

Abstrakt

F_1F_0 -ATP syntáza (EC 3.6.3.14) je klíčovým enzymem v systému mitochondriální oxidativní fosforylace (OXPHOS) – využívá protonový gradient vybudovaný respiračním řetězcem k syntéze přibližně 90 % buněčného ATP. Uspořádání podjednotek membránové domény F_0 tohoto enzymu ale ještě není stále detailně popsáno. Výzkum ATP syntázy je v současnosti zaměřen především na odhalení struktury protonového kanálu α , aby bylo možno přesně definovat molekulární mechanismus generování rotace ATP syntázy. Další nevyřešenou otázkou představuje úloha tzv. nadpočetných podjednotek F_0 domény. Tyto proteiny specifické pro eukaryotní ATP syntázy nejsou esenciální pro syntázovou aktivitu a předpokládá se, že se mohou podílet na sestavování a stabilizaci enzymového komplexu. Jednou z těchto podjednotek je jaderně kódovaný protein MLQ (nebo také 6,8 kDa proteolipid či MP68), který je konzervován pouze u obratlovců. Cílem této diplomové práce bylo zjistit, jakou úlohu má tato podjednotka ve struktuře, asemblaci a funkci F_1F_0 -ATP syntázy. Pro tyto účely byl v rámci diplomové práce vytvořen buněčný model z linie HEK293 s deficiencí proteinu MLQ metodou CRISPR/Cas9 s párovanými nikázami (tzv. knock-out MLQ, MLQ KO). Tři vybrané MLQ KO linie byly podrobeny elektroforetickým analýzám struktury enzymu (SDS-PAGE, BN-PAGE a CN-PAGE) i funkčním měření respirace a glykolytické kapacity. Sledován byl také vliv absence proteinu MLQ na hladinu transkriptů různých genů OXPHOS enzymů. V MLQ KO liniích došlo ke snížení obsahu podjednotek α , DAPIT a c v F_0 doméně, zatímco proteiny F_1 domény nebyly defektem postiženy. Nativní elektroforézy ukázaly, že ATP syntáza není v MLQ KO kompletně asemblována a její F_0 je destabilizována, podobně jako je tomu u p^0 buněk postrádajících podjednotky α a A6L kódovaných mitochondriální DNA (mtDNA). Nebyl pozorován vliv MLQ na oligomerizaci ATP syntázy. Funkční měření odhalila u MLQ KO signifikantní defekt v kapacitě mitochondriální produkce ATP a preferenci glykolytické dráhy pro získání energie před oxidativní fosforylací. Nepřítomnost proteinu také vedla k mírnému snížení maximální funkční kapacity cytochrom c oxidázy (komplex IV) a redukcii množství mtDNA kódovaných proteinů tohoto enzymu – COX1, COX2 a COX3. qPCR analýza odhalila snížení hladiny mRNA mtDNA-kódovaných proteinů α , A6L a COX3, zatímco množství jaderně kódovaných transkriptů OXPHOS proteinů ovlivněno nebylo. Výsledky diplomové práce prokázaly úlohu proteinu MLQ ve stabilizaci F_0 domény mitochondriální ATP syntázy i jeho možný vliv na regulaci exprese mtDNA-kódovaných genů.

Klíčová slova: MLQ, 6.8 kDa proteolipid, MP68, F_1F_0 -ATP syntáza, mitochondrie, OXPHOS, dýchací řetězec