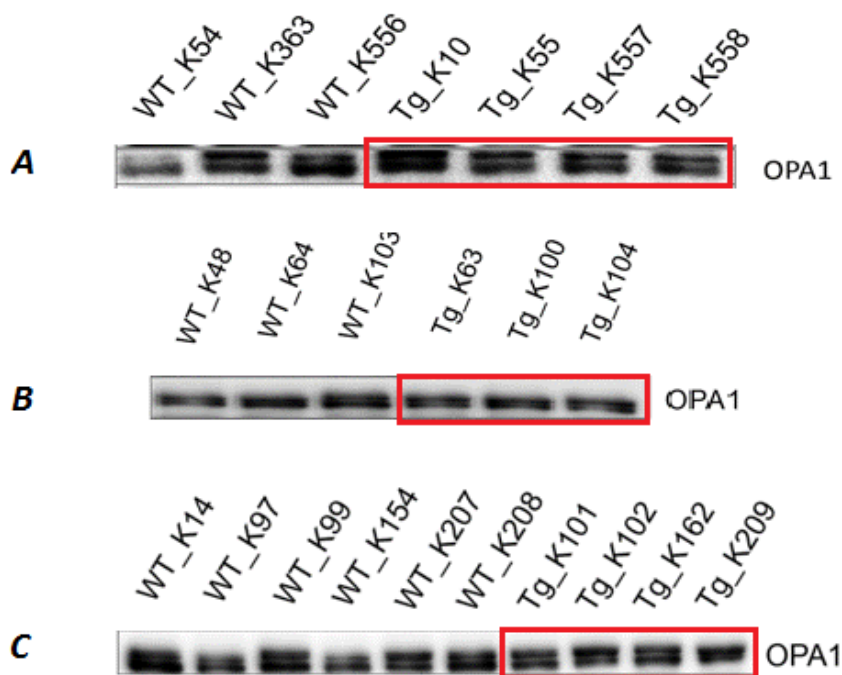
Obr. 24 – *Intenzita signálu množství mitochondriálního proteinu OSCP v kosterním svalu u modelu prasat pro HN ve věku 24 (A), 36 (B) a 48(C) měsíců* po proběhnutí SDS-elektroforézy s následným Western blotem. Červeně vyznačení transgenní jedinci.

Mitofilin je umístěn ve vnitřní mitochondriální membráně a hraje velkou roli při formování krist (John et al., 2005). Usuzujeme, že jeho narušením dochází k dezorganizaci mitochondriální struktury a ke změnám morfologie mitochondrií. U skupiny prasat věku 24 měsíců bylo jeho množství shodné u transgenních i kontrolních jedinců, pouze v 1 případě ze 4 (u Tg_K55) jsme detekovali poloviční množství mitofilinu. 36 měsíční prasata měla u 3 ze 4 transgenních jedinců zvýšené množství nad průměr kontrol, Tg_K100 naopak dosahovalo pouze 50% kontrol. 48 měsíční prasata měla všechna zvýšený mitofilin oproti kontrolám. Dochází zde nejspíše ke kompenzační nadprodukci proteinu v důsledku poškození mitochondriální struktury.



Obr. 25 – *Intenzita signálu množství mitochondriálního proteinu mitofilin v kosterním svalu u modelu prasat pro HN ve věku 24 (A), 36 (B) a 48(C) měsíců* po proběhnutí SDS-elektroforózy s následným Western blotem. Červeně vyznačení transgenní jedinci.

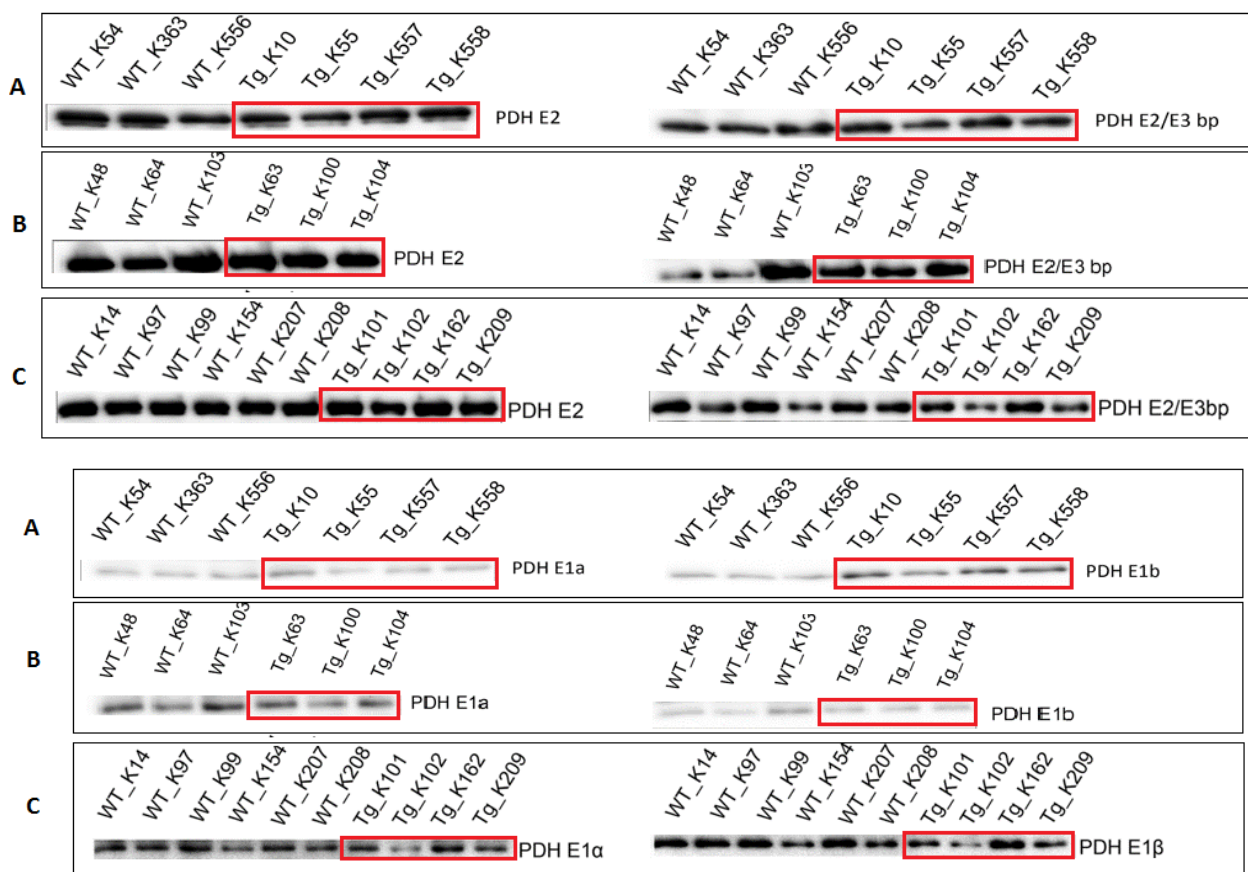
OPA1 – u nejstarších HD prasat, tedy 48 měsíčních, jsme detekovali snížení intenzity signálu tohoto fúzního proteinu do 20% u 3 ze 4 transgenních prasat (Tg_K102, Tg_K162, Tg_K209).



Obr. 26 – *Intenzita signálu množství mitochondriálního proteinu OPA1 v kosterním svalu u modelu prasat pro HN ve věku 24 (A), 36 (B) a 48(C) měsíců* po proběhnutí SDS-elektroforózy s následným Western blotem. Červeně vyznačení transgenní jedinci.

PDH komplex jsme detekovali protilávkou PDH koktejl (Abcam), zahrnující podjednotky **E2**, **E2/E3bp**, **E1 α** , **E1b**. Každá z těchto podjednotek se svou intenzitou v určitém věku projevovovala odlišně.

Podjednotka **E2** byla již u 24 měsíčních HD prasat u 3 ze 4 (Tg_K10, Tg_K55, Tg_K557) snižená. U 36 a 48 měsíčních HD prasat bylo množství shodné s kontrolními jedinci. Podjednotka **E2/E3bp** se v našich vzorcích od kontrol výrazně nelišila. Naopak podjednotka **E1a** byla ve vzorcích HD prasat věku 24 měsíců výrazně zvýšená u 1 jedince (Tg_K10), u ostatních byla lehce snižená. Ve věku 36 a 48 měsíců jsme pozorovali pouze další lehké snížení. **E1b** protein byl u nejmladší skupiny prasat zvýšen, v pozdějším věku se jeho množství oproti kontrolám spíše snižovalo.



Obr. 27 – *Intenzita signálů množství mitochondriálních proteinů komplexu PDH (E2, E2/E3bp, E1a, E1b) v kosterním svalu u modelu prasat pro HN ve věku 24 (A), 36 (B) a 48(C) měsíců po proběhnutí SDS-elektroforézy s následným Western blotem. Červeně vyznačení transgenní jedinci.*

Posledním sledovaným proteinem byla **akonitáza** – ve věku 48 měsíců jsme detekovali zvýšené množství tohoto nezymu ve všech vzorcích TgHN prasat, nasvědčující zvýšené míře oxidativního stresu nad možnosti regulace.



Obr. 28 – *Intenzita signálu množství mitochondriálního proteinu akonitáza v kosterním svalu u modelu prasat pro HN ve věku 24 (A), 36 (B) a 48(C) měsíců* po proběhnutí SDS-elektroforézy s následným Western blotem. Červeně vyznačení transgenní jedinci.

Tab. 5 – Přehled změn množství sledovaných proteinů u všech 3 studovaných věkových skupin transgenních HD prasat

Protein/enzym	Komplex OXPPOS	24 měsíců Tg	36 měsíců Tg	48 měsíců Tg
NDUFA9	I			↓
SDH70	II	↓	↓	↓
SDH30	II	↓	↓↓	↓↓
CORE1	III	↓		↓
COX1	IV		↓↓	↓↓
COX5α	IV			↓
OSCP	V		↓	↓
F1α	V	↑↓	↓↓	↓↓
mitofilin	-		↑↓	↓
OPA1	-			↓
PDH E2	-	↓		↓
PDH E2/E3bp	-			↓
PDH E1α	-		↓	↓
PDH E1b	-	↑	↓	↓
akonitáza	-			↑

Význam symbolů: ↓ - snížené množství, ↓↓ - výrazně snížené množství (nad 50%), ↑ - zvýšené množství ↑↓ - množství u některých transgenních jedinců zvýšené a naopak u ostatních snížené

6. Diskuze

Cílem práce bylo charakterizovat změny množství vybraných mitochondriálních proteinů s využitím metod elektroforézy na polyakrylamidovém gelu v prostředí SDS, následného semi-dry Western blotu a imunodetekce se specifickou protilátkou a také zachycení časového vývoje těchto změn. K dispozici jsme měli vzorky kosterního svalstva transgenních i kontrolních prasat F2 generace tří věkových skupin, odstupňovaných po 1 roce (24, 36 a 48 měsíců). Postupně jsme u nich analyzovali změny v intenzitě signálu, tedy změny množství příslušných enzymů, u 14 proteinů, které souvisí s oxidačním stresem a hrají roli v elektrontransportním řetězci a v tvorbě ATP. Postupovali jsme podle předem stanovených protokolů. V každé věkové skupině jsme provedli celkem 14 imunodetekcí se všemi sledovanými protilátkami. Podobné výsledky na prasečím modelu pro HN zatím publikovány nebyly.

Podle námi předpokládaného vývoje množství vybraných proteinů v kosterních buňkách jsme očekávali snížení, případně zvýšení, množství enzymu v určitém věku a následně v další věkové skupině znásobení tohoto jevu. Během analýzy jsme u některých proteinů pozorovali trend, kdy ne všechna transgenní (případně i kontrolní) prasata ve věkové skupině uniformně zvyšovala/snižovala množství příslušného proteinu/enzymu. Může se jednat o projev variability jednotlivých prasat, nebo o možnou kompenzaci za změněnou aktivitu jiného enzymu odpovídajícího komplexu, která se u těchto jedinců projevila v jiném časovém období, než u zbytku testovaných zvířat v souboru. K zabránění tomuto jevu by bylo třeba použít početnější soubor kontrol a transgenních jedinců v každé věkové skupině a jedince vykazující abnormality ze souboru vyřadit. K analýze jsme měli k dispozici pouze omezený počet vzorků z každé skupiny.

U první skupiny HD prasat jsme vzhledem k jejich nízkému věku neočekávali výrazné změny v množství sledovaných proteinů, pouze naznačení dalšího vývoje. Rozdíly v množství proteinů jsme pozorovali také u kontrolních jedinců, což je zde nejspíše dáno genetickou variabilitou modelového organismu. Detekovali jsme velmi mírný pokles komplexu II (SDH70, SDH30) a komplexu I (NDUFA9), u komplexu III se velice slabě měnila podjednotka COX1 a u komplexu V jsme detekovali drobné snížení množství proteinu OSCP. Pyruvát dehydrogenáza (PDH) se lišila projevem u jednotlivých podjednotek, což může být opět dáno

variabilitou jednotlivců, ale může se jednat o náznak počátku narušení energetického metabolismu, s nímž tento komplex úzce souvisí. Výsledky jsou lépe hodnotitelné po normalizaci hodnot množství sledovaných proteinů s kontrolním proteinem, kde pozorujeme zvýšenou aktivitu obou námi sledovaných subpodjednotek podjednotky E1 komplexu pyruvátdehydrogenázy (PDH E1a i PDH E1b). Sledované podjednotky PDH komplexu měly signifikantně změněné množství u nejstarší skupiny prasat ve věku 48 měsíců v porovnání s wild-type. Výsledky ve skupině prasat ve věku 24 měsíců jsou zatím nejednoznačné, tato prasata byla nejspíše na plné projevení mutantní alely v době odběru vzorku příliš mladá.

Další sledované proteiny prokazují narušení funkce mitochondrií. OPA1 - mitochondriální protein, který reguluje fúzi dynamické struktury mitochondriální sítě, udržuje strukturu krist, a který se podílí na syntéze ATP a účastní se apoptózy (Patten et al., 2014), byl u 48 měsíčních prasat snížen. V tomto věku můžeme tedy předpokládat počátek hroucení mitochondriální struktury.

Aktivita proteinu akonitáza byla v mozkové tkáni pacientů s HN (Tabrizi et al., 1999) i našich transgenních prasat inhibovaná, což nejspíše odráží zvýšenou tvorbu reaktivních forem kyslíku (ROS), na něž je aktivita tohoto enzymu citlivá.

Několik studií na transgenních myších modelech pro HN z posledních let, včetně modelů pro N-terminálních fragmenty HTT a full-length modely s myším nebo lidským mHTT v plné délce (Lee et al., 2013; Rattray et al., 2013), potvrdilo narušení energetického metabolismu a oxidativní fosforylace již v časných stádiích vývoje. Široce využívaný R6/2 myší model také prokazuje časně narušení exprese genů pro mitochondriální proteiny (Luthi-Carter et al., 2011). U tohoto modelu byla nalezena redukce aktivity komplexu I a 15% snížení exprese cytochrom c oxidázy (Gizatullina et al., 2006), stejně, jako u našeho modelového prasete. Otázkou je korelace časové osy věku myšího modelu, jež se běžně dožívá jen několika týdnů, s prasetem, které běžně žije několik (desítek) let.

Narušení funkcí jednotlivých komplexů oxidativní fosforylace v důsledku narušení exprese genů pro jeho jednotlivé enzymy mHTT a jeho agregáty bylo popsáno v několika pracech (Kosinski et al., 2007; Reddy 2014) a je jedním z raných faktorů, přispívajících ke ztrátě svalové síly a svalové atrofii při HN. U pacientů byly nalezeny snížené hladiny ATP:kreatinkinázy již před prvními klinickými příznaky HN, v případové studii byl u běžce s HN nalezen deficit komplexu IV (Kosinski et al., 2007, Lodi et al., 2000). Dalším jevem, který je

běžně popisován u zvířecích modelů i pacientů s HN je narušení obratu Ca^{2+} v buňkách, v mozku byly změny v Ca^{2+} signalizaci popsány jako součást patogeneze nemoci (Chen et al., 2012; Zielonka et al., 2014). V *in vitro* kulturách produkovaly svalové buňky s HN vyšší množství laktátu, což poukazuje nejspíše na vyšší úroveň glykolýzy (Ciammola et al., 2011). Některé další buněčné abnormality – změněný mitochondriální membránový potenciál, hladina cytochromu c, zvýšené množství kaspáz-3, -8, -9 jsou pravděpodobně dalším důsledkem tvorby HTT inkluzí v diferencovaných myotubulech (Ciammola et al., 2006) a společně s našimi výsledky tvoří podrobnější informaci o fenotypu HN na molekulární úrovni.

Potvrdili jsme mitochondriální změny způsobené mutovaným mHTT, mezi které patří narušení biogeneze mitochondrií, zvýšená míra oxidačního stresu, změněné nativní funkce enzymů OXPHOS a narušení mitochondriální dynamiky a transportu, jež jsou významnými faktory přispívající k odumírání neuronů a patogenezi HD. Výzkum na prasečím modelu HN může velkou měrou přispět k hlubšímu porozumění patobiochemických mechanismů onemocnění. Naše nálezy jsou také v souladu s výsledky ostatních pracovníků mitochondriální laboratoře, kteří analyzovali aktivity enzymů dýchacího řetězce, Krebsova cyklu a PDH komplexu spektrofotometricky a metodou radioizotopů v mozku, srdeční i svalové tkáni prasat ve věku 24, 36 a 48 měsíců. Byl zjištěn pokles u komplexu I a PDH, zvýšená míra oxidačního stresu a ve svalové tkáni 48 měsíčních prasat snížení buněčné respirace. Analýzou vzorků svalové tkáně metodou BN–PAGE (modrá nativní gelová elektroforéza) byl zjištěn pokles aktivity u komplexů I, III, IV a V, zejména u 48 měsíčních prasat (viz Příloha)(zatím nepublikováno).

Souhrnně lze říci, že HN je komplexní onemocnění, jehož patofyziologie má kromě složky centrální také neméně podstatnou složku periferní a obě mají obdobné rysy. Transkripční změny v kosterních svalech jsou srovnatelné s výsledky pozorovanými v různých oblastech mozku. Velmi významným patogenním projevem nemoci je atrofie svalstva, jejíž mechanismus nebyl zatím uspokojivě objasněn. Některé fyziologické a molekulární změny ve svalstvu mohou být detekovány již v presymptomatickém stadiu HN (Zielonka et al., 2014). Mnoho aspektů nervosvalového přenosu a svalové fyziologie při HN zůstává zatím neznámých. Myší modely pro HN prokázaly, že lze nástup nemoci a životaschopnost svalových buněk prodloužit (Johri et al., 2012; Fujimoto et al., 2005). Kosterní svalstvo zvířecích modelů pro HN je proto do budoucna atraktivním cílem možných terapií.

7. Závěr

- V souboru vzorků kosterního svalu (*musculus quadriceps femoris*) od modelu miniprasete transgenního pro N-terminální část lidského mutovaného huntingtinu (Tg HN) a kontrol (WT) ve věku 24, 36 a 48 měsíců byl analyzován obsah vybraných mitochondriálních proteinů. Jednalo se o proteiny oxidativní fosforylace (NDUFA9, CORE 1, SDH70, SDH30, COX1, COX5 α , F1 α , OSCP), komplexu pyruvátdehydrogenázy (E2, E2/E3bp, E1a, E1b), proteiny související s oxidativním stresem (akonitáza) a proteiny hrající roli v mitochondriální ultrastruktuře.
- Longitudinální studie ukázala, že nejvýznamnější změny v obsahu jednotlivých podjednotek byly prokázány u komplexu II, IV a V oxidativní fosforylace. Snížení u transgenních jedinců se pohybovalo v rozmezí 15-50% ve srovnání s kontrolními wild-type. Komplex II (podjednotka SDH70) byl snížen již ve věku 24 měsíců. Nálezy jsou v souladu s předpoklady popsanými pro malé modely pro HN.
- Významné změny byly zaznamenány i u proteinů modulujících ultrastrukturu mitochondrií. Protein mitofilin byl u nejstarších prasat významně zvýšený a OPA1 naopak významně snižena. Snižovaný obsah akonitázy svědčí o přítomnosti oxidativního stresu u transgenních zvířat.
- Diplomová práce vůbec poprvé předkládá dlouhodobou analýzu mitochondriálního proteinového spektra v kosterním svalu u velkého zvířecího modelu pro HN. Již v presymptomatickém stádiu rozvoje choroby byly na biochemické úrovni detekovány patologické změny na mitochondriální úrovni, které mohou přispívat k fenotypovému projevu studovaného onemocnění – atrofii svalstva.
- Výsledky prezentované diplomové práce mohou významnou měrou přispět k monitorování mitochondriálního energetického metabolismu v dalších studiích.

8. Přehled použitých literárních zdrojů

- Aigner, B., Renner, S., Kessler, B., Klymiuk, N., Kurome, M., W?nsch, A., & Wolf, E. (2010). Transgenic pigs as models for translational biomedical research. *Journal of Molecular Medicine*, *88*(7), 653–664.
- Amchenkova, A. A., Bakeeva, L. E., Chentsov, Y. S., Skulachev, V. P., & Zorov, D. B. (1988). Coupling membranes as energy-transmitting cables. I. Filamentous mitochondria in fibroblasts and mitochondrial clusters in cardiomyocytes. *The Journal of Cell Biology*, *107*(2), 481–95.
- Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., de Bruijn, M. H. L., Coulson, A. R., Drouin, J., ... Young, I. G. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, *290*(5806), 457–465.
- Aziz, N. A., Van Der Burg, J. M. M., Landwehrmeyer, G. B., Brundin, P., & Stijnen, T. (n.d.). Weight loss in Huntington disease increases with higher CAG repeat number.
- Baradaran, R., Berrisford, J. M., Minhas, G. S., & Sazanov, L. A. (2013). Crystal structure of the entire respiratory complex I. *Nature*, *494*(7438), 443–8.
- Bates, G. P. (2005). History of genetic disease: the molecular genetics of Huntington disease - a history. *Nature Reviews. Genetics*, *6*(10), 766–73.
- Baxa, M., Hruska-Plochan, M., Juhas, S., Vodicka, P., Pavlok, A., Juhasova, J., ... Motlik, J. (2013). A Transgenic Minipig Model of Huntington's Disease. *Journal of Huntington's Disease*, *2*(1), 47–68.
- Bellance, N., Lestienne, P., & Rossignol, R. (2009). Mitochondria: from bioenergetics to the metabolic regulation of carcinogenesis. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, *14*, 4015–34.
- Benchoua, A., Trioulier, Y., Zala, D., Gaillard, M.-C., Lefort, N., Dufour, N., ... Brouillet, E. (2006). Involvement of Mitochondrial Complex II Defects in Neuronal Death Produced by N-Terminus Fragment of Mutated Huntingtin. *Molecular Biology of the Cell*, *17*(4), 1652–1663.
- Bianchi, C., Genova, M. L., Parenti Castelli, G., & Lenaz, G. (2004). The Mitochondrial Respiratory Chain Is Partially Organized in a Supercomplex Assembly: KINETIC EVIDENCE USING FLUX CONTROL ANALYSIS. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(35), 36562–36569.
- Bianchi, C., Genova, M. L., Parenti Castelli, G., & Lenaz, G. (2004). The mitochondrial respiratory chain is partially organized in a supercomplex assembly: kinetic evidence using flux control analysis. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(35), 36562–9.
- Boyer, P. D. (1997). THE ATP SYNTHASE—A SPLENDID MOLECULAR MACHINE. *Annual Review of Biochemistry*, *66*(1), 717–749.
- Boyer, P. D. (1997). The ATP synthase--a splendid molecular machine. *Annual Review of Biochemistry*, *66*, 717–49.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, *7*(72), 248–54.
- Brandt, U. (2006). Energy Converting NADH: Quinone Oxidoreductase (Complex I). *Annual Review of Biochemistry*, *75*(1), 69–92.
- Brenner, D., & Mak, T. W. (2009). Mitochondrial cell death effectors. *Current Opinion in Cell Biology*, *21*(6), 871–877. Brouillet, E., Condé, F., Beal, M. ., & Hantraye, P. (1999). Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals. *Progress in Neurobiology*, *59*(5), 427–468.

- Browne, S. E., Bowling, A. C., MacGarvey, U., Baik, M. J., Berger, S. C., Muqit, M. M., ... Beal, M. F. (1997). Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia. *Annals of Neurology*, *41*(5), 646–53.
- Brzezinski, P., & Gennis, R. B. (2008). Cytochrome c oxidase: exciting progress and remaining mysteries. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, *40*(5), 521–31.
- Ciammola, A., Sassone, J., Alberti, L., Meola, G., Mancinelli, E., Russo, M. A., ... Silani, V. (2006). Increased apoptosis, huntingtin inclusions and altered differentiation in muscle cell cultures from Huntington's disease subjects. *Cell Death and Differentiation*, *13*(12), 2068–2078.
- Ciammola, A., Sassone, J., Sciacco, M., Mencacci, N. E., Ripolone, M., Bizzi, C., ... Malfatto, G. (2011). Low anaerobic threshold and increased skeletal muscle lactate production in subjects with Huntington's disease. *Movement Disorders : Official Journal of the Movement Disorder Society*, *26*(1), 130–7.
- Costa, V., & Scorrano, L. (2012). Shaping the role of mitochondria in the pathogenesis of Huntington's disease. *The EMBO Journal*, *31*(8), 1853–64.
- Crofts, A. R. (2004a). The Cytochrome bc_1 Complex: Function in the Context of Structure. *Annual Review of Physiology*, *66*(1), 689–733.
- Crofts, A. R. (2004b). The cytochrome bc_1 complex: function in the context of structure. *Annual Review of Physiology*, *66*, 689–733.
- Crofts, A. R., Holland, J. T., Victoria, D., Kolling, D. R. J., Dikanov, S. A., Gilbreth, R., ... Kuras, M. G. (2008). The Q-cycle reviewed: How well does a monomeric mechanism of the bc_1 complex account for the function of a dimeric complex? *Biochimica et Biophysica Acta*, *1777*(7-8), 1001–19.
- Damiano, M., Galvan, L., Déglon, N., & Brouillet, E. (2010). Mitochondria in Huntington's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1802*(1), 52–61.
- Davies, K. M., Strauss, M., Daum, B., Kief, J. H., Osiewacz, H. D., Rycovska, A., ... Kühlbrandt, W. (2011). Macromolecular organization of ATP synthase and complex I in whole mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(34), 14121–6.
- DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K. O., Davies, S. W., Bates, G. P., Vonsattel, J. P., & Aronin, N. (1997). Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science (New York, N.Y.)*, *277*(5334), 1990–3.
- Duchen, M. R., & Szabadkai, G. (2010). Roles of mitochondria in human disease. *Essays in Biochemistry*, *47*, 115–37.
- Faber, P. W., Voisine, C., King, D. C., Bates, E. A., & Hart, A. C. (2002). Glutamine/proline-rich PQE-1 proteins protect *Caenorhabditis elegans* neurons from huntingtin polyglutamine neurotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(26), 17131–6.
- Ferguson, S. J. (Stuart J., & Nicholls, D. G. (n.d.). *Bioenergetics*.
- Gizatullina, Z. Z., Lindenberg, K. S., Harjes, P., Chen, Y., Kosinski, C. M., Landwehrmeyer, B. G., ... Gellerich, F. N. (2006a). Low stability of huntington muscle Mitochondria against Ca^{2+} in R6/2 mice. *Annals of Neurology*, *59*(2), 407–411.
- Granata, S., Zaza, G., Simone, S., Villani, G., Latorre, D., Pontrelli, P., ... Tibshirani, R. (2009). Mitochondrial dysregulation and oxidative stress in patients with chronic kidney disease. *BMC Genomics*, *10*(1), 388.
- Gray, L. R., Tompkins, S. C., & Taylor, E. B. (2014). Regulation of pyruvate metabolism and human

- disease. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 71(14), 2577–604.
- Gu, M., Gash, M. T., Mann, V. M., Javoy-Agid, F., Cooper, J. M., & Schapira, A. H. (1996). Mitochondrial defect in Huntington's disease caudate nucleus. *Annals of Neurology*, 39(3), 385–9.
- Gusella, J. F., Wexler, N. S., Conneally, P. M., Naylor, S. L., Anderson, M. A., Tanzi, R. E., ... Martin, J. B. (1983). A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature*, 306(5940), 234–238.
- Hendersen, C. E., Mariani, J., Green, D., & Christen, Y. (2001). *Neuronal Death by Accident or by Design*.
- Hoogeveen, A. T., Willemsen, R., Meyer, N., de Rooij, K. E., Roos, R. A., van Ommen, G. J., & Galjaard, H. (1993). Characterization and localization of the Huntington disease gene product. *Human Molecular Genetics*, 2(12), 2069–73. Retrieved from
- Hunte, C., Zickermann, V., & Brandt, U. (2010). Functional modules and structural basis of conformational coupling in mitochondrial complex I. *Science (New York, N.Y.)*, 329(5990), 448–51.
- Huntington, G. (1872). On Chorea. *Journal of Neuropsychiatry*, 15(1), 109–112.
- Chaban, Y., Boekema, E. J., & Dudkina, N. V. (2014). Structures of mitochondrial oxidative phosphorylation supercomplexes and mechanisms for their stabilisation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1837(4), 418–426.
- Choo, Y. S., Johnson, G. V. W., MacDonald, M., Detloff, P. J., & Lesort, M. (2004). Mutant huntingtin directly increases susceptibility of mitochondria to the calcium-induced permeability transition and cytochrome c release. *Human Molecular Genetics*, 13(14), 1407–1420.
- Iverson, T. M. (2013). Catalytic mechanisms of complex II enzymes: A structural perspective. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1827(5), 648–657.
- Iwata, S., Lee, J. W., Okada, K., Lee, J. K., Iwata, M., Rasmussen, B., ... Jap, B. K. (1998). Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc1 complex. *Science (New York, N.Y.)*, 281(5373), 64–71.
- Jacobsen, J. C., Bawden, C. S., Rudiger, S. R., McLaughlan, C. J., Reid, S. J., Waldvogel, H. J., ... Snell, R. G. (2010). An ovine transgenic Huntington's disease model. *Human Molecular Genetics*, 19(10), 1873–1882.
- John, G. B., Shang, Y., Li, L., Renken, C., Mannella, C. A., Selker, J. M. L., ... Zha, J. (2005). The mitochondrial inner membrane protein mitofilin controls cristae morphology. *Molecular Biology of the Cell*, 16(3), 1543–54.
- Johri, A., Calingasan, N. Y., Hennessey, T. M., Sharma, A., Yang, L., Wille, E., ... Beal, M. F. (2012). Pharmacologic activation of mitochondrial biogenesis exerts widespread beneficial effects in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Human Molecular Genetics*, 21(5), 1124–37.
- Kasamatsu, H., Robberson, D. L., & Vinograd, J. (1971). A novel closed-circular mitochondrial DNA with properties of a replicating intermediate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 68(9), 2252–7.
- Kenney, W. C. (1975). The reaction of N-ethylmaleimide at the active site of succinate dehydrogenase. *The Journal of Biological Chemistry*, 250(8), 3089–94. Retrieved from Kroemer, G., Mariño, G., & Levine, B. (2010). Autophagy and the integrated stress response. *Molecular Cell*, 40(2), 280–93. hKumar, P., Kalonia, H., & Kumar, A. (2010). Huntington's disease: pathogenesis to animal models. *Pharmacological Reports : PR*, 62(1), 1–14.

- Kosinski, C. M., Schlangen, C., Gellerich, F. N., Gizatullina, Z., Deschauer, M., Schiefer, J., ... Lindenberg, K. S. (2007). Myopathy as a first symptom of Huntington's disease in a Marathon runner. *Movement Disorders : Official Journal of the Movement Disorder Society*, 22(11), 1637–40.
- Labbadia, J., & Morimoto, R. I. (2013). Huntington's disease: underlying molecular mechanisms and emerging concepts. *Trends in Biochemical Sciences*, 38(8), 378–85.
- Lee, C., Yen, K., & Cohen, P. (2013). Humanin: a harbinger of mitochondrial-derived peptides? *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 24(5), 222–8.
- Lee, H.-C., & Wei, Y.-H. (2005). Mitochondrial biogenesis and mitochondrial DNA maintenance of mammalian cells under oxidative stress. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37(4), 822–34.
- Legros, F. (2004). Organization and dynamics of human mitochondrial DNA. *Journal of Cell Science*, 117(13), 2653–2662.
- Lightowers, R. N., Chinnery, P. F., Turnbull, D. M., Howell, N., Larsson, N.-G., Clayton, D. A., Lightowers, R. N. (1997). Mammalian mitochondrial genetics: heredity, heteroplasmy and disease. *Trends in Genetics : TIG*, 13(11), 450–5.
- Lodi, R., Schapira, A. H., Manners, D., Styles, P., Wood, N. W., Taylor, D. J., & Warner, T. T. (2000). Abnormal in vivo skeletal muscle energy metabolism in Huntington's disease and dentatorubropallidoluysian atrophy. *Annals of Neurology*, 48(1), 72–6.
- Lodish, H. (2008). *Molecular cell biology*.
- Luthi-Carter, R., Hanson, S. A., Strand, A. D., Bergstrom, D. A., Chun, W., Peters, N. L., ... Olson, J. M. (2002). Dysregulation of gene expression in the R6/2 model of polyglutamine disease: parallel changes in muscle and brain. *Human Molecular Genetics*, 11(17), 1911–1926.
- MacDonald, M. E., Ambrose, C. M., Duyao, M. P., Myers, R. H., Lin, C., Srinidhi, L., ... Richards, R. I. (1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. *Cell*, 72(6), 971–83.
- Margulis, L. (1975). Symbiotic theory of the origin of eukaryotic organelles; criteria for proof. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 29(29), 21–38.
- Marsh, J., Pallos, J., & Thompson, L. (2003). Fly models of Huntington's disease. *Human Molecular Genetics*, 12(2), 187–193.
- Martin, W., & Herrmann, R. G. (1998). Gene Transfer from Organelles to the Nucleus: How Much, What Happens, and Why? *PLANT PHYSIOLOGY*, 118(1), 9–17.
- Menz, R. I., Walker, J. E., & Leslie, A. G. (2001). Structure of bovine mitochondrial F(1)-ATPase with nucleotide bound to all three catalytic sites: implications for the mechanism of rotary catalysis. *Cell*, 106(3), 331–41.
- Mielcarek, M. (2015b). Huntington's disease is a multi-system disorder. *Rare Diseases (Austin, Tex.)*, 3(1), e1058464.
- Mitchell, P. (1961). Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-Osmotic type of Mechanism. *Nature*, 191(4784), 144–148.
- Munoz-Sanjuan, I., & Bates, G. P. (2011). The importance of integrating basic and clinical research toward the development of new therapies for Huntington disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(2), 476–83.

- Nass, M. M. (1969). Mitochondrial DNA. I. Intramitochondrial distribution and structural relations of single- and double-length circular DNA. *Journal of Molecular Biology*, 42(3), 521–8.
- Nicholls, D. G., & Ferguson, S. J. (2013). *Bioenergetics 4th. Bioenergetics*. Elsevier.
- Novak, M. J. U., & Tabrizi, S. J. (2011). Huntington's Disease: Clinical Presentation and Treatment. In *International Review of Neurobiology* (Vol. 98, pp. 297–323).
- Panov, A. V., Gutekunst, C.-A., Leavitt, B. R., Hayden, M. R., Burke, J. R., Strittmatter, W. J., & Greenamyre, J. T. (2002). Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines. *Nature Neuroscience*, 5(8), 731–6.
- Perluigi, M., Poon, H. F., Maragos, W., Pierce, W. M., Klein, J. B., Calabrese, V., ... Butterfield, D. A. (2005). Proteomic Analysis of Protein Expression and Oxidative Modification in R6/2 Transgenic Mice: A Model of Huntington Disease. *Molecular & Cellular Proteomics*, 4(12), 1849–1861.
- Purdon, S. E., Mohr, E., Ilivitsky, V., & Jones, B. D. (1994). Huntington's disease: pathogenesis, diagnosis and treatment. *Journal of Psychiatry & Neuroscience*, 19(5), 359–367.
- Reddy, P. H. (2014). Increased mitochondrial fission and neuronal dysfunction in Huntington's disease: implications for molecular inhibitors of excessive mitochondrial fission. *Drug Discovery Today*, 19(7), 951–5.
- Richter, O.-M. H., & Ludwig, B. (2003). Cytochrome c oxidase--structure, function, and physiology of a redox-driven molecular machine. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 147, 47–74.
- Rizzuto, R., De Stefani, D., Raffaello, A., & Mammucari, C. (2012). Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(9), 566–578.
- Roos, R. A. C. (2010). Huntington's disease: a clinical review. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 5(1), 40.
- Rossignol, R., Faustin, B., Rocher, C., Malgat, M., Mazat, J.-P., & Letellier, T. (2003). Mitochondrial threshold effects. *The Biochemical Journal*, 370(Pt 3), 751–62.
- Rub, U., Vonsattel, J.-P. G., Heinsen, H., & Korf, H. (2014). *The Neuropathology of Huntington's Disease: Classical Findings, Recent Developments and Correlation to Functional Neuroanatomy (Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology)*.
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2006). Protocol SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. *CSH Protocols*.
- Sazanov, L. A., & Walker, J. E. (2000). Cryo-electron crystallography of two sub-complexes of bovine complex I reveals the relationship between the membrane and peripheral arms. *Journal of Molecular Biology*, 302(2), 455–464.
- Seong, I. S., Ivanova, E., Lee, J.-M., Choo, Y. S., Fossale, E., Anderson, M., ... MacDonald, M. E. (2005). HD CAG repeat implicates a dominant property of huntingtin in mitochondrial energy metabolism. *Human Molecular Genetics*, 14(19), 2871–80.
- Shadel, G. S., & Clayton, D. A. (1997). Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Annual Review of Biochemistry*, 66, 409–35.
- She, P., Zhang, Z., Marchionini, D., Diaz, W. C., Jetton, T. J., Kimball, S. R., ... Lynch, C. J. (2011). Molecular characterization of skeletal muscle atrophy in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 301(1), E49–61.

- Schägger, H. (2001). Respiratory chain supercomplexes. *IUBMB Life*, 52(3-5), 119–28.
<http://doi.org/10.1080/15216540152845911>
- Schägger, H., de Coo, R., Bauer, M. F., Hofmann, S., Godinot, C., & Brandt, U. (2004). Significance of Respirasomes for the Assembly/Stability of Human Respiratory Chain Complex I. *Journal of Biological Chemistry*, 279(35), 36349–36353.
- Schapira, A. H. V., Schapira, A., Duchen, M., Szabadkai, G., McFarland, R., Taylor, R., ... Moraes, C. (2012). Mitochondrial diseases. *Lancet (London, England)*, 379(9828), 1825–34.
- Scheffler, I. E. (2007). *Mitochondria*.
- Sohal, R., Sohal, B., Svnsson, I., & Brunk, U. (1989). Superoxide anion radical production in different animal species. *Mech Ageing*, 49, 129–135.
- Song, W., Chen, J., Petrilli, A., Liot, G., Klinglmayr, E., Zhou, Y., ... Bossy-Wetzell, E. (2011). Mutant huntingtin binds the mitochondrial fission GTPase dynamin-related protein-1 and increases its enzymatic activity. *Nature Medicine*, 17(3), 377–82.
- Sorolla, M. A., Reverter-Branchat, G., Tamarit, J., Ferrer, I., Ros, J., & Cabiscol, E. (2008). Proteomic and oxidative stress analysis in human brain samples of Huntington disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 45(5), 667–678.
- Squitieri, F., Falleni, A., Cannella, M., Orobello, S., Fulceri, F., Lenzi, P., & Fornai, F. (2010). Abnormal morphology of peripheral cell tissues from patients with Huntington disease. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria : 1996)*, 117(1), 77–83.
- Sun, F., Huo, X., Zhai, Y., Wang, A., Xu, J., Su, D., ... Kim, S. H. (2005). Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell*, 121(7), 1043–57.
- Trottier, Y., Biancalana, V., & Mandel, J. L. (1994). Instability of CAG repeats in Huntington's disease: relation to parental transmission and age of onset. *Journal of Medical Genetics*, 31(5), 377–82.
- van der Blik, A. M., Shen, Q., & Kawajiri, S. (2013). Mechanisms of mitochondrial fission and fusion. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(6).
- Vinothkumar, K. R., Zhu, J., & Hirst, J. (2014). Architecture of mammalian respiratory complex I. *Nature*, 515(7525), 80–4.
- von Ballmoos, C., Wiedenmann, A., & Dimroth, P. (2009). Essentials for ATP synthesis by F1F0 ATP synthases. *Annual Review of Biochemistry*, 78, 649–72.
- Vonsattel, J. P., Myers, R. H., Stevens, T. J., Ferrante, R. J., Bird, E. D., & Richardson, E. P. (1985). Neuropathological classification of Huntington's disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 44(6), 559–77.
- Wallace, D. C. (1999). Mitochondrial Diseases in Man and Mouse. *Science*, 283(5407), 1482–1488.
- Wang, L., & Qin, Z. (2006). Animal models of Huntington's disease: implications in uncovering pathogenic mechanisms and developing therapies. *Acta Pharmacologica Sinica*, 27(10), 1287–302.
- Wilson, D. F. (2013). Regulation of cellular metabolism: programming and maintaining metabolic homeostasis. *Journal of Applied Physiology*, (115(11)), 1583–8.
- Wilson, D. F. (2013). Regulation of cellular metabolism: programming and maintaining metabolic homeostasis. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 115(11), 1583–8.
- Winge, D. R. (2012). Sealing the mitochondrial respirasome. *Molecular and Cellular Biology*, 32(14), 2647–52.

- Yang, D., Wang, C. E., Zhao, B., Li, W., Ouyang, Z., Liu, Z., ... Li, X. J. (2010). Expression of Huntington's disease protein results in apoptotic neurons in the brains of cloned transgenic pigs. *Human Molecular Genetics*, *19*(20), 3983–3994.
- Yang, S., Cheng, P., Banta, H., Piotrowska, K., Yang, J., Cheng, E. C. H., ... Chan, A. W. S. (2008). Towards a transgenic model of Huntington's disease in a non-human primate. *Nature*, *453*(7197), 921–924.
- Yano, H., Baranov, S. V, Baranova, O. V, Kim, J., Pan, Y., Yablonska, S., ... Friedlander, R. M. (2014). Inhibition of mitochondrial protein import by mutant huntingtin. *Nature Neuroscience*, *17*(6), 822–831.
- Zalman, L. ., Nikaido, H., & Kagawa, Y. (1980). Mitochondrial outer membrane contains a protein producing nonspecific diffusion channels. *The Journal of Biological Chemistry*, *255*(5), 1771–4.
- Zeron, M. M., Fernandes, H. B., Krebs, C., Shehadeh, J., Wellington, C. L., Leavitt, B. R., ... Raymond, L. A. (2004). Potentiation of NMDA receptor-mediated excitotoxicity linked with intrinsic apoptotic pathway in YAC transgenic mouse model of Huntington's disease. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *25*(3), 469–479.
- Zielonka, D., Piotrowska, I., Marcinkowski, J. T., & Mielcarek, M. (2014). Skeletal muscle pathology in Huntington's disease. *Frontiers in Physiology*, *5*, 380.
- Zuccato, C. (2007). Role of brain-derived neurotrophic factor in Huntington's disease. *Progress in Neurobiology*, *81*(5), 294–330.
- Zuccato, C., Valenza, M., & Cattaneo, E. (2010). Molecular Mechanisms and Potential Therapeutical Targets in Huntington ' s Disease. *Physiol Rev*, *90*(3), 905–981.

9. Příloha

Poster z „The 3rd Conference on Animal Models for Neurodegenerative Diseases“,
Liblice, 8.-10.11. 2015

Immuno-electrophoretic analysis of mitochondrial protein status in skeletal muscle of minipigs transgenic for the N-terminal part of human mutated huntingtin

Dosoudilova Z¹, Kratochvilova H¹, Horova E¹, Kucerova J¹, Juhasova J², Juhas S², Klempir J³, Motlik J², Zeman J¹, Hansikova H¹

¹Department of Paediatrics and Adolescent Medicine, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague, ²Laboratory of Cell Regeneration and Cell Plasticity, Institute of Animal Physiology and Genetics AS CR, v.v.i. Libeňov, Czech Republic, ³Department of Neurology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague.



Introduction

Huntington's disease (HD) is an autosomal dominant neurodegenerative disorder caused by the expansion of the number of CAG repeats on chromosome 4p16.3, which results in elongated glutamine tract of huntingtin (htt). Mutant htt (mhtt) has been implicated in the disruption of multiple cellular processes, including mitochondrial functions whose impairment is emerging as a contributing factor to the pathogenesis of HD. The predominance of the interest in the pathology of HD lies in its effects on the central nervous system but numerous reports had described abnormalities in the peripheral tissues. The muscle tissue is affected in HD patients by progressive wasting.

Results

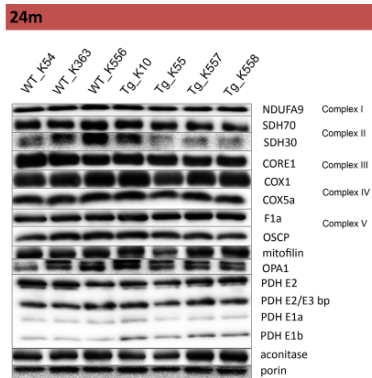
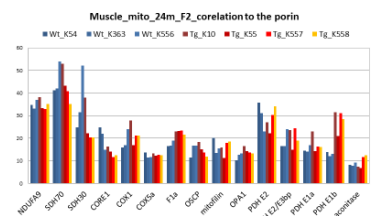


Fig. 2: The content of selected mitochondrial proteins in skeletal muscle mitochondria from TgHD (n=3) and Wt minipigs (n=4) (F2 generation) in the age of 24 months. Isolated mitochondria (10ug) were separated by 12% SDS-PAGE followed by western blot (WB). The resulting immunoblots were incubated with specific antibodies (Abcam). **Mild decrease in level of complex II subunit a and subunit b (SDH70, SDH30) were detected, however intensity of changes were not identical for all individuals (TgHD) of the same age.** The quantification of all antibodies signals were correlated to signal of loading protein porin (VDAC1) – Graph 1.



Graph.1 : Quantification of selected mitochondrial protein content analyzed by SDS-PAGE/WB see figure 2. The intensity of antibodies signals were correlated to loading protein porin (VDAC1). The graph represents rates of antibodies signals of mitochondrial proteins to signal of porin (VDAC1). The signal intensity of antibodies was quantified by Quantity one 1-D Analysis Software programme. **Increased rate of PDH complex subunit PDH E1b was detected.**

Methods

Polycrylamide gel electrophoresis and Western blot immunodetection (WB): SDS-PAGE Polycrylamide gel electrophoresis and Western blot immunodetection was performed on 12% polycrylamide minigels (10ug). Immunoblots were decorated with antibodies against the OXPHOS subunits (Mitosciences/Abcam) (Schagger and von Jagow 1987). **Western blot analysis** using secondary electrophoresis of proteins was performed by standard protocols as previously described (Lisina, Tisraeva et al. 2006; Sibaruk, Wieda et al. 2005). **BN-PAGE** was performed on 6-15% polyacrylamide minigels (Schagger and von Jagow 1991) followed by Coomassie Brilliant Blue staining. Isolated mitochondria were solubilized with digitonin (2 µg/g of protein) for 15 min on ice in 1.5 M ammoniohexanoic acid, 2 mM EDTA and 50 mM B6-176, pH 7.0. The samples were centrifuged for 20 min at 4 °C and 30 000 g and Coomassie Brilliant Blue G-250 dye (Sigma), 0.1 µg of detergent and 5% (v/v) glycerol were added to supernatants before electrophoresis. **Quantification:** The signal intensity of antibodies was quantified by Quantity one 1-D Analysis Software programme. The signal of each antibody was expressed as rate to the porin antibody signal.

Aims and Material

The aim of our study was to monitor the level of mitochondrial proteins (OXPHOS complex subunits, pyruvate dehydrogenase (PDH) subunits, Krebs cycle enzymes and other mitochondrial proteins) and their age-related changes in skeletal muscle of transgenic minipigs (TgHD) in F2 generation in age of 24, 36 and 48 months by two electrophoretic methods.

Minipig TgHD model: Skeletal muscles were collected from the transgenic minipigs (TgHD for N-terminal part (548 aa) of human mutated HTT (124 C, mHTT) and healthy control of F2 generation (Baxa et al 2014) in the age of 24, 36 and 48 month and immediately frozen in N2. All analyses were performed in mitochondria .

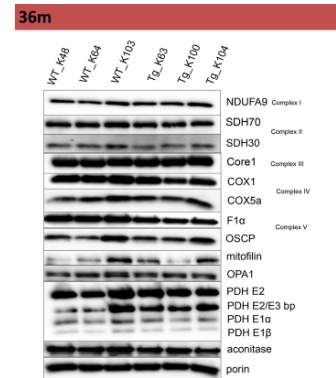
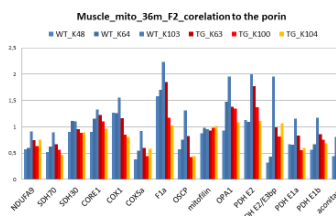


Fig. 3: The level of monitored mitochondrial proteins in skeletal muscle mitochondria from TgHD (n=3) and Wt minipigs (n=4) (F2 generation) in the age of 36 months. Isolated mitochondria (10ug) were separated by 12% SDS-PAGE followed by western blot (WB). The resulting immunoblots were incubated with specific antibodies (Abcam). **No significant changes were observed.** The quantification of antibodies signals were correlated to signal of loading protein porin (VDAC1) – Graph 2.



Graph.2 : Quantification of selected mitochondrial protein content analyzed by SDS-PAGE/WB see figure 3. The intensity of antibodies signals were correlated to loading protein porin (VDAC1). The graph represents rates of antibodies signals of mitochondrial proteins to signal of porin (VDAC1). The signal intensity of antibodies was quantified by Quantity one 1-D Analysis Software programme. **No significant changes were detected.**

References

Baxa et al.: A transgenic Minipig Model of Huntington's Disease. *Journal of Huntington Disease*, 2013, vol. 2, N. 1, 47-68.

Acknowledgment

Supported by Czech-Norwegian Financial Mechanism 2009-2014 and MSM under project contract No. J07/2014 – "HUNTINGTIN" 7714308, ExAM - CZ.1.05/2.1.00/03.024 (MSMT) and CHDI Foundation (A-8248), RWJ-VN 64165.

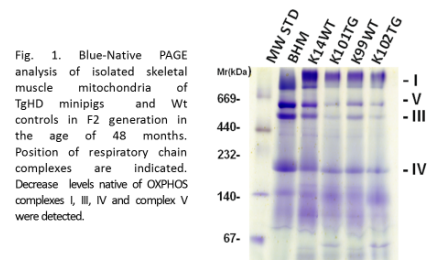


Fig. 1: Blue-Native PAGE analysis of isolated skeletal muscle mitochondria of TgHD minipigs and Wt controls in F2 generation in the age of 48 months. Position of respiratory chain complexes are indicated. Decrease levels native of OXPHOS complexes I, III, IV and complex V were detected.

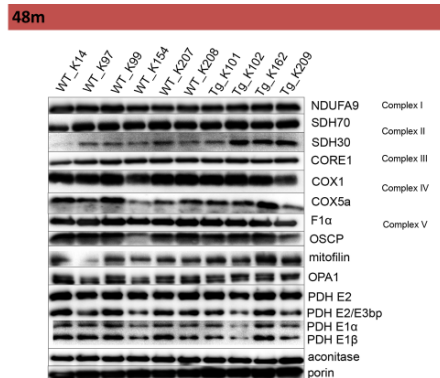
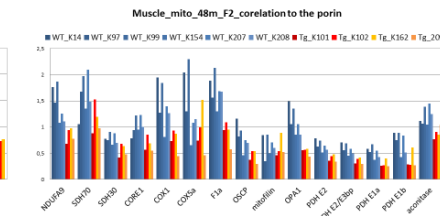


Fig. 4: The content of mitochondrial proteins in skeletal muscle mitochondria from TgHD (n=4) and Wt minipigs (n=6) (F2 generation) in the age of 48 months analyzed by SDS-PAGE/WB. Isolated mitochondria (10ug) were separated by 12% SDS-PAGE followed by western blot (WB). The resulting immunoblots were incubated with specific antibodies (Abcam). **Decreased levels of complex IV, complex V, PDH complex subunits and fusion protein OPA1 were detected.** The quantification of antibodies signals were correlated to signal of loading protein porin (VDAC1) – Graph 3.



Graph.3 : Quantification of selected mitochondrial protein content analyzed by SDS-PAGE/WB see figure 4. The intensity of antibodies signals were correlated to loading protein porin (VDAC1). The graph represents rates of antibodies signals of mitochondrial proteins to signal of porin (VDAC1). The signal intensity of antibodies was quantified by Quantity one 1-D Analysis Software programme. **The significant decreased of OXPHOS complex subunits (NDUFA9, COX1, COX5a, F1a, OSCP), mitochondrial fusion protein (OPA1), PDH complex subunits (E2, E2/E3bp, E1a, E1b) and oxidative stress marker (aconitase) were observed.**

Conclusions

Significant mitochondrial protein levels impairment in TgHD muscle was found in the age of 48 months. The overall findings of muscle wasting could be indicative of starting with skeletal muscle atrophy in TgHD minipig. Studies of potential deregulation of the target proteins in peripheral tissues such as skeletal muscle could provide valuable information about biological changes that track disease progression.