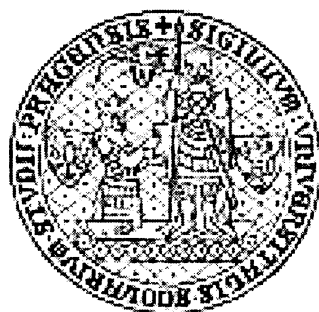


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Praha 2007

Vendula Havlíčková

KARLOVA UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta přírodovědecká

Katedra biochemie

Laboratoř pro studium mitochondriálních poruch 1.LF

**STUDIUM MITOCHONDRIÁLNÍHO METABOLISMU
V JATERNÍ TKÁNI V PRENATÁLNÍM OBDOBÍ**

Diplomová práce

Autor: Vendula Havlíčková

Školitel: RNDr. Hana Hansíková, CSc.

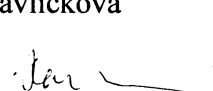
Garant: Doc. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Praha 2007

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením mé školitelky RNDr. Hany Hansíkové, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze, dne 4. května 2007

Vendula Havlíčková

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Vendula Havlíčková', followed by a closing parenthesis symbol ')

Poděkování

Děkuji své školitelce RNDr. Haně Hansíkové, CSc. za odborné vedení mé diplomové práce, ochotu, trpělivost a všechnen čas, který mi věnovala.

Děkuji Prof. MUDr. Jiřímu Zemanovi, DrSc. za cenné rady při vypracovávání mé diplomové práce, upřesnění některých medicínských faktů a za připomínky a úpravu práce samotné.

Děkuji Mgr. Lukáši Stibůrkovi za odbornou pomoc při proteinové analýze, cenné rady a všechnen čas, který mi věnoval.

Mgr. O. Brantové, Mgr. D. Fornůskové, Z. Paříkové, S. Knopové, E. Horové a celému kolektivu pracovníků Laboratoře pro studium mitochondriálních poruch 1. LF UK za pomoc v laboratoři, cenné rady a přátelské pracovní prostředí.

Děkuji MUDr. Heleně Hůlkové, PhD. za provedení histologické analýzy a Mgr. Martině Pejznochové za pomoc při kvantifikaci mtDNA.

Děkuji Doc. RNDr. Marie Stiborové, DrSc., garantce mé diplomové práce, za pomoc a cenné rady.

V neposlední řadě děkuji rodičům za podporu během celého studia.

Diplomová práce vznikla v letech 2005 - 2007 s podporou grantových projektů GAUK 16/2004 a IGA MZ NR/9410 - 3 v Laboratoři pro studium mitochondriálních poruch 1. LF UK.

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK	4
1.1. Mitochondrie	6
1.1.2. Mitochondriální DNA.....	7
1.2. Dýchací řetězec a ATP syntasa	9
1.2.1. Komplex I – NADH: ubichinon oxidoreduktasa	10
1.2.1.1. Biogeneze komplexu I	12
1.2.2. Komplex II – sukcinát: ubichinon oxidoreduktasa	13
1.2.3. Komplex III – ubichinol: cytochrom <i>c</i> oxidoreduktasa	14
1.2.4. Komplex IV – cytochrom <i>c</i> : O ₂ oxidoreduktasa.....	15
1.2.4.1. Biogeneze cytochrom <i>c</i> oxidasy	18
1.2.5. Komplex V – ATP syntasa	18
1.2.6. Superkomplexy dýchacího řetězce	21
1.2.7. Transport mitochondriálních proteinů	22
1.3. Pyruvátdehydrogenasový komplex	22
1.4. Játra a jejich vývoj	25
1.5. Vývoj mitochondriálního energetického metabolismu.....	26
2. CÍL PRÁCE.....	28
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	29
3.1. CHEMIKÁLIE, MATERIÁL A PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ.....	29
3.1.1. Seznam použitých chemikálií, protilátek.....	29
3.1.2. Přístrojové vybavení	31
3.1.3 Biologický materiál.....	32
3.2. METODY	33
3.2.1. Odběr tkáně.....	33

3.2.2. Izolace mitochondrií z jaterní tkáně.....	34
3.2.3. Stanovení koncentrace proteinu.....	34
3.2.3.1. Lowryho metoda	34
3.2.3.2. Metoda podle Bradfordové	35
3.2.4. Spektrofotometrické stanovení aktivit enzymů dýchacího řetězce.....	35
3.2.4.1. Stanovení specifické aktivity citrátsyntasy	36
3.2.4.2. Stanovení specifické aktivity NADH: koenzym Q oxidoreduktasy	36
3.2.4.3. Stanovení specifické aktivity NADH: cytochrom <i>c</i> oxidoreduktasy	37
3.2.4.4. Stanovení specifické aktivity sukcinát: koenzym Q oxidoreduktasy	38
3.2.4.5. Stanovení specifické aktivity sukcinát: cytochrom <i>c</i> oxidoreduktasy	38
3.2.4.6. Stanovení specifické aktivity ubichinol: cytochrom <i>c</i> oxidoreduktasy	39
3.2.4.6.1. Příprava decylubichinolu	39
3.2.4.6.2. Stanovení aktivity ubichinol: cytochrom <i>c</i> oxidoreduktasy	39
3.2.4.7. Stanovení specifické aktivity cytochrom <i>c</i> oxidasy	40
3.2.4.7. 1. Příprava redukováného cytochromu <i>c</i>	40
3.2.4.7. 2. Stanovení aktivity specifické aktivity cytochrom <i>c</i> oxidasy	40
3.2.5. Stanovení katalytické aktivity pyruvátdehydrogenasového komplexu	40
3.2.6. Proteinová analýza	42
3.2.6.1. „ Blue Native“ elektroforéza.....	42
3.2.6.2. Dvourozměrná elektroforéza	44
3.2.6.3. SDS – PAGE a western blot	45
3.2.6.3.1 SDS – PAGE.....	45
3.2.6.3.2. Western blot.....	47
3.2.7. Množství mtDNA v jaterní tkáni	49
3.2.7.1. Izolace DNA	50
3.2.7.2. Kvantifikace mtDNA.....	50
3.2.8. Histologická analýza.....	51
3.2.9. Statistické zpracování dat	51
4. VÝSLEDKY	52
4.1. Histochemická analýza	52
4.2. Izolace mitochondrií z jaterní tkáně	55

4.3. Stanovení aktivit enzymů dýchacího řetězce, citrátsyntasy, pyruvátdehydrogenasy	55
4.4. Proteinová analýza.....	62
4.5. Kvantifikace mtDNA	68
5. DISKUZE	70
6. ZÁVĚR	77
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	79

Seznam zkratek

ABN	roztok akrylamidu na nativní elektroforézu
AcCoA	acetylkoenzym A
APS	peroxosíran amonný
ATP	adenosintrifosfát
BCS	scintilační roztok (biodegradable counting scintillant)
BSA	albumin hovězího séra (z angl. bovine serum albumin)
CoASH	koenzym A
COX	cytochrom <i>c</i> oxidasa (komplex IV)
CS	citrátsyntasa
DCCD	dicyklohexylkarbodiimid
DCPIP	2,6 – dichlorfenolindolfenol
dH ₂ O	destilovaná voda
DTNB	5,5 – dithiobis – [2 – nitrobenzoát]
DTT	dithiotreitol
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
FAD	flavinadenindinukleotid, oxidovaný
FADH ₂	flavinadenindinukleotid, redukovaný
Fe – S centrum	centrum železo – síra (z angl. iron – sulfur cluster)
FMN	flavin mononukleotid
kDa	kilo Dalton
LM	n – dodecyl β – d – maltosid
MSF	„mitochondria import stimulation factor“
MW	molekulová hmotnost
NAD ⁺	nikotinamidadenindinukleotid, oxidovaný
NADH (+ H ⁺)	nikotinamidadenindinukleotid, redukovaný
NCCR	NADH: cytochrom <i>c</i> oxidoreduktasa (komplex I+III)
NQR	NADH: koenzym Q oxidoreduktasa (komplex I)
NDUFA	jaderně kódované podjednotky komplexu I
OAA	oxalacetát

OSCP	„Oligomycin Sensitivity – Conferring Protein“ podjednotka části F ₀ ATP syntasy
Q	koenzym Q, ubichinon
QCCR	ubichinol: cytochrom <i>c</i> oxidoreduktasa (komplex III)
QH ₂	redukováný koenzym Q, ubichinol
OXPPOS	oxidační fosforylace
PDH	pyruvátdehydrogenasa
PDHc	pyruvátdehydrogenasový komplex
PMSF	fenylmetylsulfonyl fluorid
SBG	Serva blue G – Coomassie Brilliant Blue G
SCCR	sukcinát: cytochrom <i>c</i> oxidoreduktasa (komplex II+III)
SDH	sukcinátdehydrogenasa
SDHA (B,C,D)	názvy podjednotek komplexu II
SDS	laurylsíran sodný
SQR	sukcinát: koenzym Q oxidoreduktasa (komplex II)
TCA	kyselina trichloroctová
TEMED	N, N, N', N' tetramethyletylendiamid
TOM	translokasa vnější membrány
TPP	thiamiddifosfát
Tris	bis[2 – hydroxyetyl] – tris[hydroxymetyl]metylamin
Bis – Tris	tris[hydroxymetyl]aminomethan
Tricin	N – tris[hydroxymetyl]alanin

Vysvětlivky :

„assemblage“ – sestavení

„Blue – Native“ – nativní elektroforéza s použitím barvy Serva blue G 250

bp – páry bází

postnatální – po narození

J 3 (16+2) – vzorek fetální jaterní tkáně gestačního stáří 16 týdnů a dva dny

„slot“ – místo v gelu pro nanesení vzorku

„stripování“ – odstranění protilátek z membrány, umožňuje opakované použití membrány pro imunodetekci

„threshold“ – prahová hodnota pro projev deficience

1. LITERÁLNÍ PŘEHLED

1.1. Mitochondrie

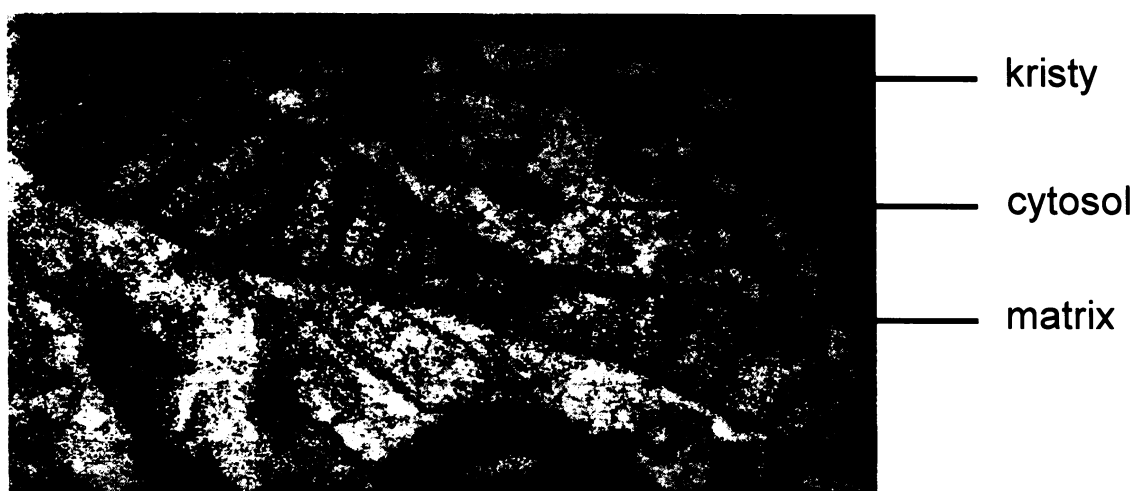
Mitochondrie byly objeveny v druhé polovině 19. století R. Altmanem [1]. Mají oválný, sférický nebo tyčince podobný tvar. Jejich velikost se v jednotlivých tkáních liší, v hepatocytech měří v průměru 3 μm , v endokrinních buňkách pankreatu dosahují velikosti až 10 μm [2]. V jedné buňce je v průměru 100 – 1000 mitochondrií, které se reprodukuje dělením.

Mitochondrie obsahují několik set enzymů zasahujících do metabolismu aminokyselin, organických kyselin, mastných kyselin, porfyrinů, purinů a pyrimidinů. Jejich základní funkcí je však syntéza ATP, kreatinfosfátu, acetyl – CoA a prekurzorů glukoneogeneze k zajištění energetických potřeb buněk. Výrobou energetických zdrojů ovlivňují mitochondrie funkci všech tkání, proces stárnutí i průběh buněčné apoptózy.

Mitochondrie jsou cytoplazmatické organely tvořené vnější a vnitřní mitochondriální membránou (obr. 1.1, str. 7). Prostor mezi nimi se označuje jako intermembránový. Hladká vnější mitochondriální membrána je charakteristická tím, že obsahuje mnoho molekul transportního proteinu porinu, který tvoří transmembránové kanálky umožňující průchod molekulám do velikosti 10 kDa. Membrána dále obsahuje proteiny tvořící transkolázu vnější membrány (TOM) nezbytné pro import jaderně kódovaných mitochondriálních proteinů.

Naproti tomu vnitřní mitochondriální membrána je ze 75 % tvořena proteiny a je volně propustná jen pro O_2 a CO_2 . Ostatní látky (především ATP, ADP, pyruvát, Ca^{2+} , ...) jsou přenášeny pomocí specifických přenašečů. Obsahuje také kardiolipin (difosfatidylglycerol), který zvyšuje nepropustnost membrány pro lipidy, a tím podporuje udržování protonového gradientu. Vnitřní mitochondriální membrána tvoří útvary zvané kristy, které zvětšují její povrch a tím zvyšují respirační kapacitu dané mitochondrie. Počet krist se liší v závislosti na energetické náročnosti tkáně. Vnitřní prostor mitochondrie vyplňuje matrix. Matrix je gelovité povahy, obsahuje 50 % vody, enzymy oxidačního metabolismu, substráty, nukleotidové kofaktory, anorganické ionty, mtDNA, RNA a ribozómy [3]. Nejdůležitější metabolické pochody probíhají na vnitřní mitochondriální membráně a v matrix.

Mitochondrie pravděpodobně vznikly endosymbiozou předchůdce eukaryotické buňky s α – Proteobakteriemi před jedním bilionem let [4]. Jedním z důkazů je vlastní mitochondriální genom – mtDNA, jehož velikost se mění v závislosti na organismu (5 – 100 genů). Avšak většina proteinů v mitochondriích není kódována mtDNA, ale jadernou DNA. Je to pravděpodobně dáno přechodem části genů z mtDNA do jaderné DNA během vývoje eukaryot. Mitochondrie jsou tedy kontrolovány dvěma genetickými systémy nDNA a mtDNA.



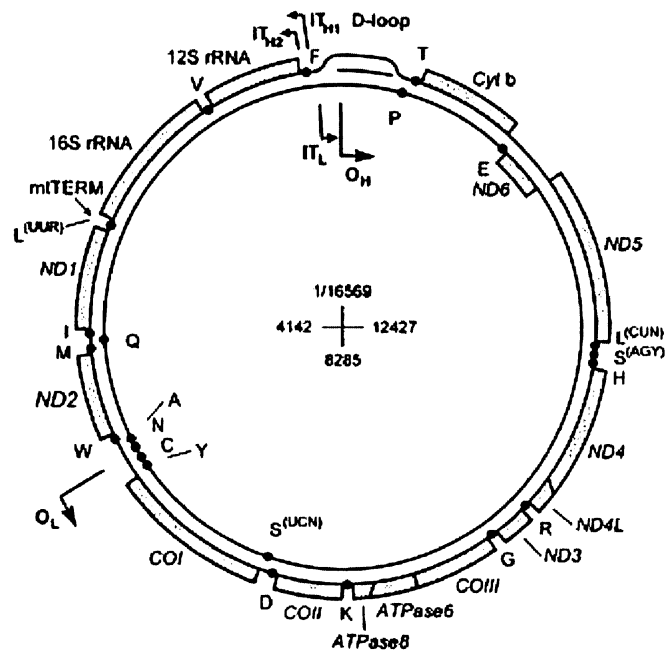
obr. 1.1 Mitochondrie v elektronovém mikroskopu (zvětšení 44.000x)

(autor: RNDr. J.Sládková, CSc, 2003, Klinika dětského a dorostového lékařství)

1.1.2. Mitochondriální DNA

Mitochondriální DNA (mtDNA) byla objevena v roce 1963 a charakterizována v roce 1967 Claytonem a Vinogradem [2]. Lidská mtDNA je dvouřetězcová kruhová molekula o velikosti cca 16,5 kbp. MtDNA se dědí po maternální linii, je složena ze dvou řetězců (H a L), neobsahuje introny, má kromě regulačních míst pouze 37 genů. Obsahuje 13 genů kódujících proteiny dýchacího řetězce, 2 geny pro rRNA a 22 genů pro tRNA (obr. 1.2, str. 9). Mitochondriální mRNA jsou překládány na mitochondriálních ribozomech. Mitochondriální genetický přepisový kód se liší od kódu nukleárního. Na rozdíl od jaderné DNA není počet molekul mtDNA v buňkách jednotlivých tkání konstantní, ve většině buněk je přítomno $10^3 - 10^4$ kopií [5]. Největší množství mtDNA se nachází ve zralém oocytu, kde tvoří až 1/3 celkového genetického materiálu. MtDNA je náchylnější k mutacím více než nDNA, protože se nachází v blízkosti vnitřní mitochondriální

membrány, kde vznikají volné kyslíkové radikály. Navíc mtDNA není chráněna histony a v mitochondriích nejsou přítomny funkční mechanismy pro její opravu.



obr. 1.2 Mapa lidské mtDNA (16569 bp) (převzato z[6])

vnější kruh – H – řetězec

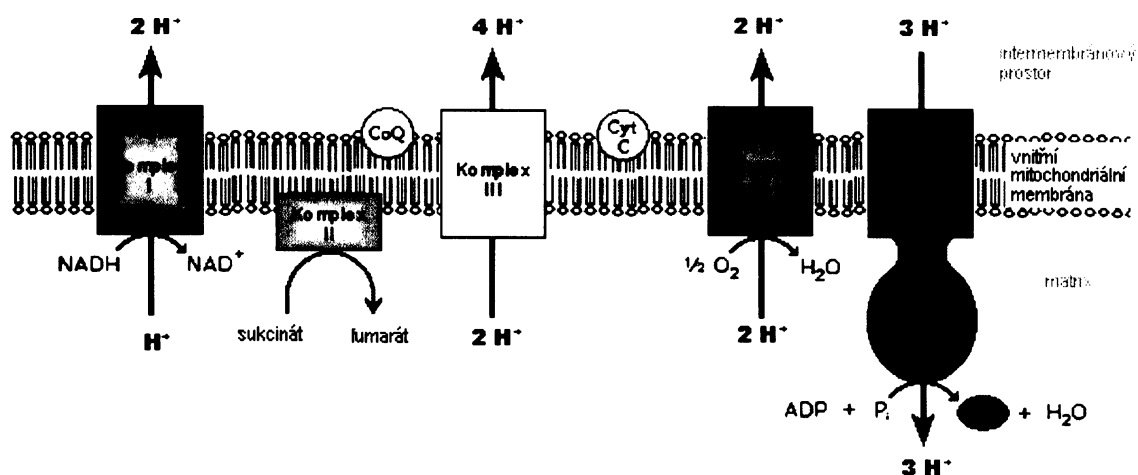
vnitřní kruh – L – řetězec

O_H – replikační počátek H – řetězce; směr syntézy DNA naznačen šipkou

O_L – replikační počátek L – řetězce; směr syntézy DNA naznačen šipkou

IT_L, IT_{H1}, IT_{H2} – místa iniciace transkripce; směr transkripce naznačen šipkami

1.2. Dýchací řetězec a ATP syntasa (OXPHOS)



obr. 1.3 Schéma dýchacího řetězce a ATP syntasy (převzato z [3])

Systém oxidační fosforylace (OXPHOS) je hlavním zdrojem ATP v buňce (obr. 1.3). Oxidační fosforylace je zprostředkována čtyřmi enzymovými komplexy dýchacího řetězce a ATP syntasou, které jsou lokalizovány ve vnitřní mitochondriální membráně. Savčí komplexy OXPHOS jsou složeny z přibližně 90 polypeptidových podjednotek a 22 prostetických skupin. Z 90 podjednotek je 13 podjednotek kódováno mitochondriální DNA, ostatní jadernou DNA (tab. 1.1, str. 10) [7].

Dýchací řetězec je tvořen komplexem I (NADH: ubichinon oxidoreduktasa), komplexem II (sukcinát: ubichinon oxidoreduktasa), komplexem III (ubichinol: cytochrom *c* reduktasa), komplexem IV (cytochrom *c*: O₂ oxidasa) a dvěma mobilními přenašeči koenzymem Q (ubichinonem) a cytochromem *c*. Sukcinát a NADH vznikající v matrix (při **glykolýze**, v citrátovém cyklu a β – oxidaci) jsou oxidovány NADH – dehydrogenasou (v komplexu I) nebo sukcinát – dehydrogenasou (v komplexu II). Předané elektrony jsou dále přenášeny na ubichinon, komplex III, cytochrom *c* až na komplex IV, kde dochází k redukci molekulárního kyslíku na vodu. Sekvence přenosu elektronů byla určena ze spektrofotometrických měření a měření spotřeby kyslíku u různých substrátů za použití specifických inhibitorů. Funkcí dýchacího řetězce je přenos elektronů z redoxního páru NAD⁺/NADH+H⁺ s nižším redukčním potenciálem

($E_0 = -320$ mV) na redoxní pár O_2/H_2O s vyšším redukčním potenciálem ($E_0 = +820$ mV) [3]. Celkový rozdíl potenciálů v dýchacím řetězci je 1,1 voltu. Energie uvolněná při průchodu elektronů elektron transportním řetězcem se využívá k čerpání protonů. Protonový gradient pohání životně důležitou syntézu ATP. Transport protonů umožňují komplexy I, III a IV. Přenosem elektronů z jedné molekuly NADH dýchacím řetězcem se uvolní množství energie potřebné k syntéze necelých tří molekul ATP a přenos elektronů z $FADH_2$ vede ke vzniku necelých dvou molekul ATP [8].

tab. 1.1 Přehled nDNA a mtDNA kódovaných podjednotek OXPHOS

komplex	počet nDNA kódovaných podjednotek	počet mtDNA kódovaných podjednotek
I	39	7 (ND1 – 7)
II	4	0
III	10	1 (cytochrom <i>b</i>)
IV	10	3 (Cox1 – 3)
V	14	2 (ATPasa6, ATPasa8)

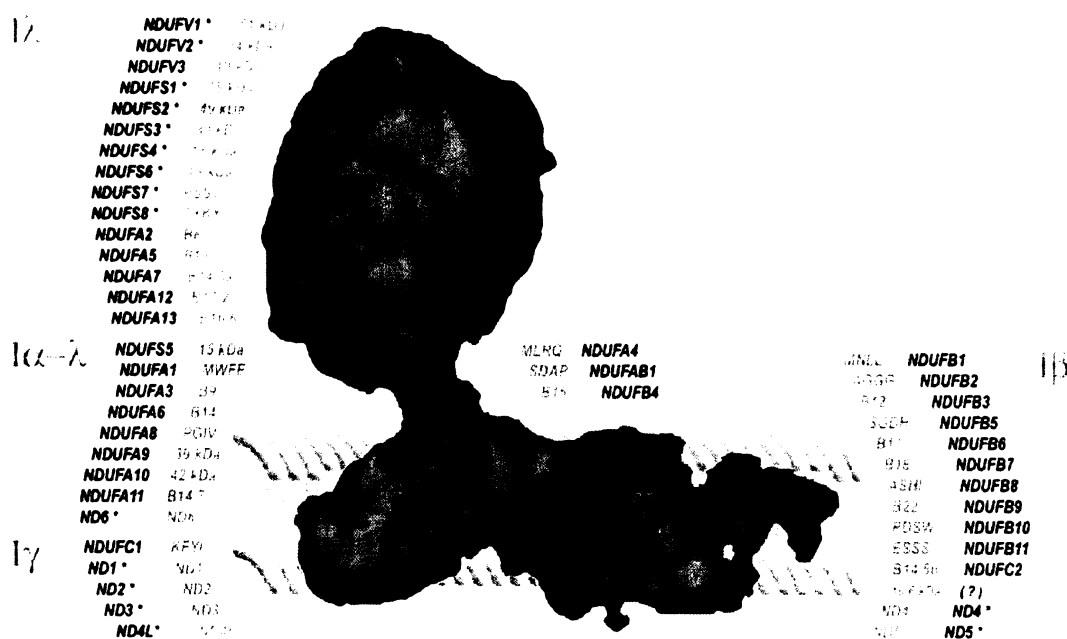
1.2.1. Komplex I – NADH: ubichinon oxidoreduktasa

Komplex I – NADH: ubichinon oxidoreduktasa je největší, nejvíce komplikovaný a nejméně probádaný komplex systému OXPHOS. Je složen ze 46 podjednotek (39 kóduje nDNA a 7 mtDNA) a je velký 1MDa. Je jedním ze dvou míst vstupu elektronů do dýchacího řetězce. Katalyzuje přenos dvou elektronů z NADH na lipofilní přenašeč ubichinon (koenzym Q_{10}), to je spjato s přenosem 4 vodíkových protonů z matrixové strany do mezimembránového prostoru. Protonovou pumpou mohou procházet H^+ (Na^+) ionty, jejich translokace přes vnitřní mitochondriální membránu přispívá k tvorbě elektrochemického protonového gradientu. Mechanismus protonové pumpy v komplexu I je v literatuře popisován dvěma modely: přímý (redoxně řízený) a nepřímý (konformačně řízený). Dva elektrony získané oxidací NADH jsou přeneseny na primární elektronový akceptor komplexu I nekovalentně vázaný flavinmononukleotid (FMN). Odtud dále na redoxní centrum tvořené osmi Fe – S klastry a nakonec na elektronový přenašeč ubichinon (Q), který se redukuje na ubichinol (QH_2) [7].



Elektronovým mikroskopem bylo zjištěno, že jednotlivé komponenty komplexu I jsou uspořádány do struktury připomínající písmeno “L”, (nebo strukturu boty). Tato unikátní struktura je evolučně konzervovaná. Je tvořena dvěma na sebe kolmými částmi – rameny. Jedno rameno, zapuštěné do lipidové dvojvrstvy, je hydrofóbní (membránová část), druhé rameno prostupuje do matrix a je hydrofilní (periferní část) [9, 10]. Složení periferní části komplexu I bylo studováno na bakterii *Thermus Thermophilus*. Obsahuje většinu redoxních faktorů a podílí se na transferu elektronů z NADH na ubichinon a je tvořen jen jadernými podjednotkami (označují se NDUFA). 7 z nich obsahuje řetězec složený z osmi Fe – S klastrů a spojený s dvěma katalytickými jednotkami. První klastr v řetězci je tetranukleární klastr N3, nachází se v 51 kDa metaloproteinu (NDUFAV1), který také obsahuje NADH vazebné místo a primární elektronový akceptor kovalentně vázaný flavinmononukleotid (FMN). Klastry N1b, N4, N5 a distální tetranukleární klastr N7 se nacházejí v 75 kDa podjednotce (NDUFAS1). Klastr N6a a N6b se nacházejí v podjednotce NDUFAS8 (označované TYKY). Je to spojující podjednotka na rozhraní s hydrofobním ramenem. Poslední klastr v řetězci je v podjednotce NDUFAS (označované PSST) a pravděpodobně zajišťuje redukcí ubichinonu na ubichinol blízko hranice s membránovým ramenem. Obvyklá cesta přenosu elektronů je tedy: FMN – N3 – N1b – N4 – N5 – N6a – N6b – N2 – Q [11, 12]. Membránová část je složená přibližně z 20 podjednotek, 7 z nich je kódováno mtDNA (ND1 – 6 a ND4L) [13]. Podjednotka ND1 tvoří pravděpodobně vazebné místo pro ubichinon. Podjednotky ND2, ND4 a ND5 se nejspíše podílejí na přenosu elektronů [14].

Komplex I obsahuje 14 evolučně konzervovaných podjednotek, které bývají označovány jako jádro komplexu I a hrají primární roli v přenosu elektronů a translokaci protonů (obsahují redoxní centra, substrát vazací místa). Je to 7 jaderně kódovaných podjednotek (NDUFS1 – 3, NDUFS7 – 8, NDUFV1 – 2) a všech 7 mitochondriálně kódovaných podjednotek (ND 1 – 7). O funkci ostatních 32 podjednotek je známo velmi málo. Komplex I po přidání detergentu disociuje na 4 subkomplexy I α , I β , I γ a I λ (obr. 1.4, str. 12) [10, 15]. Subkomplex I α zahrnuje periferní rameno a malou část membránového ramene, přičemž I β obsahuje hlavní část membránového ramene. Složení subkomplexů I γ a I λ je závislé na druhu použitého detergentu.



obr. 1.4 Model komplexu I (převzato z [16])

1.2.1.1. Biogeneze komplexu I

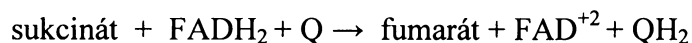
Téměř všechny strukturní podjednotky komplexu I již byly popsány, avšak jeho biogeneze a interakce s ostatními komplexy OXPHOS jsou dnes předmětem intenzivního studia. Ke studiu „asemblace“ jsou používány buňky pacientů s deficiencí tohoto komplexu. Deficience jsou způsobené mutacemi v jaderných i mitochondriálních genech kódujících podjednotky komplexu I. Studie „asemblačního“ procesu komplexu I u savců, zejména u člověka prokázaly, že některé podjednotky jsou nezbytné pro „asemblaci“ ostatních podjednotek do finálního komplexu.

Podjednotky ND4 a ND6 jsou esenciální pro „asemblaci“ ostatních ND podjednotek [17]. Ztráta podjednotky ND4 zabrání tvorbě membránového ramene. Mutace v podjednotkách ND6 a ND1 vedou k četným redukcím v holokomplexu I [18]. Podjednotka ND2 je důležitá pro „asemblaci“ a stabilitu komplexu I. Mutace v této podjednotce způsobuje absenci dehydrogenasové aktivity [19]. Naproti tomu podjednotka ND5 není nezbytná pro asemblaci komplexu, ale je nezbytná pro jeho aktivitu [20]. Ztráta podjednotky ND3 nevede k žádné změně. Podjednotka NDUFA 1 má klíčovou roli v „asemblaci“ komplexu I, na její přítomnosti jsou závislé některé ND podjednotky a

také některé další jaderně kódované podjednotky. Ztráta některé z ND podjednotek (mtDNA kódované) nemá žádný efekt na proteinové složení hydrofilního ramene složeného z jaderně kódovaných podjednotek [21]. Většina jaderně kódovaných podjednotek je již v této době vázaná v „asemblačních“ intermediátech [13]. Nedostatek podjednotky NDUFA 8 negativně ovlivňuje „aseblaci“ a stabilitu komplexu I [22]. Byl již navržen „asemblační“ proces komplexu I u člověka a ten se značně liší od „asemblačního“ procesu v aerobní houbě *Neurospora crassa* [19], kde jsou hydrofobní a hydrofilní ramena tvořena nezávisle na sobě a potom se spojí v jeden komplex [23].

1.2.2. Komplex II – sukcinát: ubichinon oxidoreduktasa

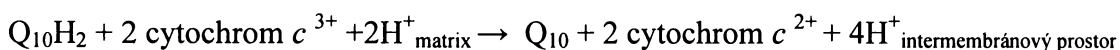
Mitochondriální sukcinátdehydrogenasový komplex (SDH) je součástí dýchacího řetězce i Krebsova cyklu [24]. Komplex II – sukcinát: ubichinon oxidoreduktasa je nejmenším komplexem dýchacího řetězce, jeho molekulová hmotnost je 120 kDa. Jako jediný komplex OXPHOS je kódovaný pouze jadernou DNA. Katalyzuje oxidaci sukcinátu na fumarát spojenou s redukcí ubichinonu na ubichinol.



Komplex II nemá translokační funkci a nepodílí se tak na tvorbě elektrochemického potenciálu, ale umožňuje vstup elektronů z FADH₂ do dýchacího řetězce. Savčí komplex II je složen ze čtyř pouze jaderně kódovaných podjednotek, tří Fe – S klastrů, kovalentně vázané molekuly FAD a cytochromu *b*₅₅₈. Dvě větší hydrofilní podjednotky SDHA (70 kDa) a SDHB (27 kDa) [25] se nacházejí v matrix a na membránu jsou navázané prostřednictvím dvou menších, v membráně zakotvených hydrofobních podjednotek SDHC (15 kDa) a SDHD (13 kDa). Podjednotka SDHA (flavoprotein) obsahuje molekulu FAD. Podjednotka SDHB obsahuje tři lineárně spojené Fe – S klastry, nazývají se S1 [2Fe – 2S], S2 [4Fe – 4S] a S3 [3Fe – 4S]. Klastry S1, S2, S3, S4 se vyskytují ve stechiometrickém poměru 1:1:1:1 s FAD. Klastry S1 a S3 jsou redukovány sukcinátem, zatímco klastr S2 je redukován dithioničitanem. Podjednotky SDHA a SDHB spolu dohromady tvoří enzym sukcinátdehydrogenasu. Mechanismus přenosu elektronů komplexem II není dosud úplně zřejmý. Sukcinát předá elektrony molekule FAD, kde je

vazebné místo pro sukcinát (SDHA). Ty jsou pak přeneseny na Fe – S klastry a dále na membránové podjednotky (SDHC, SDHD), kde probíhá redukce ubichinonu na ubichinol. Byla nalezena dvě vazebná místa pro ubichinon Q1 a Q2. Redukce ubichinonu na ubichinol byla prokázána pouze ve vazebném místě Q1, které se nachází na okraji hydrofobní kapsy tvořené podjednotkami SDHB, SDHC a SDHD a leží blízko [3Fe – 4S] klastru. Jeho aminokyselinové složení je v organismech striktně konzervované [26]. Molekula cytochromu b_{558} je navázaná na podjednotky SDHC a SDHD, ale jeho role v transportu elektronů je stále nejasná [7, 27], pravděpodobně nefunguje jako přenašeč se sukcinátu na fumarát. Cytochrom b_{558} se spektrálně liší od cytochromu b z komplexu III.

1.2.3. Komplex III – ubichinol: cytochrom c oxidoreduktasa

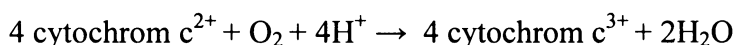


Třetí komplex dýchacího řetězce ubichinol: cytochrom c oxidoreduktasa katalyzuje přenos elektronů z QH_2 na cytochrom c . Cytochrom c je volně vázaný k vnější straně vnitřní mitochondriální membrány a střídavě se váže na cytochrom c_1 komplexu III a na komplex IV a funguje mezi nimi jako přenašeč elektronů. Savčí komplex III se vyskytuje ve formě dimeru, monomer má molekulovou hmotnost 240 kDa [28]. Je složen z 11 podjednotek a několika redoxních skupin: cytochromu b , cytochromu c_1 a binukleárního Fe – S klastru (Fe_2S_2) [29]. Jsou přítomny v poměru 2:1:1. Podjednotky jsou podle mobility na elektroforetickém gelu označeny římskými číslicemi od I do XI. Podjednotky I a II se označují CORE 1 (49 kDa) a CORE 2 (47 kDa). Jsou to největší podjednotky komplexu, pravděpodobně se neúčastní přenosu elektronů, ale jejich přítomnost je esenciální pro správnou „asemblaci“ celého komplexu. Podjednotka III (43 kDa) bývá také nazývána cytochrom b , protože obsahuje dvě hemové skupiny (cytochrom b_{566} a cytochrom b_{562}), které mají odlišné spektrální a redoxní vlastnosti. Je jedinou podjednotku komplexu III kódovanou mtDNA, ostatní podjednotky jsou kódovány jaderně. Tento hydrofobní protein je hlavní složkou transmembránové části komplexu III a je umístěn v centrální části enzymu. Podjednotka IV (27kDa) obsahuje cytochrom c_1 , nachází se na vnějším povrchu vnitřní mitochondriální membrány a reaguje s elektronovým přenašečem cytochromem c . Podjednotka V (22 kDa) se označuje jako

Rieskeho Fe – S protein [30] (díky obsahu Fe – S klastrů) podle svého objevitele a má pravděpodobně oxidačně – redukční vlastnosti [7]. Nachází se mezi cytochromem *b* a cytochromem *c*₁. Ostatní podjednotky neobsahují prostetické skupiny a jejich role nebyla ještě zcela objasněna. Protein zvaný „Hinge“ (9 kDa) stimuluje přenos elektronů z cytochromu *c*₁ na cytochrom *c* [31]. Podjednotky 13 kDa a 9 kDa se nejspíše účastní vazby ubiquinolu. Funkce podjednotky 7 kDa úzce spojené s cytochromem *c*₁ a „Hinge“ proteinem je pravděpodobně spojena se stimulací přenosu elektronů z Fe – S center na cytochrom *c*₁ nebo z cytochromu *c*₁ na cytochrom *c*. Podjednotka 6 kDa je nejspíše spojena s Fe – S proteiny. Byl akceptován proces popisující průběh transportu elektronů a translokace protonů v komplexu III, který je označován jako *Q cyklus* [7]. V komplexu III se nacházejí dvě reakční centra pro ubiquinon, nazývají se *Q_{out}* – vnější, *Q_{in}* – vnitřní. Nejprve je v místě *Q_{out}* první elektron přenesen z ubiquinolu QH₂ na Fe – S klastry za vzniku nestabilního ubisemiubichinonu. Elektron je dále přenesen na cytochrom *c*₁ a cytochrom *c*. Následně je další elektron přenesen přes hem *b*₅₆₆ na *b*₅₆₂ a dále na ubiquinon v místě *Q_{in}* za vzniku stabilního semiubichinonu, který zůstane nadále v tomto reakčním centru navázán. V druhém cyklu dojde znovu k navázání QH₂ na místo *Q_{out}*, ubisemiubichinon je následně redukován na QH₂ druhým elektronem a zároveň dojde k přijmutí 2 protonů z matrix (poslední 2 kroky jsou lokalizovány v místě *Q_{in}*). Výsledkem *Q cyklu* je oxidace jednoho ubiquinolu QH₂ na *Q* ubiquinon, dvě molekuly cytochromu *c* jsou redukovány, dva protony z matrix a 2 protony z ubiquinolu jsou translokovány do intermembránového prostoru [3, 7].

1.2.4. Komplex IV – cytochrom *c*: O₂ oxidoreduktasa (cytochrom *c* oxidasa)

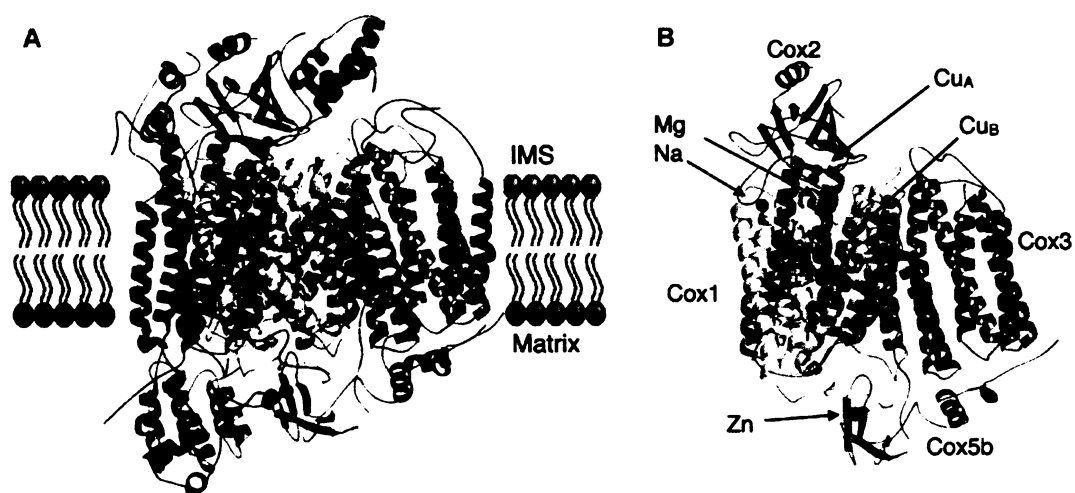
Komplex IV, cytochrom *c*: O₂ oxidoreduktasa nebo cytochrom *c* oxidasa (COX) je terminálním komplexem dýchacího řetězce (obr. 1.5, str. 17). Odebírá elektrony z redukováného cytochromu *c* a následně je využívá pro redukcí molekulárního kyslíku na vodu. Zároveň dochází k translokaci protonů, a tím generaci elektrochemického gradientu. Na každý elektron, který projde enzymem, je jeden proton spotřebován (k redukcí O₂) a jeden proton přečerpán [7].



Komplex je složen z mnoha různých podjednotek jejichž počet se během evoluce v závislosti na druhu organismu zvyšuje [32].

Savčí COX je heteroligomerní, transmembránový komplex o molekulové hmotnosti 200 kDa. Je složený ze 13 podjednotek, 3 podjednotky jsou kódovány mtDNA a 10 podjednotek nDNA [33]. COX obsahuje několik redoxně aktivních prostetických skupin, které se přímo podílí na elektronovém přenosu (dva hemy A (*a*, *a3*) a dvě Cu centra: Cu_A, Cu_B) [34]. Mitochondriálně kódované podjednotky (Cox1, Cox2 a Cox3) jsou evolučně konzervované, obsahují prostetické skupiny a tvoří katalytické a strukturní centrum komplexu. Podjednotka I – Cox1 je největší (56 kDa), nejvíce konzervovaná podjednotka komplexu, je vysoce hydrofobní a obsahuje oba hemy A, Cu_B centrum a 12 transmembránových helixů. Hem *a3* – Cu_B tvoří binukleární centrum, které je místem redukce kyslíku [35, 36]. Podjednotka II – Cox2 je nejmenší (26 kDa) a nejméně hydrofobní podjednotka katalytického centra enzymu. Je tvořen z C terminální domény, prostupující do intermembránového prostoru spojené transmembránovým α – helixem s vnitřní membránou. C – terminální doména Cox2 obsahuje Cu_A centrum představující vazebné místo pro cytochrom *c*. Cox3 neobsahuje žádné redoxní centrum, je vysoce hydrofobní a stejně jako Cox1 je zabudována do vnitřní membrány prostřednictvím 7 transmembránových α – helixů [35]. Cox3 není přímo zapojena do translokace protonů. Studie COX v *Rhodobacter sphaeroides* ukazují, že přítomnost Cox3 udržuje rychlý protonový tok do D – kanálu za fyziologického pH (napomáhá odstranit reaktivní kyslíkové intermediáty) [37]. Zbývajících 10 evolučně mladších jaderně kódovaných podjednotek je do mitochondrií transportováno po syntéze v cytoplazmě [38, 39], jsou to malé podjednotky nacházející se na okrajových částech jádra enzymu, jsou důležité pro „asemblaci“ a stabilitu holoenzymu a také mají vliv na aktivitu enzymu. Některé jaderně kódované podjednotky mají tkáňově specifické isoformy, jejichž složení se mění během fetálního vývoje a bezprostředně po něm. Podjednotky Cox5a, Cox5b, a Cox6b jsou hydrofilní extramembránové proteiny, zatímco ostatní jaderně kódované podjednotky jsou hydrofobní polypeptidy vnitřní mitochondriální membrány. Cox5a je jediná podjednotka neinteragující s centrem enzymu, je navázaná na Cox4 a nemembránovou část Cox6c [35]. Některé podjednotky obsahují ionty kovů, které se podílejí na elektronovém transportu, redukci kyslíku [38], ale jsou také důležité pro biogenezi a stabilitu komplexu. Periferní podjednotka Cox5a obsahuje vázané Zn²⁺ ionty, Mg²⁺ ionty byly nalezeny na rozhraní Cox1 a Cox2

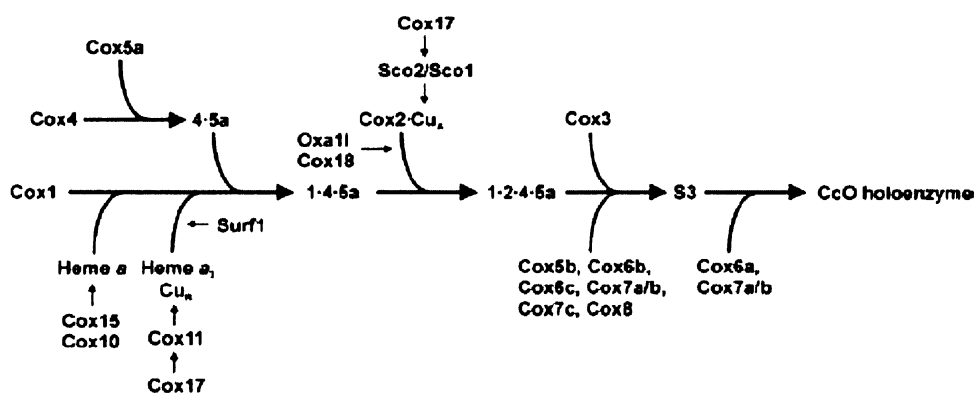
podjednotek. Podjednotka Cox1 může dále vázat Na^{1+} nebo Ca^{2+} . Funkce těchto iontů nebyla doposud objasněna. Nízkospinový hem A a heterobimetalické hemové centrum $a_3 - \text{Cu}_B$ jsou zanořeny hluboko v podjednotce Cox1, binukleární centrum Cu_A na Cox2 vyčnívá 8 Å do intermembránového prostoru. Dva ionty mědi (Cu^I , Cu^{II}) jsou v COX koordinovány dvěma cysteiny, dvěma histidiny, jedním methioninem a karbonylovým kyslíkem peptidové struktury Cox2. Cytochrom *c* předává elektrony na vnější straně mitochondriální membrány primárnímu elektronovému akceptoru COX, kterým je Cu_A . Nejprve je elektron rychle přenesen a rozdělen mezi Cu_A a hem *a*, pak je transportován na vysokospinové binukleární centrum $\text{Cu}_B - \text{hem } a_3$ (redukční fáze). Zde dochází k vazbě molekulového O_2 a jeho následné redukci na vodu (oxidační fáze). Protony k redukci kyslíku jsou přeneseny z matrix do blízkosti $\text{Cu}_B - \text{hem } a_3$ dvěma různými cestami. K – cesta (podle konzervovaného lysinového zbytku) transportuje 1 – 2 vodíkové protony během redukční fáze, D – cesta (podle konzervovaného aspartátového zbytku) přenáší 2 až 3 zbývající protony pro tvorbu H_2O nebo k translokaci 4 protonů do inter – membránového prostoru [40]. Translokace protonů probíhá souběžně s redukcí kyslíku. Volná energie, která se vytvoří během translokace protonů, je přeměněna na elektrochemický potenciál využívaný ATP syntasou.



obr. 1.5 Cytochrom *c* oxidasa (převzato z [41])

1.2.4.1. Biogeneze cytochrom *c* oxidasy (COX)

Holoenzym COX vzniká postupným spojováním jednotlivých podjednotek přes „asemblační“ intermediáty (obr 1.6). Tento proces je relativně pomalý a ještě ne zcela objasněný. Poločas života holoenzymu je přibližně 3 dny [32]. Zatím bylo nalezeno 6 jaderně kódovaných faktorů mající vliv na „asemblaci“ COX (Cox10, Cox11, Cox15, SCO1, SCO2 a SURF1). SCO2 (25 kDa) je měď vázající membránový protein, který pravděpodobně zodpovídá za transport mědi (Cu_A) do podjednotky Cox2. Mutace v lidské SCO2 způsobují fatální deficienci COX. SURF1 (30 kDa) je transmembránový protein, jeho přesná funkce není známá, ale pravděpodobně ovlivňuje spojení Cox2 s „asemblačním“ intermediátem S2 (Cox1, Cox4, Cox5a) [42, 43]. Pro vytvoření Cu_B je pravděpodobně nezbytný membránový protein Cox11 [44]. K „asemblačnímu“ intermediátu S2, který již obsahuje prostetické skupiny, se potom připojí většina ostatních jaderně kódovaných podjednotek současně s Cox3. Nakonec se připojí poslední tři podjednotky a proběhnou postranlační úpravy. Vzniklý holoenzym se dále spojí s komplexem I a III za vzniku 1,7 MDa superkomplexu (obr. 1.6) [45, 46].



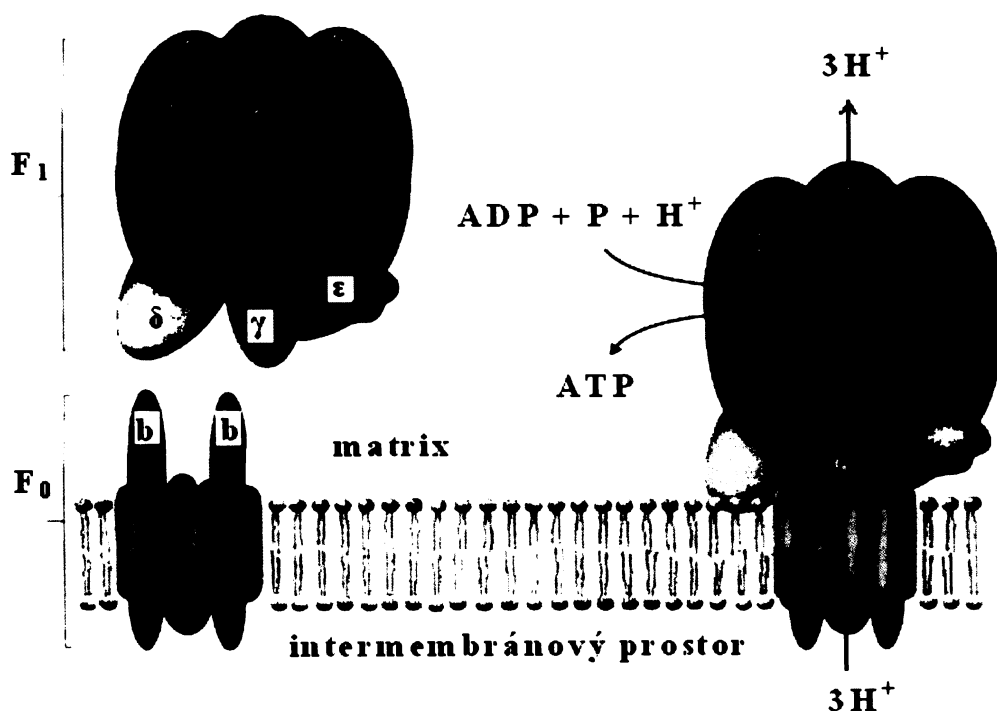
obr. 1.6 Návrh modelu biogeneze COX (převzato z [47])

1.2.5. Komplex V – ATP syntasa

ATP syntasa je klíčová složka mitochondriálního energetického metabolismu, protože je producentem většiny ATP v aerobních buňkách. Katalyzuje syntézu ATP z ADP a anorganického fosfátu, využívá elektrochemický gradient vytvořený v dýchacím řetězci. Může ale také fungovat v opačném směru. Její struktura a funkce jsou mezi druhy velmi

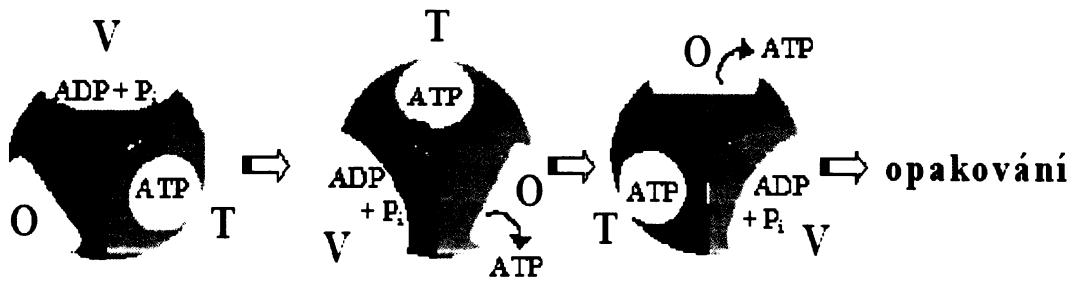
konzervované. ATP syntasa se nachází v plazmatických membránách bakterií, v tylakoidní membráně chloroplastů rostlin a ve vnitřní mitochondriální membráně živočichů.

Savčí enzym má molekulovou hmotnost 550 – 600 kDa. Je složen z minimálně 16 různých podjednotek, z nichž některé jsou přítomné ve více kopiích. Neobsahuje žádné prostetické skupiny. Mitochondriální ATP syntasa se skládá ze dvou hlavních částí: globulární katalytické F_1 části, vyčnívající do matrix, a transmembránové proton – translokující F_0 části (obr. 1.7). Domény jsou spojeny dvěma stonky – interním a periferním. Domény mohou být od sebe odděleny. F_1 část si zachová ATP hydrolytickou aktivitu a F_0 si zachová svou proton – translokující funkci, ale je pasivní a obousměrná. Pouze propojené domény jsou schopné syntézy ATP. Energie protonového gradientu je přenášena na F_1 katalytickou část pomocí reverzibilních konformačních změn působící přes F_A část [48].



obr. 1.7 Mitochondriální ATP syntasa, naznačený model „asemblace“ komplexu (převzato z [3])

Katalytická F_1 část je složena z 5 hydrofilních podjednotek ve stechiometrickém poměru $3\alpha : 3\beta : 1\gamma : 1\delta : 1\varepsilon$ [49]. Podjednotky α a β tvoří 3 katalytické domény, obsahují vazebná místa pro nukleotidy. Syntéza ATP probíhá na podjednotce β [8]. Součástí F_1 části je inhibiční faktor IF_1 , který má schopnost ireverzibilně se vázat na β podjednotku a inhibovat tak syntézu ATP. K inhibici dochází, když pH matrix klesne pod 6,5 [50]. Membránová část F_0 je složena z 9 podjednotek: a (ATPasa 6), b, c_{10} , d, e, f, g, F_6 , A6L (ATPasa 8). Dvě podjednotky F_0 části jsou kódované mitochondriálně ATPasa 6 a ATPasa 8. Interní stonek je tvořen podjednotkami γ , δ , ε a periferní stonek podjednotkami OSCP, F_6 , b a d. OSCP je klíčový pro vazbu F_1 k F_0 , tvoří dvě α – helikální ramena procházející membránou. Jeho C – konec je součástí stonku a významně se podílí na přenosu elektrochemického gradientu protonů do F_1 části [51]. Podjednotka c je základní složkou H^+ kanálu F_0 domény, váže inhibitor translokace protonů dicyklohexylkarbodiimid a je nejpočetnější podjednotkou komplexu V. Podjednotky c tvoří cirkulární oligomer. Počet podjednotek c není dosud objasněn a liší se v závislosti na živočišném druhu a pravděpodobně i v závislosti na metabolických podmínkách [52]. K přenosu protonů slouží vysoce konzervované aminokyselinové zbytky umístěné na podjednotkách c a a. Při translokaci protonů dochází ke změnám konformace podjednotek kanálu (F_0 část), podjednotka a reaguje postupně s jednotlivými podjednotkami c a předpokládá se, že tyto rotační pohyby jsou přes interní stonek přeneseny na podjednotku F_1 . Výsledkem konformačních změn v F_1 části jsou změny v trojrozměrné struktuře katalytických míst. Katalytická místa mohou být ve 3 stavech: otevřený (O), volný (V) a těsný (T). Konformační změny, způsobené přenosem protonů přes vnitřní mitochondriální membránu, přemění T – místo s vázaným ATP na O – místo a dojde k uvolnění ATP. Zároveň je V – místo s volně vázaným ADP a P_i přeměněno na T – místo, kde jsou substráty pevně vázány a tvoří se ATP. Nové substráty se vážou do O – místa, které se tím přemění na V – místo [53] (obr. 1.8, str. 20). K produkci jedné molekuly ATP je zapotřebí několika krokové pootočení (tři až čtyři malé rotace) $\gamma\varepsilon$ vzhledem k $\alpha_3\beta_3$ (úhel těchto pootočení závisí na počtu podjednotek c v kruhu) tak, aby výsledná rotace byla 120° , což je schopná zajistit translokace tří nebo čtyř protonů [54]. Přesná funkce a umístění podjednotek e, f a g zatím není známa. Mechanismus skládání jednotlivých podjednotek není dnes zcela jasný. Studie „asemblace“ ATP syntasy byly provedeny na kvasinkách. „Asemblace“ ATP syntasy u prokaryot a vyšších eukaryot se pravděpodobně liší. Biogeneze F_1 a F_0 podjednotky pobíhá nezávisle [7].



obr. 1.8 Mechanismus konformačních změn při ATP syntéze na F_1 podjednotce

(upraveno podle: 2.2.2007,

<http://www.rpi.edu/dept/bcbp/molbiochem/MBWeb/mb1/part2/f1fo.htm>)

1.2.6. Superkomplexy dýchacího řetězce

Komplexy dýchacího řetězce se nevyskytují ve vnitřní mitochondriální membráně samostatně, ale společně tvoří větší celky zvané superkomplexy neboli respirasomy, které byly nalezeny v mitochondriálních i v bakteriálních membránách. Obsahují komplexy I, III a IV s výjimkou *Saccharomyces cerevisiae*, která nemá komplex I. U *Saccharomyces cerevisiae* a *P. denitrificans* spojuje komplex III a IV dohromady především kardiolipin (protein vnitřní mitochondriální membrány). V lidských mitochondriích byly nalezeny superkomplexy I_1III_2 a $I_1III_2IV_1 - 4$ [55]. Studie mitochondrií od pacientů s nedostatečnou „asemblací“ komplexu I a IV prokázala, že přítomnost těchto komplexů není vyžadována při „asemblaci“ ostatních komplexů OXPHOS.

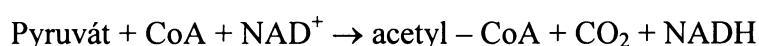
Bylo zjištěno, že při genetickém defektu (zkrácení aminokyselinové sekvence cytochromu *b*) způsobujícím špatnou „asemblací“ komplexu III, dochází k deficiencím komplexu I. Z toho je patrné, že pro správnou asemblaci a stabilitu komplexu I je nezbytná přítomnost komplexu III. Na stabilitě superkomplexů se podílejí hydrofóbní vazby, protože je lze od sebe rozdělit přidáním koncentrovaného detergentu [45].

1.2.7. Transport mitochondriálních proteinů

Více než 98 % mitochondriálních proteinů je kódováno jadernou DNA. Proteiny jsou syntetizovány v cytoplazmě a následně musejí být importovány do mitochondrie a správně začleněny do subkompartmentů. Jaderně kódované proteiny najdeme ve vnější a vnitřní mitochondriální membráně, mezimembránovém prostoru i v matrix. Jsou známy dva hlavní mechanismy transportu proteinů z cytoplazmy do mitochondrií: proteiny s prekurzorovou aminokyselinovou sekvencí a prekurzorové proteiny s interními signály. Proteiny obsahující aminokyselinovou presekvenci utvářejí α – helixy, mající na jedné straně 10 až 80 pozitivně nabitých a na straně druhé 10 až 80 nenabitých hydrofóbních zbytků. Jejich funkcí je nasměrovat proteiny do daného místa, potom jsou odstraněny příslušnou peptidázou. Další skupina jaderně kódovaných mitochondriálních proteinů obsahuje vnitřní signální sekvenci, která je nezbytná pro nasměrování, sestavení a funkčnost finálního proteinu a nejsou odstraňovány [56]. Transportovat lze jen proteiny v primární struktuře. To zajišťují chaperony (HSP 70 a MSF), které se vážou na proteiny hned po jejich syntéze v cytoplazmě a zabraňují jim zaujmout nativní konformaci [57]. Proteiny se pak dále dostávají do mitochondrií pomocí translokátorových proteinů umístěných ve vnější (TOM) a vnitřní (TIM) mitochondriální membráně.

1.3. Pyruvátdehydrogenasový komplex (PDHc)

PDHc je multienzymový komplex zaujímající stěžejní postavení v intermediárním metabolismu, protože katalyzuje nevratnou oxidační dekarboxylaci pyruvátu na acetyl – CoA. Tato reakce spojuje glykolysu s citrátovým cyklem. Energetický stav organismu rozhoduje dále o využití vzniklého acetyl – CoA pro energetické nebo biosyntetické účely (biosyntéza mastných kyselin, ketolátek nebo acetylcholinu). Komplex je lokalizován v matrix mitochondrie, kde je vázán na vnitřní mitochondriální membránu [58].



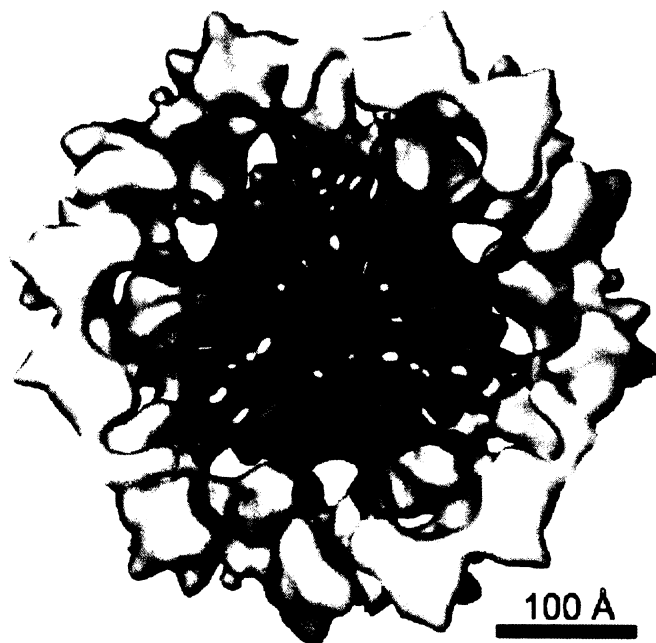
Sled reakcí v PDHc:

PDHc je složen z mnoha nekovalentně vázaných podjednotek: podjednotky E1 – pyruvátdehydrogenasy, podjednotky E2 – dihydrolipoylacetyltransferasy a podjednotky E3 – dihydrolipoyldehydrogenasy. Nezbytnou součástí komplexu jsou koenzymy a prostetické skupiny: thiaminpyrofosfát (TPP), FAD, NADH a lipoamid (lipoová kyselina a lyzin). Tyto 3 podjednotky postupně katalyzují přeměnu pyruvátu na acetyl koenzym A složenou z 5 kroků:

1. V prvním reakčním kroku se pyruvát naváže svou karbonylovou skupinou na reaktivní atom uhlíku TPP, dojde k jeho dekarboxylaci pyruvátdehydrogenasou (podjednotka E1) a vzniku hydroxy – ethyl – TPP.
2. V druhém kroku je hydroxyethylová skupina oxidována a současně přenesena na lipoamid za vzniku acetyl – dihydrolipoamidu, reakce je katalyzována pyruvátdehydrogenasou (podjednotka E1).
3. Dále dihydrolipoylacetyltransferasa (podjednotka E2) katalyzuje přenos acetylové skupiny na CoA, vznikne acetyl – CoA a dihydrolipoamid.
4. V závěrečné fázi dojde k reoxidaci redukované formy lipoamidu reakcí s FAD.
5. Vzniklý FADH₂ se zpětně přemění na FAD přenosem vodíků na NAD⁺. Poslední dvě reakce jsou katalyzované dihydrolipoyldehydrogenasou (podjednotka E3).

Struktura PDHc:

Pyruvátdehydrogenasový komplex izolovaný z hovězího srdce má molekulovou hmotnost $7,8 \times 10^6$ a je složen z 6 částí: E1, E2, E3 (katalytické centrum enzymu), vazebného proteinu E3 – BP (dříve označován jako protein X) a dvou regulačních enzymů fosfatasy a kinasy. Vnitřní kostru enzymu tvoří šedesát podjednotek E2 strukturálně uspořádaných do pentagonálního dvanáctistěnu, ke kterému jsou nekovalentními interakcemi vázány podjednotky E1 a E3. E1 podjednotky tvoří „obláčkovitou“ strukturu kolem jádra a E3 podjednotky jsou umístěny v pórech vnitřní kostry společně s E3 – BP (obr. 1.9, str. 24) [59]. Podjednotka E1 je složena z dvou polypeptidových řetězců α a β uspořádaných do tetramerů $\alpha_2\beta_2$. Podjednotka E3 je dimer obsahující dvě molekuly FAD a protein E3 – BP pravděpodobně zajišťující stabilizaci vazby k podjednotce E2 .



obr. 1.9 Model příčného řezu PDHc, E3 (červeně), E2 centrum (zeleně), E1 (žlutě), vazba mezi E1 a E2 (modře), průměr enzymu je 100 Å (převzato z [59])

Regulace PDHc:

Rychlost reakcí probíhající v PDHc ovlivňuje nezvratná přeměna pyruvátu na CO_2 , acetát a redukční ekvivalenty. Tato reakce je katalyzována α řetězcem podjednotky E1.

Acetát a redukční ekvivalenty jsou dále přeneseny v aktivních centrech E2 a E3 podjednotek na konečné akceptory CoA a NAD^+ , tyto podjednotky jsou zároveň místem kontroly celkové aktivity PDHc (obsahují regulační enzymy kinasu a fosfatasa) [60]. PDH kinasa snižuje celkovou aktivitu PDHc fosforylací serinových zbytků E1 podjednotky, PDH fosfatasa zvyšuje aktivitu komplexu PDH hydrolýzou fosforylovaných serinových zbytků. Zvýšený poměr NADH/NAD^+ , ATP/ADP a acetyl – CoA/CoA zvyšuje aktivitu PDH kinasu s následným poklesem enzymové aktivity E1 podjednotky a celého PDH komplexu. Naopak, sníží – li se poměry těchto metabolitů, aktivita PDHc opět vzroste. Přejít mezi aktivní a inaktivní formou PDH je dynamický proces, který vede k nastolení stacionárního stavu, během kterého se mění obsah fosforylované podjednotky E1 pyruvátdehydrogenasového komplexu v závislosti na změnách koncentrace efektorů obou regulačních enzymů, kterými jsou především Mg^{2+} , Ca^{2+} a pyruvát.

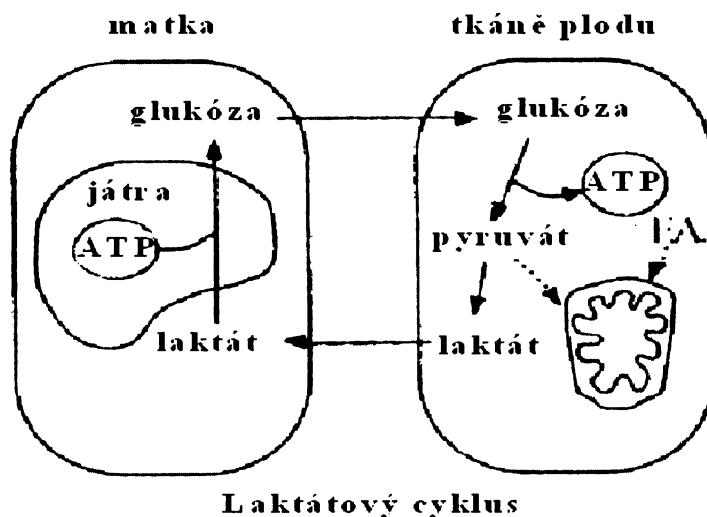
1.4. Játra a jejich vývoj

Játra jsou ústředním orgánem intermediárního metabolismu lidského těla, který je naprosto nezbytný pro život. Projde jimi za minutu asi 1500 ml krve a mají krevní oběh jak funkční tak nutriční. Anatomickou jednotkou jater je jaterní lalůček, v játrech je celkově asi 100 – 150 tisíc lalůčků. Funkce jater je mnohočetná. Zasahují do metabolismu proteinů (syntéza plazmatických bílkovin), cukrů (regulace sacharidového metabolismu) a tuků (produkce žluči, podíl na metabolismu cholesterolu produkcí VLDL a HDL). Významná je jejich detoxikační (obsahují Kupfferovy buňky) a termoregulační funkce (produkce tepla – důsledek vysoké metabolické aktivity). Slouží jako rezervoár některých látek (ferritin, glykogen, vitamín B). Probíhá zde tvorba močoviny v ornitinovém cyklu, syntéza hemokoagulačních faktorů a produkce hormonu somatomedinu.

Játra společně se žlučníkem a systémem žlučových cest začínají vznikat začátkem čtvrtého týdne gestace, kdy se z vychlípeniny předního střeva vytvoří jaterní pupen. Jaterní pupen pak prorůstá do masy mezodermy (*septum transversum*). Vazivová, hemopoetická tkáň a Kupfferovy buňky vznikají z mezenchymu. Játra rychle rostou a mezi 5. – 10. týdnem vyplňují velkou část dutiny břišní. V 6. týdnu gestačního stáří se objevuje hemopoeza. Tím se vysvětluje červené zbarvení jater a jejich velká velikost mezi 7. – 9. týdnem. V tomto období je hmotnost jater až 10 % celkové hmotnosti plodu. Hemopoetická aktivita jaterní tkáně, tvorba krevních buněk (červených a bílých krvinek), je během posledních dvou měsíců nitroděložního vývoje přenechávána kostní dřeni. Játra pak tvoří jen 5 % celkové hmotnosti plodu. Játra si sice hemopoetickou funkci zachovávají, ale její podíl je zanedbatelný. Další důležitá funkce jater začíná ve dvanáctém týdnu, kdy jaterní buňky začínají tvořit žluč.

1.5. Vývoj mitochondriálního energetického metabolismu

Vývoj OXPHOS je orgánově specifický a probíhá pozvolna během celého gestačního období. Největší změny proběhnou pravděpodobně krátce před narozením a bezprostředně po něm [61], kdy dochází k zvýšené proteosyntéze a následně i nárůstu aktivit enzymů OXPHOS. V organismu plodu je většina ATP získávána, na rozdíl od dospělého jedince, anaerobní glykolysou. Výsledný produkt glykolysy – pyruvát není PDHc přeměněn na acetyl – CoA a nevstupuje do citrátového cyklu, ale je přeměněn na laktát. Většina laktátu je pak krevním oběhem dopravena do jater nebo ledvin matky, kde se přemění glukoneogenezí zpět na glukosu, která je zpět dopravena do krevního oběhu plodu. Tento cyklus se nazývá Coriho cyklus (obr. 1.10). To, že je pyruvát majoritně přeměňován na laktát, je pravděpodobně způsobeno menším počtem mitochondrií, jejich nedostatečnou zralostí a v neposlední řadě sníženou dostupností O_2 [61]. Ještě na konci gestačního období je ATP produkováno anaerobní glykolysou v poměru 9:1 ke oxidační fosforylaci. V postnatálním období 90 % ATP vzniká na vnitřní mitochondriální membráně, ale během fetálního vývoje OXPHOS nehraje stěžejní roli v produkci energie.



obr. 1.10. Schéma laktátového (Coriho) cyklu, (převzato z [61])

Během fetálního vývoje je hlavním zdrojem energie glukosa. Po narození je glukosa částečně nahrazována tuky a na konci prvního týdne života je energie získávána: 39 % z glukózy, 53 % z tuků a jen 8 % z proteinů [62]. Bezprostředně po porodu dochází k přeměně anaerobního metabolismu na aerobní, v prvních hodinách života prudce klesá koncentrace laktátu v krvi a prvních dnech života stoupá počet mitochondrií v buňce a stoupá i jejich aktivita [63]. Proliferace a diferenciací mitochondrií nejsou současně probíhající procesy. K proliferaci mitochondrií dochází během celého fetálního vývoje, ale diferenciací mitochondrií probíhá pravděpodobně nejmasivněji až bezprostředně po narození. Rychlost tvorby proteinů je přibližně stejná bez rozdílu jejich genetického původu. Intenzita produkce ATP v OXPHOS ve fetálních mitochondriích není stejně účinná jako u novorozenců nebo dospělých jedinců. Může to být způsobeno nejen nedostatečnou koncentrací proteinů $F_1 - ATPasy$, ale také nízkou koncentrací adenin nukleotidů v matrix. Koncentrace proteinů $F_1 - ATPasy$ a adenin nukleotidů naroste na normální hodnoty bezprostředně po narození [63]. Jiná teorie tento fakt vysvětluje tak, že ve fetálním období je vnitřní mitochondriální membrána volně propustná pro protony a nemůže se tak vytvořit elektrochemický potenciál [64, 65]. Také vývoj a aktivita mitochondriální PDHc nejvíce probíhá bezprostředně po narození.

2. CÍL PRÁCE

Fetální období je charakterizováno rozsáhlou kaskádou vývojových stádií, která jsou kontrolována genetickými faktory i vlivy zevního prostředí. Řada nemocí v novorozeneckém období je sekundárního původu zapříčiněná nezralostí tkání či organel. Také nedostatečná maturace mitochondriálního energetického systému u novorozenců s nízkou porodní hmotností může výrazně ovlivnit novorozeneckou morbiditu. Přitom diagnostika „primárních“ či „sekundárních“ poruch mitochondriálních funkcí a jejich vzájemné odlišení je více než obtížná.

Cílem naší studie bylo analyzovat aktivity komplexů dýchacího řetězce, citrátsyntasy a pyruvátdehydrogenasy, množství a složení komplexů dýchacího řetězce, ATP syntasy a pyruvátdehydrogenasy v jaterní tkáni různého gestačního stáří.

Specifické cíle práce, která byla zaměřena na studium mitochondriálních funkcí ve vzorcích jaterní tkáně od potracených plodů byly:

1. Izolovat mitochondriální frakci z jaterní tkáně extrémně nezralých plodů.
2. Stanovit aktivity enzymů dýchacího řetězce a citrátsyntasy.
3. Stanovit aktivity pyruvátdehydrogenasy.
3. Provést proteinovou analýzu komplexů dýchacího řetězce, ATP syntasy a pyruvátdehydrogenasy.
4. Stanovit množství mtDNA v jednotlivých vzorcích jaterní tkáně.
5. Analyzovat úroveň hemopoeze v jednotlivých vzorcích jaterní tkáně od potracených plodů různého gestačního stáří ve vztahu k mitochondriálním funkcím.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. CHEMIKÁLIE, MATERIÁL A PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ

3.1.1. Seznam použitých chemikálií, protilátek

AcCoA	Sigma, USA
Akrylamid	Sigma, USA
Aminokapronová kyselina	Sigma, USA
Ammonium persulfate	Sigma, USA
Aprotinin	Sigma, USA
Antimycin	Sigma, USA
APS	Sigma, USA
ATP	Sigma, USA
BCS	Amersham Bioscience, USA
Bisakrylamid	Sigma, USA
Bis – tris	Sigma, USA
Borohydrid draselný (KBH ₄)	Sigma, USA
Bredfordové činidlo (Protein Assay)	Bio – Rad, USA
BSA	Sigma, USA
Coomassie Brilliant Blue G	Sigma, USA
Cytochrom <i>c</i> oxidovaný	Sigma, USA
Dihydrogen fosforečnan draselný	Merck, ČR
DTT	Sigma, USA
DCPIP	Sigma, USA
decylubichinon (Q ₁₀)	Sigma, USA
DTNB	Sigma, USA
EDTA	Sigma, USA
ethanol	PENTA, ČR
Glycin	Sigma, USA
Chlorid draselný	PENTA, ČR

Chlorid sodný	PENTA, ČR
Chlorid vápenatý (dihydrát)	Sigma, USA
Chloroform	PENTA, ČR
Kyanid draselný	Sigma, USA
Kyselina chlorovodíková	Lachema a.s., ČR
Kyselina octová	PENTA, ČR
L – karnitin	Sigma, USA
LM	Sigma, USA
Malonát sodný	Sigma, USA
Master Mix DyNAmo™ HS SYBR® Green	Finenzime, Finsko
Merkaptoetanol	Sigma, USA
Metanol	PENTA, ČR
Mléko sušené odtučněné (Laktino)	Promil, ČR
NADH	Sigma, USA
OAA	Sigma, USA
PMSF	Sigma, USA
Primární monoklonální protilátky	Mitosciences, USA
Primery (viz množství mtDNA)	Generi Biotech, ČR
Pyruvát [1 – ¹⁴ C]	Amersham Bioscience, USA
Rotenon	Sigma, USA
SDS	Sigma, USA
See blue Plus2 Pre – Stained Standard	Invitrogen, USA
Sekundární anti – mouse protilátka (A8924)	Sigma, USA
Serva blue G	SERVA, Německo
Silver Sequence DNA staining reagents	Promega, USA
Síran draselný (heptahydrát)	Penta, ČR
Sukcinát disodný	Sigma, USA
Super SignalWest Femto Maximum Sensitivity substrate	Pierce, USA
TEMED	SERVA, Německo
Tricin	Sigma, USA
TriReagent	MRC, USA
Tris	Sigma, USA

Tween 20	Sigma, USA
TCA	PENTA, ČR

Všechny použité chemikálie dosahovaly analytické čistoty.

3.1.2. Přístrojové vybavení

analytické váhy	Scaltec, USA
automatické pipetmany	Eppendorf, USA
β – counter – liquid scintillation analyzers, 2500 TR	Packard USA
blotovací přístroj Panther	Owl, USA
centrifuga UNIVERSAL 32 R	Hettich Zentrifugen, Německo
elektroforetický zdroj POWER PAC 1000	Bio – Rad, USA
homogenizátor Potter – Elvehjem, teflon sklo	
hybridizační pec SI20H	Stuart Scientific, Velká Británie
pH – metr 744	Metrohm, Švýcarsko
minicentrifuga	Wealtec, USA
mrazicí box (– 80°C)	Sanyo, Japonsko
Nanodrop	Nanodrop Technologies, USA
Real – time PCR Chromo 4	Bio – Rad, USA
spektrofotometr UV – 240 1 PC	Shimadzu, Japonsko
sušička gelu Whatman	Biometra Německo
termostat	Techne, Velká Británie
Versa – doc 4000 imagine system	Bio – Rad, USA
vertikální elektroforéza Mini Protean 3	Bio – Rad, USA
Vortex Genie 2	Scientific Industries, USA
Vyhřívací plotna/míchadlo Velp	Scientifica, Itálie

Pro všechny experimenty bylo používáno laboratorní sklo (Simax) a plast (Axygen, USA; Eppendorf, Německo; Gilson, USA; TPP, Švýcarsko).

3.1.3 Biologický materiál

Materiál:

Studovaný soubor tvořilo 20 vzorků jaterní tkáně získané po potratu nezralých plodů v gestačním stáří 12 – 28 týdnů (tab. 3.1). Vzorky byly odebrány, po informovaném souhlasu těhotné ženy, lékařem na gynekologii bezprostředně po spontánním potratu nebo potratu z lékařské indikace (vývojové vady, trizomie 21 chromozomu) .

tab. 3.1. Přehled vzorků fetální jaterní tkáně

vzorek jaterní tkáně	gestační stáří [týdny + dny]	provedená analýza
J1	12	S, PDH, W
J2	16	S, PDH
J3	16+2	S, PDH, W, HA
J4	16+4	S, PDH, mtDNA
J5	17	S, PDH,
J6	17+4	S, PDH, W
J7	18	S, PDH, W, mtDNA
J8	18+2	S, PDH, W, HA
J9	19+2	S, PDH
J10	19 + 4	S, PDH, W
J11	20+1	S, PDH
J12	20+3	S, PDH
J13	20+5	S, PDH, W, mtDNA
J14	21	S, PDH, W, mtDNA
J15	21+3	S, PDH, W, mtDNA
J16	22+2	S, PDH, W

vzorek jaterní tkáně	gestační stáří [týdny + dny]	provedená analýza
J17	23	S, PDH
J18	23+2	S, PDH, mtDNA, HA
J19	25+4	S, PDH, W, mtDNA
J20	28+3	S, PDH, W, BN+2D, mtDNA

BN+2D – „Blue Native“ elektroforéza a dvojrozměrná SDS – PAGE elektroforéza

HA – histologická analýza

mtDNA – kvantifikace mtDNA

PDH – katalytické stanovení aktivity PDHc

S – spektrofotometrické stanovení enzymových aktivit OXPHOS a CS

W – western blot

Kontrolní skupiny:

Kontrolní soubor tvořily vzorky jaterní tkáně od dětí, které zemřely ve věku 14 dní – 8 let, a ve kterých postmortální vyšetření neprokázalo mitochondriální onemocnění. Vzorky byly odebrány při autopsii do 2 hodin po úmrtí. Odběry byly provedeny po informovaném souhlasu rodičů.

1. Pro spektrofotometrické stanovení enzymových aktivit a měření katalytické aktivity PDH byl použit soubor vzorků jaterní tkáně dětí, které zemřely ve věku 14 dní – 8 let.
2. Pro Blue Native byl použit vzorek jaterní tkáně dítěte, které zemřelo ve věku 14 dní.
3. Pro western blot byl použit kontrolní vzorek jaterní tkáně dítěte, které zemřelo ve věku 2 měsíců.
4. Pro kvantifikaci mtDNA byl použit vzorek jaterní tkáně dítěte, které zemřelo ve věku 1 měsíc.
5. Pro histologickou analýzu byl použit vzorek jaterní tkáně dítěte, které zemřelo ve věku 3 měsíců.

3.2. METODY

3.2.1. Odběr tkáně

Excize jater a odběr jaterní tkáně při autopsii (pitvě) od dětí které zemřely a plodů po potratu, byly provedeny lékaři nejpozději do 2 hodin po úmrtí nebo do 45 minut po abortu. Vzorky byly okamžitě zmrazeny v tekutém dusíku a do doby

homogenizace skladovány při teplotě – 80 °C. Vzorčky pro elektronmikroskopickou analýzu byly odebrány do 10 % paraformaldehydu.

3.2.2. Izolace mitochondrií z jaterní tkáně

5 % homogenát jaterní tkáně v STE mediu (0,25 M sacharosa, 10 mM TRIS – HCl, 2 mM EDTA a inhibitory proteas: 0,3 μM aprotinin a 0,4 μM PMSF, pH 7,4) vznikl roztříháním tkáně na malé kousky a následnou homogenizací v Potter – Elvehjemově homogenizátoru teflon – sklo. Homogenizace byla provedena na ledu a všechny používané nástroje byly předchlazené. Z homogenátu bylo odebráno cca 30 μl na stanovení proteinu (a spolu s mitochondriální frakcí zmraženo). 150 – 200 μl bylo použito na spektrofotometrické měření enzymových aktivit (uchováno při 4 °C a ještě tentýž den měřeno). Získaný homogenát byl centrifugován 10 minut při 600 x g, 4 °C a filtrován přes nylonovou síťku. Peletka byla suspendována v STE media (polovina objemu původně použitého na přípravu homogenátu) a suspenze centrifugována opět 10 minut při 600 x g, 4 °C a filtrována k již připravenému supernatantu. Takto byla odstraněna jádra a nehomogenizované buňky. Supernatant byl dále centrifugován při 10 000 x g 10 minut, 4 °C. Peletka byla rozsuspendována v 100 – 200 μl STE média a znovu stočena při 10 000 x g, 10 minut, 4 °C. Takto promytá mitochondriální frakce byla rozsuspendována ve STE mediu (25 μl na 100 mg vlhké tkáně). Výsledná koncentrace proteinu se ve frakci izolovaných mitochondrií pohybovala přibližně kolem 20 mg/ml. Mitochondriální frakce byla pipetována do „eppendorfek“ po 10 μl a skladována při – 80 °C, 30 μl bylo odebráno na spektrofotometrické měření enzymových aktivit a ještě ten den použito.

3.2.3. Stanovení koncentrace proteinu

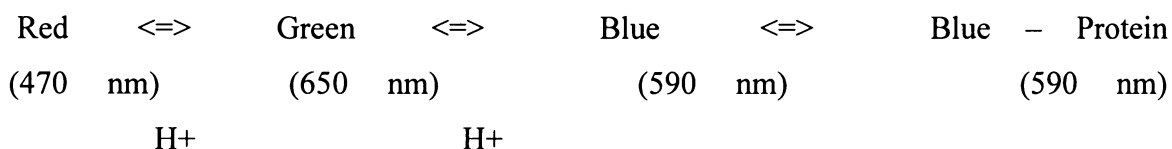
3.2.3.1. Lowryho metoda

Protein v homogenátu a v mitochondriální frakci pro spektrofotometrické měření enzymových aktivit a stanovení katalytické aktivity PDH komplexu byl stanoven Lowryho metodou [66]. Metoda využívá Folinova činidla modifikovaného přidáním měďnatých solí, které s bílkovinami a látkami obsahujícími fenolické skupiny tvoří komplexy modré barvy

(wolframová a molybdenová modř). Intenzita modrého zbarvení byla měřena spektrofotometricky ($\lambda = 700 \text{ nm}$) proti slepému pokusu a odpovídá množství proteinu. Koncentrace proteinu byla vypočítána z lineární kalibrační křivky.

3.2.3.2. Metoda podle Bradfordové

Metoda Bradfordové byla použita pro stanovení koncentrace proteinu u vzorků pro Tricin – SDS – PAGE a nativní elektroforézu. Metoda je založena na rovnovážných stavech mezi třemi formami barviva Coomassie Brilliant Blue. V silně kyselých podmínkách je barvivo nejstabilnější v dvouprotonované červené formě, ale po navázání na protein se mění na neprotonovanou modrou formu [67].



Intenzita modrého zbarvení odpovídá množství proteinu a byla měřena spektrofotometricky ($\lambda = 590 \text{ nm}$) proti slepému pokusu. Koncentrace proteinu byla vypočítána z lineární závislosti kalibrace.

3.2.4. Spektrofotometrické stanovení aktivit enzymů dýchacího řetězce

Aktivity enzymů byly stanoveny spektrofotometricky, sledováním změny absorbance při oxidaci nebo redukci substrátu přímo nebo ve spřažení s další reakcí. Všechna měření byla provedena při $37 \text{ }^\circ\text{C}$ v kyvetách o optické dráze 1 cm na spektrofotometru. Aktivity enzymů dýchacího řetězce a citrát syntasy byly stanovovány v mitochondriální frakci a v homogenátu (jen COX a CS) izolované z jaterní tkáně v den izolace. Výsledná aktivita byla vypočtena z průměru dvou naměřených hodnot podle vzorce:

$$\text{SA} = (\text{dA} / \epsilon * \text{v} * \text{c}) * 10^6 \quad [\text{nmol/min/mg proteinu}]$$

dA – aritmetický průměr z obou naměřených hodnot

ϵ – molární absorbní koeficient $\text{dm}^3/\text{cm}/\text{mol}$

v – objem vzorku v μl

c – koncentrace proteinu ve vzorku v mg/ml

Specifická aktivita (SA) je vztažena na množství proteinu ve vzorku, je vyjádřena v nmol/min/mg proteinu.

3.2.4.1. Stanovení specifické aktivity citrátsyntasy (CS)

zásobní roztoky: DTNB (1 mM v Tris/HCl, pH 8,1), Ac CoA (10 mM), LM 15 %, OAA (10 mM v Tris/HCl, pH 8,1)

reakce: Acetyl – CoA + oxalacetát + H₂O → citrát + HSCoA

Specifická aktivita citrátsyntasy byla stanovena měřením rychlosti tvorby volného koenzymu A (CoASH) pomocí DTNB [68]. Průběh reakce je sledován jako vzestup absorbance při 412 nm. Reakční směs o výsledném objemu 1 ml obsahovala: 0,1 mM DTNB, 0,5 mM AcCoA, 0,5 mM OAA a 20 μl homogenátu/1 μl mitochondriální frakce. Před odstartováním reakce přidáním 50 μl oxalacetátu byla změřena absorbance pozadí (60 s). Nárůst absorbance byl měřen po dobu 60 – 120 s. Výsledná aktivita byla vypočtena odečtením absorbance pozadí podle výše uvedeného vzorce z průměru obou naměřených hodnot, k výpočtu byl použit molární absorpční koeficient (ε) (pro DTNB) 13,6 * 10³ dm³/cm/mol.

3.2.4.2. Stanovení specifické aktivity NADH: koenzym Q oxidoreduktasy (komplex I)

zásobní roztoky: TRIS (1 M, pH 8,1), BSA 10 %, decylubichinon (50 mM v 96 % ethanolu), KCN (0,1 M), NADH (10 mM), rotenon (1 mg/ml)

reakce: NADH + H⁺ + Q₁₀ → NAD⁺ + H₂Q₁₀

Aktivita komplexu I byla sledována jako změna poklesu absorbance při 340 nm po dobu 60 s z důvodů oxidace NADH za použití decylubichinonu jako akceptoru elektronů [69]. Reakce probíhá opět nejprve bez přítomnosti rotenonu, po jeho přidání dojde k blokaci aktivity mitochondriální rotenon senzitivní NADH: koenzym Q reduktasy. Reakční směs o výsledném objemu 1 ml obsahovala: 50 mM TRIS, 1 μl mitochondriální frakce, BSA

2,5 mg/ml, 0,3 mM KCN, 50 μ M Q. 1 μ l mitochondriální frakce bylo solubilizováno v hypotonickém prostředí (H_2O) po dobu 180 s při laboratorní teplotě. Po přidání všech substrátů byla reakce startována 0,1 mM NADH a po 60 s inhibována přidáním 50 μ M rotenonu a měřena dalších 60 s. Aktivita rotenon senzitivní mitochondriální frakce byla vypočtena odečtením aktivity po přidání rotenonu od celkové aktivity bez inhibice rotenonem. Výsledná aktivita rotenon senzitivní mitochondriální NADH dehydrogenasy byla vypočtena z průměru obou naměřených hodnot podle výše uvedeného vzorce. Molární absorpční koeficient (ϵ) pro tuto reakci (pro NADH) byl $6,22 \cdot 10^6 \text{ dm}^3/\text{cm}/\text{mol}$.

3.2.4.3. Stanovení specifické aktivity NADH: cytochrom *c* oxidoreduktasy (komplex I + III)

zásobní roztoky: TRIS (1 M, pH 8,1), BSA 10 %, cytochrom *c* oxidovaný (1 mM v 25 mM KH_2PO_4 , pH 7,4), KCN (0,1 M), NADH (10 mM), rotenon (1 mg/ml)

reakce: $NADH + 2 \text{ cytochrom } c^{+3} \rightarrow NAD^+ + H^+ + 2 \text{ cytochrom } c^{+2}$

Pro stanovení aktivity mitochondriální NADH: cytochrom *c* reduktasy dýchacího řetězce se využívá její senzitivity k rotenonu. Byl změřen nárůst absorbance při 550 nm po dobu 60 s bez přidání rotenonu a pokles nárůstu absorbance po přidání rotenonu [69]. Hodnota enzymové aktivity komplexu I+III je rozdíl nárůstu absorbance a nárůstu absorbance po přidání rotenonu. Reakční směs o výsledném objemu 1ml obsahovala: 50 mM TRIS, 1 μ l mitochondriální frakce, BSA, 2,5 mg/ml, 40 μ M cytochrom *c* (oxidovaný), 2 mM KCN.

1 μ l mitochondriální frakce bylo solubilizováno v hypotonickém prostředí (H_2O) po dobu 180 s. Po přidání všech substrátů byla reakce startována přidáním 0,1 mM NADH, změřena aktivita a bezprostředně inhibována přidáním 50 μ M rotenu. Hodnota byla dosazena do výše uvedeného vzorce, byl použit molární absorpční koeficient (ϵ) $19,6 \cdot 10^6 \text{ dm}^3/\text{cm}/\text{mol}$.

3.2.4.4. Stanovení specifické aktivity sukcinát: koenzym Q oxidoreduktasy (komplex II)

zásobní roztoky: EDTA (80 mM), BSA 10 %, rotenon (1 mg/ml), sukcinát (1 M), ATP (200 mM), KCN (0,1 M), DCPIP (80 mM), Antimycin (1 mg/ml), decylubichinon (50 mM v 9 % ethanolu)

reakce: Sukcinát + DCPIP (ox) → fumarát + DCPIP (red)

Aktivita komplexu II dýchacího řetězce byla stanovena jako změna absorbance při 600 nm po dobu 180 s vlivem přeměny ubichinonové formy DCPIP na ubichinolovou [69].

Reakční směs o výsledném objemu 1 ml obsahovala: 10 mM KH_2PO_4 , 2 mM EDTA, 1 mg/ml BSA, 1 μl mitochondriální frakce, 3 μM rotenon, 10 mM sukcinát, 0,2 mM ATP, 0,3 mM KCN, 80 μM DCPIP, 1 μM antimycin. Reakce byla startována přidáním 50 μM decylubichinonu. Výsledná aktivita byla vypočtena podle výše uvedeného vzorce z průměru obou získaných hodnot, k výpočtu byl použit molární absorpční koeficient (ϵ) $20,1 \cdot 10^6 \text{ dm}^3/\text{cm}/\text{mol}$

3.2.4.5. Stanovení specifické aktivity sukcinát: cytochrom c oxidoreduktasy (komplex II+III)

zásobní roztoky: KH_2PO_4 (1 M pH 7,8), EDTA (80 mM), BSA 10 %, rotenon (1 mg/ml), sukcinát (1 M), ATP (200 mM), KCN (0,1 M), cytochrom c oxidovaný (1 mM)

reakce: 2 cytochrom c^{+3} + sukcinát → 2 cytochrom c^{+2} + fumarát

Průběh reakce byl sledován jako nárůst absorbance při 550 nm v důsledku redukce oxidovaného cytochromu c po dobu 180 s [69]. Reakční směs o výsledném objemu 1 ml obsahovala: 50 mM KH_2PO_4 , 2 mM EDTA, 1 mg/ml BSA, 3 μM rotenon, 10 mM sukcinát, 0,2 mM ATP, 0,3 mM KCN. 1 μl mitochondriální frakce bylo solubilizováno v hypotonickém prostředí (H_2O) po dobu 180 s. Reakce byla startována přidáním 40 μM oxidovaného cytochromu c . Výsledná aktivita byla vypočtena podle výše uvedeného vzorce z průměru obou získaných hodnot, k výpočtu byl použit molární absorpční koeficient (ϵ) $19,6 \cdot 10^6 \text{ dm}^3/\text{cm}/\text{mol}$.

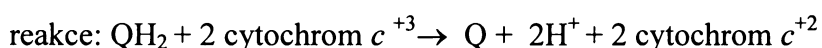
3.2.4.6. Stanovení specifické aktivity ubichinol: cytochrom *c* oxidoreduktasy (komplex III)

3.2.4.6.1. Příprava decylubichinolu

250 μ l 10 mM roztoku decylubichinonu v 96 % ethanolu bylo okyseleno 5 μ l 0,1 M HCl a redukováno přidáním 2 – 4 zrněk tetrahydroboritanu draselného. Reakce byla doprovázená změnou barvy ze žluté na bezbarvou. Nadbytečné množství redukčního činidla bylo odstraněno 5 μ l 1M HCl. Zásobní roztok 10 mM decylubichinolu byl uchováván při -80°C .

3.2.4.6.2. Stanovení aktivity ubichinol: cytochrom *c* oxidoreduktasy

zásobní roztoky: KH_2PO_4 (1 M, pH 7,8), EDTA (80 mM), BSA 10 %, rotenon (1 mg/ml), sukcinát (1 M), ATP (200 mM), KCN (0,1 M), cytochrom *c* oxidovaný (1 mM), malonát (1 M), decylubichinol (10 mM)



Průběh reakce byl sledován jako nárůst absorpance při 550 nm v důsledku redukce oxidovaného cytochromu *c* [69]. Reakční směs o výsledném objemu 1ml obsahovala: 50 mM KH_2PO_4 , 2 mM EDTA, 1mg/ml BSA, 3 μ M rotenon, 10 mM sukcinát, 0,2 mM ATP, 0,3 Mm KCN. Reakce byla startována 40 μ M cytochrom *c* oxidovaný a po 60 s inhibována po dobu 60 s (bez měření aktivity) 5 μ l malonátu, a následně startována přidáním 5 μ l decylubichinolu. Výsledná aktivita byla vypočtena podle výše uvedeného vzorce z průměru obou získaných hodnot, k výpočtu byl použit molární absorpční koeficient (ϵ) $19,6 \cdot 10^6 \text{ dm}^3/\text{cm}/\text{mol}$.

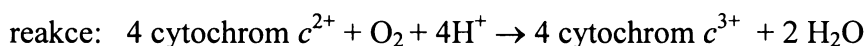
3.2.4.7. Stanovení specifické aktivity cytochrom *c* oxidasy (komplex IV)

3.2.4.7. 1. Příprava redukováného cytochromu *c*

Byl připraven 1 mM roztok cytochromu *c* (beef heart, type IV, Sigma) v 30 mM KH₂PO₄ (pH 7,5) a zredukován malým množstvím dithioničitanu sodného. Zbytky nezreagovaného dithioničitanu sodného byly od zredukováného cytochromu *c* odstraněny gelovou filtrací na koloně Sephadexu G – 25. Spektrofotometricky byla změřena koncentrace cytochromu *c* a upravena na 1mM. Zásobní roztok byl skladován při – 25°C.

3.2.4.7. 2. Stanovení aktivity specifické aktivity cytochrom *c* oxidasy

zásobní roztoky: KH₂PO₄ (1 M, pH 7,0), BSA (10 %), cytochrom *c* redukováný (1 mM), LM (15 %)

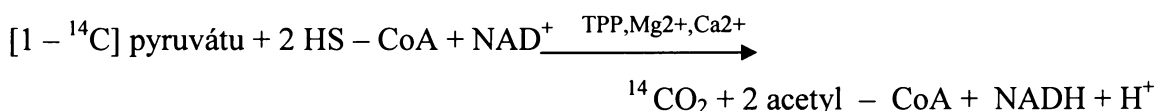


Specifická aktivita cytochrom *c* oxidasy byla stanovena jako pokles absorbance při 550 nm vlivem úbytku redukováného cytochromu *c* v reakční směsi [69].

Reakční směs o výsledném objemu 1 ml obsahovala: 10 mM KH₂PO₄ (pH 7,0), 25 μM redukováný cytochrom *c*. Reakce byla startována přidáním 20 μl homogenátu/1 μl mitochondriální frakce, pokles absorbance byl sledován po dobu 60 s. Výsledná aktivita byla vypočtena podle výše uvedeného vzorce z průměru obou získaných hodnot, k výpočtu byl použit molární absorpční koeficient (ϵ) $19,6 \cdot 10^6 \text{ dm}^3/\text{cm}/\text{mol}$

3.2.5. Stanovení katalytické aktivity pyruvátdehydrogenasového komplexu (PDH)

Celková katalytická aktivita PDH komplexu byla stanovena měřením rychlosti tvorby ¹⁴CO₂ při oxidační dekarboxylaci [1 – ¹⁴C] pyruvátu metody dle [70, 71].



tab. 3.2 Použité roztoky k stanovení aktivity PDH

		zásobní roztoky	C v reakční směsi
směs	Tris – HCl	168mM	75mM
	EDTA	80mM, pH 7,8	0,5mM
	MgSO ₄ *7 H ₂ O	50mM	4 mM
	CaCl ₂ *2H ₂ O	40mM	2mM
	L – karnitin	0,25M	7,5mM
kofaktory	TPP	8mM	1mM
	CoA	16mM	2mM
	NAD ⁺	50mM	1,5 mM
	[1 – ¹⁴ C] pyruvát	50 mM	0,5 mM

Vzorek na stanovení katalytické aktivity PDH komplexu a na stanovení proteinu byl připraven rozsuspendováním 5 µl mitochondriální frakce ve 150 µl STE média (0,25 M sacharosa, 10 mM TRIS – HCl, 2 mM EDTA a inhibitory proteas 10 % aprotinin a PMSF, pH 7,4). Kofaktory byly vždy připraveny čerstvé. Do skleněné lahvičky (objem 1,5 ml) opatřené šroubovacím víčkem s otvorem a vnitřní stranou krytou silikonovým septem bylo pipetováno: směs a kofaktory nebo jen směs a 140 µl H₂O (do „blanku“) a 30 µl vzorku o celkovém objemu 0,5 ml. Pro jímání [¹⁴CO₂] byl v septu víčka umístěn filtrační papírek navlhčený 17 µl 10 % KOH . Každý vzorek byl měřen 4x a ke každému vzorku byl měřen „blank“, bez přidání kofaktorů (kvůli neenzymové dekarboxylaci pyruvátu). Po preinkubaci lahviček (10 minut při 37 °C) byla reakce startována 5 µl (0,5 mM) [1 – ¹⁴C] pyruvátu pomocí stříkačky Hamilton přes silikonové septum. Reakce probíhala za třepání po 20 minut při 37 °C a byla zastavena přidáním 50 µl 50 % kyseliny trichloroctové (TCA). Vznikající [¹⁴CO₂] byl zachytáván na filtrační papírcích namočených během probíhající reakce a následně ještě poté 1 hodinu při 4 °C. Filtrační papírky byly poté přeneseny do nádobek s 5 ml Brayova scintilačního roztoku a proměřeny na scintilačním počítači (Beckman) po dobu 10 minut. Radioaktivita zásobního roztoku [1 – ¹⁴C] pyruvátu použitého pro reakci byla pro kontrolu změřena přímo v 5 ml Brayova scintilačního roztoku.

Specifická katalytická aktivita A_{katal} PDH komplexu byla vypočtena ze vztahu:

$$A_{\text{katal}} = \frac{A_v - A_b}{a_p} \cdot t \cdot m_{\text{PROT}} \quad [\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}] \text{ proteinu}$$

A_v radioaktivita vzorku [DPM]

A_b radioaktivita „blanku“ [DMP]

a_p molární radioaktivita [$1 - {}^{14}\text{C}$] pyruvátu; hodnota radioaktivity vztahovaná na počet molů pyruvátu vnesených do reakční směsi [DPM/nmol]

t [min]

m_{PROT} [mg]

Průměrná aktivita A_{katal} byla odvozena minimálně ze tří stanovení.

3.2.6. Proteinová analýza

„Blue – Native“ polyakrylamidová gelová elektroforéza byla použita pro separaci multiproteinových komplexů při nedenaturačních podmínkách [72].

3.2.6.1. „Blue Native“ elektroforéza

Používané roztoky a pufrы:

Extrakční pufr (2 mM EDTA, 1 M aminokaprová kyselina, 50 % 3 x GB)

vzorkový pufr (pro „Blue Native“)

(5 % w/v Serva blue G – 250, 0,75 M aminokaprová kyselina)

LM (10 % w/v lauryl maltosidu)

3 x GB (1,5 M aminokaprová kyselina, 150 mM Bis – tris, pH 7,0)

ABN (48 % w/v akrylamid, 1,5 % w/v bisakrylamid)

APS 10 % (10 % w/v amonumpersulfát)

Katodový pufr – modrý (0,02 % w/v Serva Blue G – SBG v katodovém pufru bezbarvém: 15 mM Bis – Tris, 50 mM Tricin, pH 7,0)

Katodový pufr – bezbarvý (15 mM Bis – Tris, 50 mM Tricin, pH 7,0)

Anodový pufr (50 mM Bis – Tris, pH 8,9)

Barvicí roztok: (0,025 % w/v Comassie Blue R, 10 % v/v kyselina octová, 30 % v/v metanol)

Odbarvovací roztok: (25 % metanol, 8 % kyselina octová)

Příprava vzorku:

10 μ l mitochondriální frakce (15 – 25 μ g/ μ l) bylo centrifugováno při 10 000g 10 minut při 4°C. Peleta byla rozsuspendována v 80 μ l MB a 12 μ l 10 % LM w/v. Směs byla inkubovaná na ledu 10 minut a následně stočena při 28 000 x g 20 minut při 4°C. Byla stanovena koncentrace proteinu. Bylo přidáno 14 μ l vzorkového pufr (pro „Blue Native“).

Provedení elektroforézy:

Elektroforéza byla prováděna na vertikálním Mini Protean 3. Byl připraven dělicí gel s 6 – 15 % gradientem akrylamidu. Jamky ze 4 % vzorkového gelu byly převrstveny modrým katodovým puffem a naplněny vzorky o celkové koncentraci proteinů nejvíce 10 μ g na jednu dráhu a standartem MW pro kontrolu molekulové hmotnosti. Elektroforéza nejprve probíhala při 40 V, po doputování vzorků do dělicího gelu byl vyměněn modrý katodový pufr za bezbarvý a napětí bylo zvýšeno na 90 V. Gely byly dále barveny a usušeny obvyklým způsobem nebo použity dále pro druhý rozměr.

tab. 3.3 Složení roztoků na „Blue Native“

Složení gelu pro nativní elektroforézu	4 % vzorkový gel (5 ml)	6 % dělicí gel (10 ml)	15 % dělicí gel (10 ml)
3 x GB	1,67 ml	3,3 ml	3,3 ml
ABN	0,4 ml	1,2 ml	3,0 ml
H₂O	2,87 ml	5,44 ml	1,68 ml
Glycerol	0	0	2 ml
AP	60 μ l	60 μ l	10 μ l
TEMED	3 μ l	3 μ l	2 μ l

3.2.6.2. Dvourozměrná elektroforéza

Používané roztoky a pufrы:

3 x GB (3 M Tris/HCl, 0,3 % w/v SDS, pH 8,54)

APS 10 % (10 % w/v amonumpersulfát)

roztok akrylamidu (30 % w/v akrylamid, 0,8 % w/v bisakrylamid)

katodový pufr (100 mM Tris, 100 mM Tricin, 0,1 % w/v SDS, pH 8,25)

anodový pufr (100 mM Tris/HCl, pH 8,9)

2 – LB pufr (1 % SDS, 1 % merkaptetoanol)

fixační roztok (10 % v/w kyselina octová)

roztoky pro vizualizaci 2D (vyvíjející a barvicí) byly použity z komerčního kitu Silver Sequence DNA staining reagents (Promega).

Provedení 2D elektroforézy:

Po ukončení nativní elektroforézy provedené podle výše uvedeného postupu byl gel nařezán na jednotlivé proužky. Ty byly uskladněny v – 20°C nebo ihned použity. Proužek byl inkubován v SD – LB pufru 45 minut a následně propláchnut destilovanou vodou. Připravený proužek byl vodorovně umístěn mezi elektroforetická skla Mini Proteanu 3, tak aby se jeho horní okraj nacházel asi 0,5 cm od horního okraje krátkého skla. Dělicí gel byl nanesen do výšky asi 1 cm pod dolním okrajem proužku a převrstven 1x GB. Po zpolymerování dělicího gelu byl nanesen gel vzorkový a do něj umístěn hřeben s jedním zubem pro standardu. Po ztuhnutí vzorkového gelu byl pipetován standard a sestavena elektroforetická aparatura. Prvních 30 minut probíhala elektroforéza při 50 V a dále už při 100 V. Po ukončení elektroforézy byl gel inkubován asi hodinu v barvicím roztoku a dále promyt destilovanou vodou a následně obarven „stříbrem“.

tab. 3.4 Složení gelu na dvojrozměrnou elektroforézu

složení gelů na SDS – PAGE	vzorkový 4 %gel	dělicí 12 % gel
	5 ml	10 ml
Akrylamid 30,8 T	0,4 ml	2 ml
3 x gelový pufr (GB)	1,2 ml	3,64 ml
H ₂ O	3,36 ml	3,64 ml
glycerol	0	1 ml
APS 10 %	40 μl	50 μl
Temed	4 μl	6 μl

„Stříbření“ gelu:

Nejprve byl gel inkubován 24 hodin v destilované vodě. Potom 20 minut fixován ve fixačním roztoku a následně propláchnut na míchačce 3 x 2 minuty destilovanou vodou. Dále byl gel barven v barvicím roztoku a po uplynutí 30 minut rychle opláchnut vodou. Obarvené gely byly přeneseny na 2 – 5 minut do vyvíjejícího roztoku a po celou dobu byla sledována intenzita. Gel s výslednou barevnou intenzitou byl zafixován ve fixačním roztoku 5 minut. Následně minutu omyt v destilované vodě a usušen ve vakuové sušičce gelů.

3.2.6.3. SDS – PAGE a western blot

3.2.6.3.1 SDS – PAGE

SDS elektroforéza probíhá při denaturačních podmínkách. Navázáním anionogenního tenzidu SDS (1,4 g SDS/g proteinu) je rozrušena sekundární struktura proteinů a proteiny se pak dělí podle molekulové hmotnosti. Systém Tricin – SDS je vhodný zejména pro separaci proteinů o nízké molekulové hmotnosti. V našem případě docházelo k rozdělení komplexů dýchacího řetězce a ATP syntasy na jednotlivé podjednotky.

Používané roztoky a pufrы:

vzorkový pufr 4x

(5,5 M Tris/HCl pH 6,8, 12 % w/v glycerol, 4 % w/v SDS, 0,01 % w/v bromfenolová modř a před použitím přidáný 2 % v/v 2 – merkaptoetanol)

3 x GB (3 M Tris/HCl, 0,3 % w/v SDS, pH 8,54)

APS 10 % (10 % w/v amonumpersulfát)

roztok akrylamidu na SDS – page (30 % w/v akrylamid, 0,8 % w/v bisakrylamid)

Katodový pufr (100 mM Tris, 100 mM Tricin, 0,1 % w/v SDS, pH 8,25)

Anodový pufr (100 mM Tris/HCl, pH 8,9)

Transferový pufr (25 mM Tris, 192 mM glycin, 10 % v/v MeOH, 0,02 % w/v SDS)

TBS (TRIS/HCl, 8 mM NaCl, pH 7,5)

STE médium (0,25 M sacharosa, 10 mM TRIS – HCl, 2 mM EDTA, inhibitory proteas: 0,3 μ M aprotinin a 0,4 μ M PMSF, PMSF, pH 7,4)

„Stripovací“ roztok (2 % SDS w/v, 62,5 mM Tris/HCl, 100 mM 2 – merkaptoetanol – přidán těsně před použitím, pH 6,8)

Příprava vzorků pro Tricin – SDS – PAGE:

5 μ l mitochondriální frakce bylo naředěno STE mediem, solubilizováno ve vzorkovém lyzačním pufru inkubací 30 minut při 37 °C. Výsledná koncentrace proteinu ve vzorku byla 1 – 0,5 mg/ml. Vzorek byl naředěn médiem STE podle již známé koncentrace proteinu pro enzymové měření a byla stanovena přesná koncentrace proteinu ve vzorku.

Tricin – SDS – PAGE:

5 – 10 μ g proteinu bylo rozděleno SDS elektroforézou za použití vertikální elektroforézy Mini Protean 3. Byly použity 4 % (vzorkový) a 12 % (dělicí) polyakrylamidové gely a marker molekulové hmotnosti See Blue plus 2 Pre – Stained Standard. Elektroforéza probíhala při 50 V, po doputování vzorků k separačnímu gelu bylo napětí zvýšeno na 100 V. Po rozebrání aparatury byl gel ihned použit pro Western blot.

tab. 3.4. Složení roztoků na SDS – PAGE

složení gelů na SDS – PAGE	vzorkový 4 %gel	dělicí 12 % gel
	10 ml	20 ml
Akrylamid 30,8 % (AB)	1,3 ml	7,8 ml
3 x gelový pufr (GB)	3,33 ml	6,66 ml
H ₂ O	5,27ml	5,4 ml
APS 10 %	120 μl	140 μl
TEMED	12 μl	14 μl

3.2.6.3.2. Western blot

Po provedení SDS elektroforézy byly gely ekvilibrovány v transferovém pufru na míchačce při laboratorní teplotě 30 – 45 po dobu minut. „Blotovací“ PVDF membrána o velikosti gelu byla aktivována 15 sekund ve 100 % metanolu, dále 2 minuty v dH₂O a následně inkubována na míchačce v Transferovém pufru 15 – 30 minut. Byl nastříhán 6 x filtrační papír (whatman) o velikosti gelu pro každý gel. „Blotovací“ zařízení bylo sestaveno následujícím způsobem: na spodní část „blotovacího“ přístroje (anodovou část) byly pokládány 3 x filtrační papír (whatman) namočený v transferovém pufru, gel, membrána a znovu 3 x filtrační papír (whatman) namočený v transferovém pufru. Při manipulaci s gelem a novou membránou bylo používáno speciální sklo a ostatní pomůcky určené výhradně pro „blotování“, aby nedošlo ke kontaminaci jinými proteiny. „Blotování“ bylo prováděno při konstantním proudu 0,8 – 1 mA/cm² po dobu 60 minut. Gel byl obarven a usušen obvyklým způsobem a sloužil pro kontrolu kvality přenosu proteinů na membránu. Membrána byla usušena při laboratorní teplotě přes noc. Suchá membrána byla buď použita nebo skladována při (– 18 °C).

Imunodetekce:

Inkubace membrány byly prováděny na míchačce při laboratorní teplotě. Usušená membrána byla aktivována ve 100 % metanolu, opláchnuta 2 x 10 minut v TBS a inkubována 60 – 120 minut v 10 % (w/v) odtučněném mléku rozpuštěném v TBS. Membrána se zablockovanými volnými vazebnými místy byla opláchnuta 1, 5, 10 a 15 minut v TBS a následně byla inkubována s primární protilátkou 60 – 120 minut. Primární

protilátka byla pipetována sterilními špičkami do 14 – 20 ml 1 % (w/v) mléka v TBS s 0,1 % (v/v) Tween 20. Nenavázaná primární protilátka byla z membrány odstraněna opláchnutím 1, 5, 10 a 15 minut v TBS s 0,1 % (v/v) Tween 20 a membrána byla inkubována se sekundární protilátkou 60 minut. Roztok sekundární protilátky byl připraven pipetováním 10 µl protilátky (anti mouse) do 20 ml 1 % (w/v) mléka v TBS s 0,1 % (v/v) Tween 20. Membrána byla opláchnuta od nenavázaných zbytků sekundární protilátky 1, 5, 10, 10 minut v TBS s 0,1 % (v/v) Tween 20 a 2 x 10 minut v TBS.

Detekce:

Označené membrány byly vloženy mezi dvě průhledné folie a pokryty chemiluminiscenčním substrátem (SuperSignal WestFemto maximum Sensitivity Substrat). Signál byl detekován dvěma způsoby: exponováním v kazetě na filmy Kodak Biomax Light nebo na přístroji VersaDoc 4000 imaginig system. Obrázky byly následně upraveny v programu Adobe Photoshop.

Kvantifikace:

Kvantifikace množství proteinu byla provedena v programu Quantity One, signál všech podjednotek komplexů dýchacího řetězce byl normalizován na signál porinu.

„Stripování“ membrány:

Membrána musí být před další detekcí zbavena již použitých protilátek, postupem nazvaným „stripování“. Membrána byla inkubována ve 100 ml „stripovacího“ roztoku při teplotě 65 – 70 °C a míchání v uzavřených plastových vaničkách. Následně byly membrány 3 x 10 minut opláchnuty v TBS a pro další použití uchovávány ponořené v TBS v umělohmotné vaničce při 4 °C.

Specifikace antimitochondriálních protilátek:

K detekci podjednotek jednotlivých komplexů dýchacího řetězce jsme používali monoklonální protilátky od firmy Mitosciences.

tab. 3.5 Protilátky proti podjednotkám dýchacího řetězce a ATP syntasy

podjednotka (komplex)	velikost podjednotky [kDa]	katalogové číslo protilátky	c protilátky od výrobce [mg/ml]	c v TBS, 1 % Tween 20 [μg/ml]	optimální doba inkubace [minuty]
NDUFA9 (I.)	39	MS 111	0,89	0,022	60
SDHA (II.)	70	MS 204	1	0,015	60
CORE 2 (III.)	47	MS 304	1	0,025	60
Cox 1 (IV.)	57	MS 404	1	0,015	60
Cox 2 (IV.)	26	MS 405	1	0,025	90
Cox 5a (IV.)	12	MS 409	1	0,035	90
ATP F ₁ – α (V.)	55	MS 502	1	0,035	60
ATP F ₁ – β (V.)	52	MS 503	1	0,025	60

tab. 3.6 Ostatní antimitochondriální protilátky

podjednotka (komplex)	velikost podjednotky [kDa]	katalogové číslo protilátky	c protilátky od výrobce [mg/ml]	c v TBS, 1 % Tween 20 [mg/ml]	optimální doba inkubace [minuty]
PDH E2	66	MS P05	1	0,75	120
Porin	39	MS A03	1	0,15	90

3.2.7. Množství mtDNA v jaterní tkáni

Kvantifikace mtDNA byla provedena přístrojem Chromo4 real – time PCR. Pro analýzy byly použity dva páry primerů. První pár primerů byl navrhnut pro gen pro mitochondriální 16S rRNA a použit k amplifikaci mtDNA, zatímco druhý pár primerů sloužil k amplifikaci jaderného genu (GAPDH). Měření množství jaderné DNA bylo

využito k normalizaci množství mtDNA na jednu buňku. Obsah mtDNA byl vypočítán na základě matematického vztahu:

$$Q = 2^{-Ct(\text{mtDNA})/2^{-Ct(\text{nDNA})}}$$

Prahový cyklus (Ct) je bod, ve kterém přístroj poprvé detekuje fluorescenci ve srovnání s pozadím.

3.2.7.1. Izolace DNA

DNA byla vyizolována z přibližně 100 mg jaterní tkáně uskladňované při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Izolace byla provedena komerčním roztokem TriReagent dle doporučeného protokolu. Koncentrace celkové DNA každého analyzovaného vzorku byla upravena na $50\text{ ng}/\mu\text{l}$ a změřena spektrofotometricky přístrojem Nanodrop.

3.2.7.2. Kvantifikace mtDNA

Pro Real – time PCR amplifikaci bylo připraveno $25\ \mu\text{l}$ pracovního roztoku. Roztok obsahoval: $200\ \text{nM}$ pár primerů buď pro nDNA nebo mtDNA a $1\ \mu\text{l}$ vzorku DNA v 2 x Master Mix DyNAmo™ HS SYBR® Green. U každého vzorku bylo provedeno nejprve měření množství mtDNA a následně měření množství nDNA.

Program PCR reakcí byl: iniciační denaturace $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 min; následně 40 cyklů složených z denaturace při $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ po 15 s, navázání primerů $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ po 18 s (16S rRNA) nebo 15 s (GAPDH), dále prodlužování řetězce $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ po 30 s (detekce fluorescence). Poslední krok PCR reakce byl „dosyntetizování“ řetězce a probíhal při $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ po 5 min. Pro ověření specifity reakce byla analyzována křivka tání. Každý vzorek byl měřen dvakrát v tripletu a pro každé měření byla použita alespoň jedna kontrola neobsahující templát („blank“).

tab. 3.7 Sekvence primerů a jejich vlastnosti

Název primeru	Oligonukleotidová sekvence	GenBank Registrační číslo sekvence genu
GAPDH paralelní	TTCAACAGCGACACCCACT	AY340484
GAPDH antiparalelní	CCAGCCACATAACCAGGAAAT	
16S rRNA paralelní	CCAAACCCACTCCACCTTAC	J01415
16S rRNA antiparalelní	TCATCTTCCCTTGCGGTA	

3.2.8. Histologická analýza

Tkáň pro histologickou analýzu byla fixována 10 % paraformaldehydem a zalita parafínem. Parafínové řezy byly po deparafilmaci a zavodnění obarveny hematoxylinem a eosinem. Hematoxylin je modré barvivo, používající se k obarvení jader buněk. Eosin je hnědé barvivo barvící cytoplazmu (strukturní barvivo).

3.2.9. Statistické zpracování dat

K vyhodnocování dat byl použit program STATISTICA, verze 6.0 (StatSoft, Prague, CZ). Statisticky byl hodnocen soubor naměřených aktivit enzymů dýchacího řetězce, CS a PDH. Naměřené veličiny neměli normální rozdělení, proto byl soubor testován Mann – Whitney testem. Vše bylo testováno na hladině významnosti $p < 0,05$.

4. Výsledky

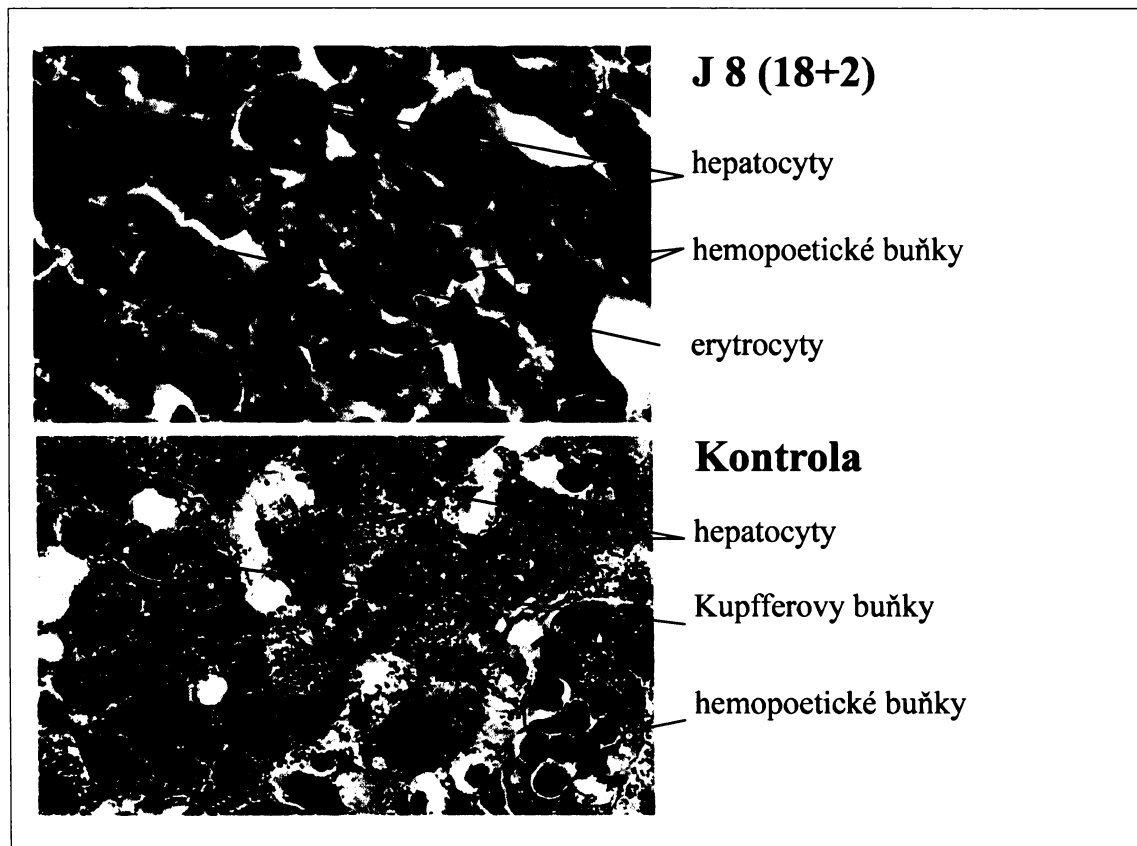
Pro studium vývoje mitochondriálního metabolismu bylo použito 20 vzorků fetální jaterní tkáně gestačního stáří 12 – 28 týdnů. Důvodem ukončení těhotenství byly v sedmnácti případech závažné vývojové vady a ve třech případech trizomie chromozomu 21 (Downův syndrom). Protože nebyly nalezeny rozdíly mezi skupinou vzorků od plodů s vývojovými vadami a skupinou od plodů s trizomií 21, byly obě skupiny zahrnuty do jednoho souboru (data neuvedena). Naměřené hodnoty byly porovnávány mezi sebou (vzhledem ke gestačnímu stáří) a s kontrolní skupinou vzorků, od dětí zemřelých ve věku 0 – 8 let.

4.1. Histochemická analýza*

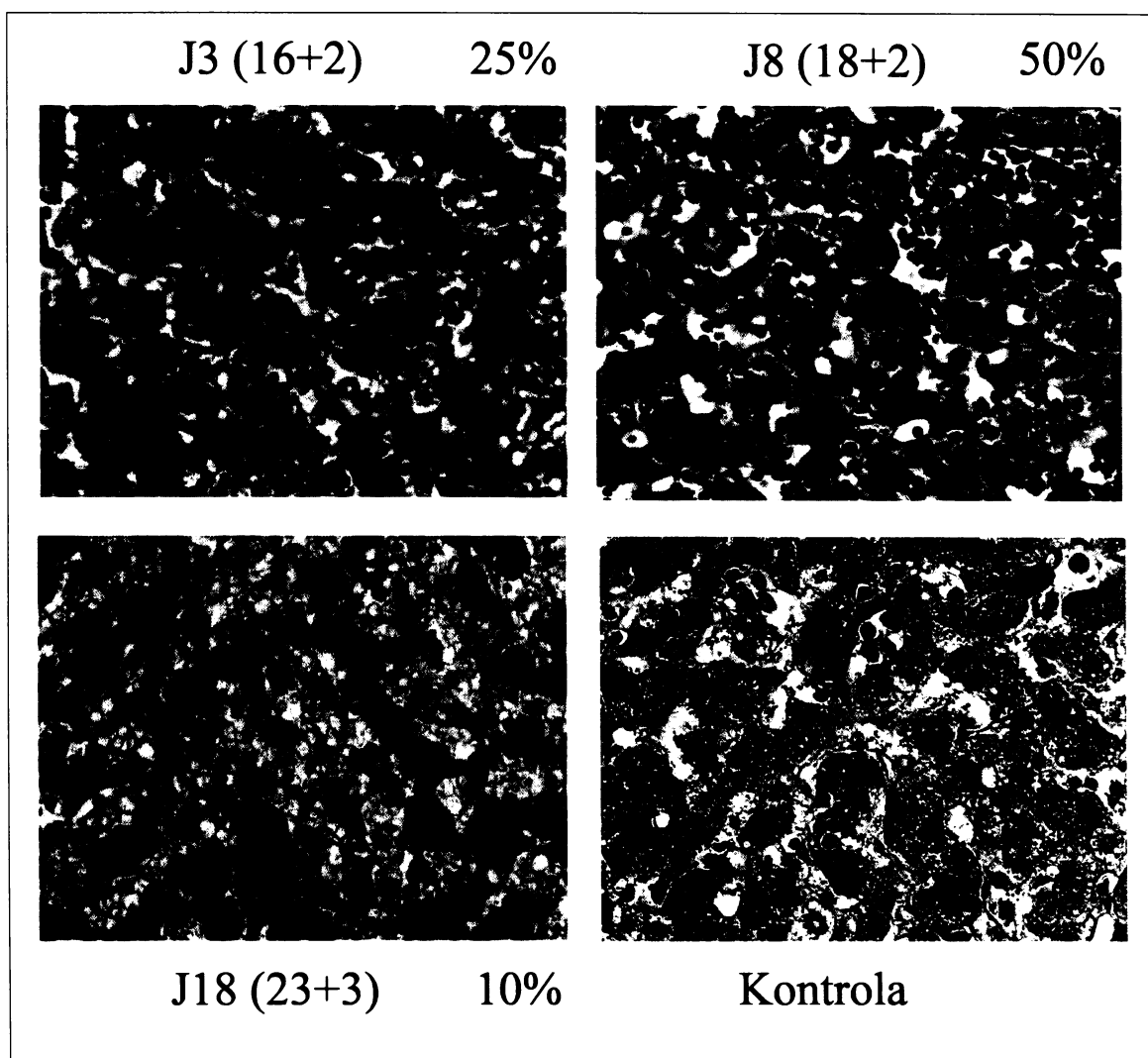
Histochemická analýza byla provedena ve vzorcích jaterní tkáně od potracených plodů v gestačnm stáří 16 týdnů+2 dny (16+2 T) (J3), 18+2 T (J8), 23+2 T (J18) a postnatální jaterní tkáni od dítěte, které zemřelo ve stáří 3 měsíce.

Ve všech třech vzorcích fetální jaterní tkáně bylo kromě hepatocytů pozorováno velké množství hemopoetických buněk a krevních buněk charakteristických pro dané vývojové období. Ve vzorku J3 (gestačního stáří 16+2) tvořily hemopoetické buňky 25 – 30 % všech přítomných buněk. Ve vzorku J8 (gestačního stáří 18+2) tvořily hemopoetické buňky až 50 % všech přítomných buněk. U vzorku J18 (gestačního stáří 23+2) byl patrný pokles na 10 %. V tomto vzorku byl nalezen velký počet zralých erytrocytů. V kontrolním vzorku postnatálních jater byly hemopoetické buňky přítomny jen ojediněle, byly nalezeny Kupfferovy buňky (obr. 4.1, str. 53; obr. 4.2 str. 54).

* Histochemická analýza byla provedena byla ve spolupráci z MUDr. Helenou Hůlkovou z Ústavu dědičných metabolických poruch.



obr. 4.1 Histologická analýza (zvětšení: 60x). Histologická analýza vzorku jaterní tkáně potraceného plodu J8 v gestačním stáří 18+2 týdny a vzorku jaterní tkáně od dítěte zemřelého ve věku 3 měsíce. Fetální játra obsahují kromě hepatocytů až 50 % hemopoetických buněk a erytrocyty. Postnatální játra obsahují už jen stopy hemopoetických buněk. V postnatálních játrech byly pozorovány Kupfferovy buňky. Tkáň byla barvena Hematoxylinem a Eosinem.



obr. 4.2 Histologická analýza (zvětšení 20x). Histologická analýza jaterní tkáně vzorků, od potracených dětí, J3 (v gestačním stáří 16 týdnů+2 dny), J9 (19+2), J18 (22+2) a postnatálních jater ve stáří 3 měsíce. Je patrný nárůst počtu hemopoetických buněk z 25 – 30 % celkového počtu u J3 na 50 % celkového počtu buněk u J9 a následný pokles hemopoetických buněk u vzorku J18 na 10 %. Ve vzorku postnatálních jater byly přítomny jen stopy hemopoetických buněk. Tkáň byla barvena Hematoxylinem a Eosinem. Procenta [%] reprezentují podíl hemopoetických buněk.

4.2. Izolace mitochondrií z jaterní tkáně

Ze 20 vzorků fetální jaterní tkáně (J1 – J20) byly izolovány mitochondrie. Ze 100 – 350 mg tkáně bylo získáno 40 – 170 μ l mitochondriální frakce. Koncentrace proteinů v izolovaných mitochondriích se pohybovala od 5,93 do 26,43 mg/ml (tab. 4.2. str. 60, 61). Dále byl vypočten výtěžek mitochondrií, získaný z fetální jaterní tkáně, a hodnoty byly porovnány s výtěžností mitochondrií z postnatální jaterní tkáně a s výtěžkem mitochondrií z fetální a postnatální svalové tkáně dříve provedené v naší laboratoři. V jaterní tkáni se výtěžek mitochondrií ve fetálních a postnatálních vzorcích nelišil, ve svalové tkáni byl výtěžek mitochondrií ve fetálních vzorcích značně snížený ve srovnání s výtěžkem z postnatálních vzorků.

tab. 4.1 Výtěžek mitochondrií

Výtěžek mitochondriálního proteinu [μ g mitochondriálního proteinu/ μ g tkáně]		
	fetální tkáň	postnatální tkáň
sval	0,003 \pm 0.0015 n = 15	0,0746 \pm 0.0424 n = 15
játra	0,008 \pm 0.0038 n =20	0,0083 \pm 0,0043 n = 10

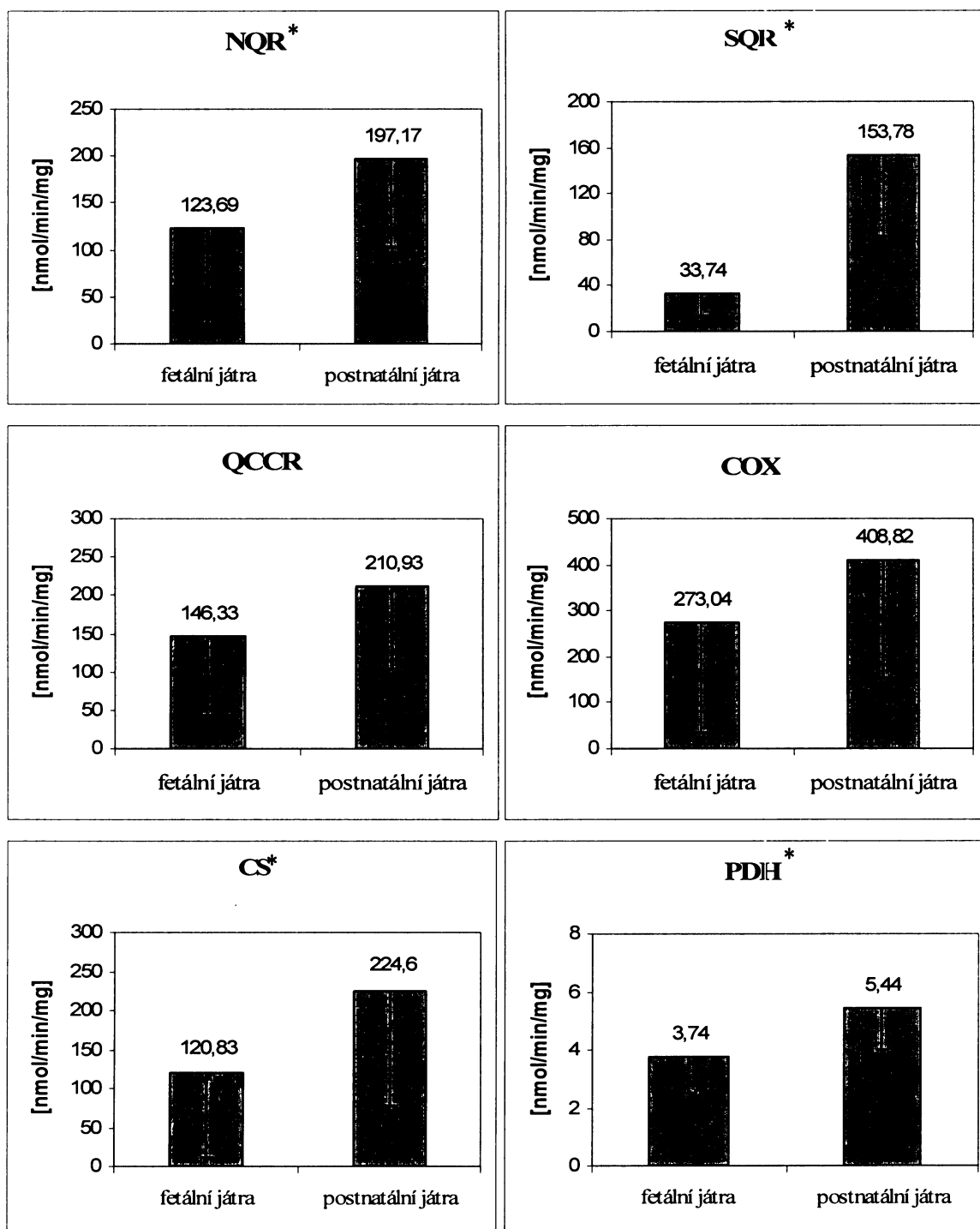
4.3. Stanovení aktivit enzymů dýchacího řetězce, citrát syntasy, pyruvátdehydrogenasy

U všech 20 vzorků mitochondrií z jaterní tkáně byly měřeny aktivity enzymů OXPHOS, CS a katalytická aktivita PDH (tab. 4.2 str 60; 61, 4.3. str. 61). Nenašli jsme vztah mezi aktivitami enzymů komplexu I, II, I+III, II+III, III, IV, CS, PDH a časem od indukce k potratu, mezi aktivitami enzymů a hmotností plodu a mezi aktivitami enzymů a délkou skladování materiálu při -80°C (data neuvedena).

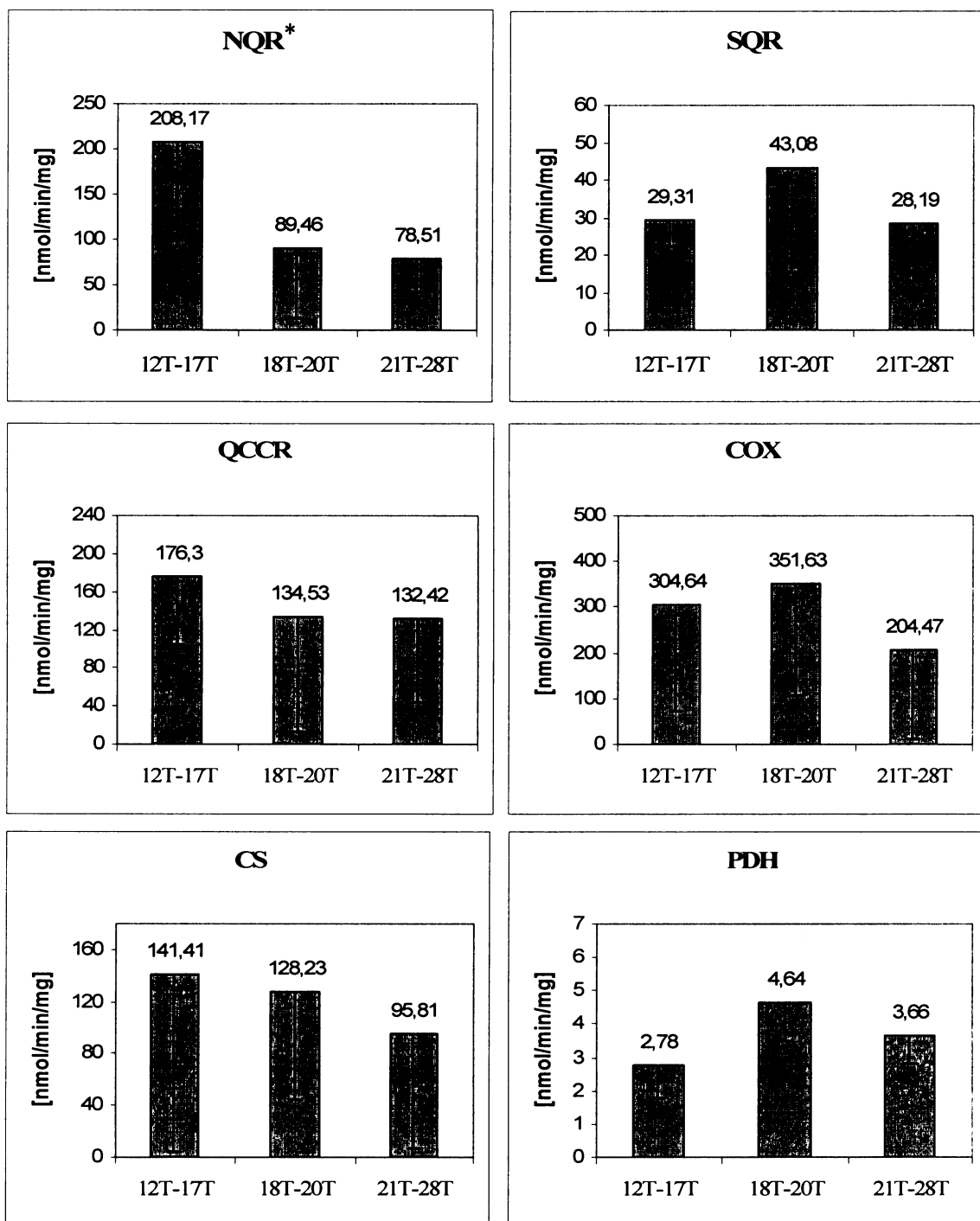
Průměrné hodnoty aktivit, komplexů I, II, III, IV, PDH a kontrolního enzymu CS v mitochondriích a komplexu IV a CS v homogenátu, zjištěných v souboru vzorků jaterní tkáně od potracených dětí byly porovnány s průměrnými hodnotami aktivit naměřenými v souboru jaterní tkáně od dětí, které zemřely ve stáří 14 dní – 8 let (graf 4.1, str. 57; graf 4.3, str. 59). Průměrná hodnota aktivit enzymů dýchacího řetězce I, II, III, IV, CS a

PDH v mitochondriích i v homogenátu ve fetálních játrech byla nižší než aktivity v postnatálních játrech. Statisticky významně nižší jsou aktivity všech komplexů mimo komplex III a IV. Nejvíce je patrný rozdíl aktivit mezi fetálními a postnatálními játry u komplexu II.

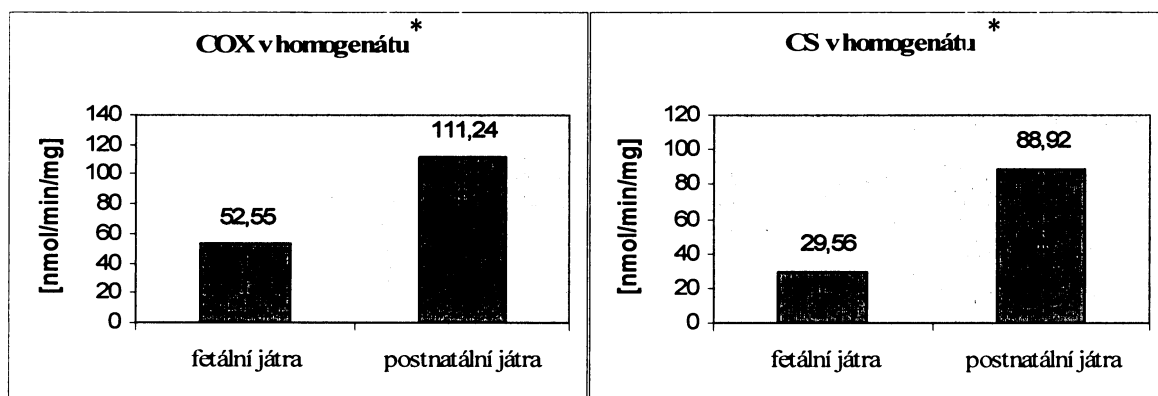
Zjištěné hodnoty aktivit komplexů I, II, III, IV, CS a PDH v mitochondriích a komplexů IV a CS v homogenátu byly rozděleny podle délky gestace do tří skupin: 12 – 17 týden, 18 – 20 týden, 20 – 28 týden a hodnoty byly porovnány mezi sebou (graf 4.2. str. 58, graf 4.4. str. 59). Závislost enzymové aktivity na týdnu gestace ve třech skupinách byla studována z důvodu vyloučení vlivu změn hemopoetické aktivity jaterní tkáně v průběhu gestace. Během gestace aktivita klesala u komplexu I (statisticky významné) a pozvolna u komplexu III (statisticky nevýznamné). Mírný nárůst aktivity druhé skupiny (18 – 20 týden) vzhledem k aktivitám zjištěným v první skupině (12 – 17 týden) a následný pokles u třetí skupiny (21 – 28 týden) byl zaznamenán u komplexu II, IV, PDH a CS v mitochondriích, ale nebyl statisticky významný.



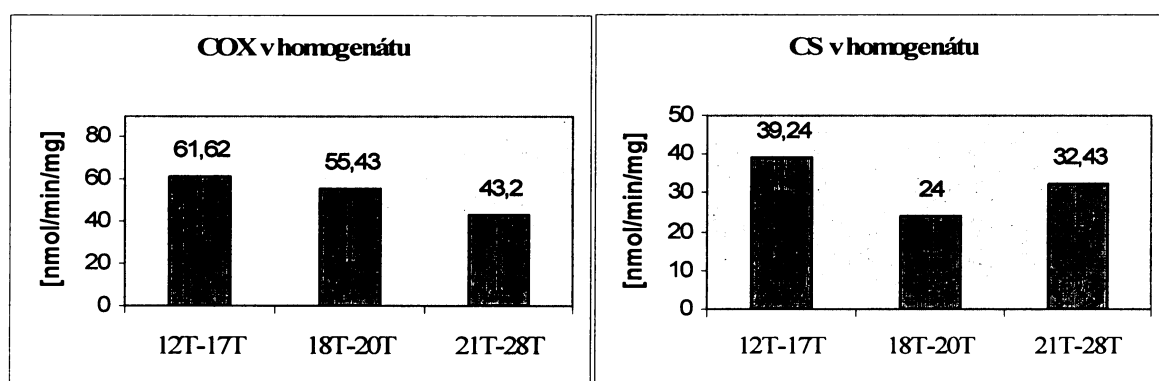
graf 4.1 Srovnání průměrných aktivit NQR (komplex I), SQR (komplex II), QCCR (komplex III), COX (komplex IV), CS (citrátsyntasa) a PDH (pyruvátdehydrogenasa) v mitochondriích izolovaných ze vzorků jaterní tkáně od potracených dětí v gestačním stáří 12 – 28 týdnů s průměrnými aktivitami v mitochondriích od starších kontrol (n = 10). Enzymové aktivity ve fetálních játrech jsou statisticky nižší u NQR, SQR, CS a PDH ($p < 0,05^*$).



graf 4.2 Srovnání průměrných aktivit NQR (komplex I), SQR (komplex II), QCCR (komplex III), COX (komplex IV), CS (citrátsyntasa) a PDH (pyruvátdehydrogenasa) u tří skupin získaných rozdělením souboru vzorků jaterní tkáně potracených dětí podle délky gestace : 12 – 17 týden (n = 6), 18 – 20 týden (n = 7), 21 – 28 týden (n = 7). Statisticky významný byl pokles aktivity s věkem u NQR ($p < 0,05^*$).



graf 4.3 Srovnání průměrných aktivit enzymů COX (komplex IV) a CS (citrátsyntasa) získaných v homogenátech fetálních jaterních tkání (n = 19) s průměrnými aktivitami v homogenátu starších kontrol (n = 10). Enzymové aktivity ve fetálních játrech jsou statisticky nižší u obou enzymů (p < 0,05*).



graf 4.4 Srovnání průměrných aktivit enzymů COX (komplex IV) a CS (citrátsyntasa) v homogenátu tří skupin získaných rozdělením souboru vzorků jaterní tkáně potracených dětí podle délky gestace: 12 – 17 týden (n = 6), 18 – 20 týden (n = 7), 21 – 28 týden (n = 7). Nebyl prokázán vliv hemopoeze na aktivitu enzymů.

tab. 4.2 Aktivity enzymů dýchacího řetězce a citrát syntasy: Přehled měřených aktivit enzymů v mitochondriální frakci (mito) a v homogenátu (hom) získaných z potracených plodů v gestačním stádiu 12-28 týdnů. Cp je koncentrace proteinu uvedena [v mg/ml]. Aktivity enzymů jsou uvedeny [nmol/min/mg] proteinu. Byl vyhodnocen poměr aktivit komplexu IV a CS (COX/CS). Nebyla-li hodnota měřena, je v tabulce uvedeno ND.

vzorek	délka gestace [týdny+dny]	Cp		COX/CS		COX		CS		NQR	NCCR	SCCR	QCCR	SQR	
		hom	mito	hom	mito	hom	mito	hom	mito						
		[nmol/min/mg] proteinu													
J1	12	5,35	17,04	1,49	0,47	52,45	207,4	35,21	437,3	259,46	ND	33,79	133,51	37,37	
J2	13	7,45	12,34	1,01	6,06	26,06	177,58	25,76	29,30	129,57	5,37	15,29	294,79	36,1	
J3	16	10,82	5,93	0,34	2,17	9,01	49,54	26,32	22,79	294,09	ND	34,92	162,05	19,72	
J4	16+4	5,23	22,2	2,16	4,58	78,04	263,14	36,08	57,42	35,72	83,88	17,18	142,5	34,17	
J5	16+2	5,29	20,72	1,80	3,60	93,79	258,55	51,92	71,07	294,85	33,8	53,39	123,12	29,17	
J6	17	ND	11,08	ND	6,27	ND	796,40	ND	126,91	312,24	24,4	46,63	350,32	20,2	
J7	17+4	6,87	26,43	1,60	1,90	74,82	252,88	46,65	132,98	56,48	20,46	18,74	146,32	35,2	
J8	18	5,86	20,86	2,32	3,37	90,59	580,89	39,01	172,1	262,58	101,38	29,47	148,22	51,75	
J9	19	6,14	16,23	1,53	2,08	37,85	532,82	24,72	256,42	71,32	42,43	42,12	134,23	67,82	
J10	19+2	6,08	22,96	1,15	0,83	31,11	25,66	27,18	30,84	71,14	96,66	1,76	14,99	12,57	

COX (komplex IV), CS (citrát syntasa), NQR (komplex I), NCCR (komplex I+III), SCCR (komplex II+III), QCCR (komplex III), SQR (komplex II).

tab. 4.2 pokračování

vzorek	délka gestace [týdny+dny]	Cp		COX/CS		COX		CS		NQR	NCCR	SCCR	QCCR	SQR
		hom	mito	hom	mito	hom	mito	hom	mito					
[nmol/min/mg] proteinu														
J11	19+4	5,16	16,38	1,11	3,25	34,26	663,4	30,99	203,70	35,8	ND	51,30	407,40	36,14
J12	20+1	5,09	19,61	0,16	0,53	3,33	5,22	21,68	9,79	13,13	7,84	10,16	16,91	22,02
J13	20+3	5,17	19,33	4,13	4,26	83,10	410,43	20,12	96,42	60,36	ND	31,41	107,69	17,56
J14	20+5	6,83	21,52	25,24	1,86	107,78	243,01	4,27	128,36	111,87	118,77	31,70	112,3	93,7
J15	21	5,58	17,29	3,68	2,93	71,09	595,58	19,3	203	84,13	34,18	28,50	83,91	61,23
J16	21+3	6,68	17,64	1,95	2,01	75,23	332,62	38,51	165,27	78,25	38,18	21,01	230,52	28,73
J17	22+2	5,17	26,21	2,02	1,06	102,5	234,50	50,52	220,4	103,35	ND	5,94	88,86	17,13
J18	23+2	5,23	16,92	0,32	2,48	11,55	58,60	35,44	23,64	ND	3,74	7,24	110,66	15,95
J19	25+4	12,25	17,05	0,11	0,77	4,42	15,35	41,27	19,71	66,94	28,09	5,90	95,65	16,06
J20	28+3	6,78	20,50	0,71	1,88	11,53	17,07	16,21	9,37	8,82	4,54	1,82	22,57	22,15

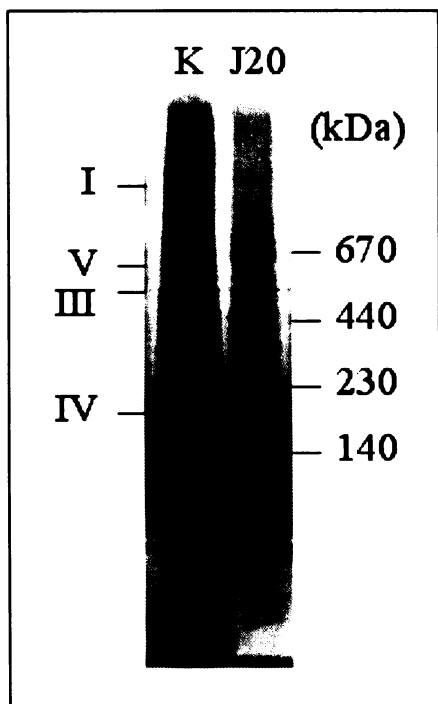
COX (komplex IV), CS (citrát syntasa), NQR (komplex I+III), NCCR (komplex II+III), SCCR (komplex II+III), QCCR (komplex III), SQR (komplex II).

tab. 4.3 Katalytická aktivita pyruvátdehydrogenasového komplexu (PDHc) . Přehled katalytických aktivit PDHc v mitochondriích získaných ze vzorků fetální jaterní tkáně v gestačním stádiu 12-28 týdnů. Gestační stádiu uvedeno [týdny+dny], katalytická aktivita PDHc uvedena [nmol/min/mg] proteinu.

vzorek	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10	J11	J12	J13	J14	J15	J16	J17	J18	J19	J20
délka gestace	12	16	16+2	16+4	17	17+4	18	18+2	19+2	19+4	20+1	20+3	20+5	21	21+3	22+2	23	23+2	25+4	28+3
PDHc	2,72	1,72	2,32	4,41	1,7	3,8	4,37	3,73	7,1	4,39	3,28	4,88	4,71	3,57	4,16	4,49	3,97	1,85	4,18	3,36

4.4. Proteinová analýza

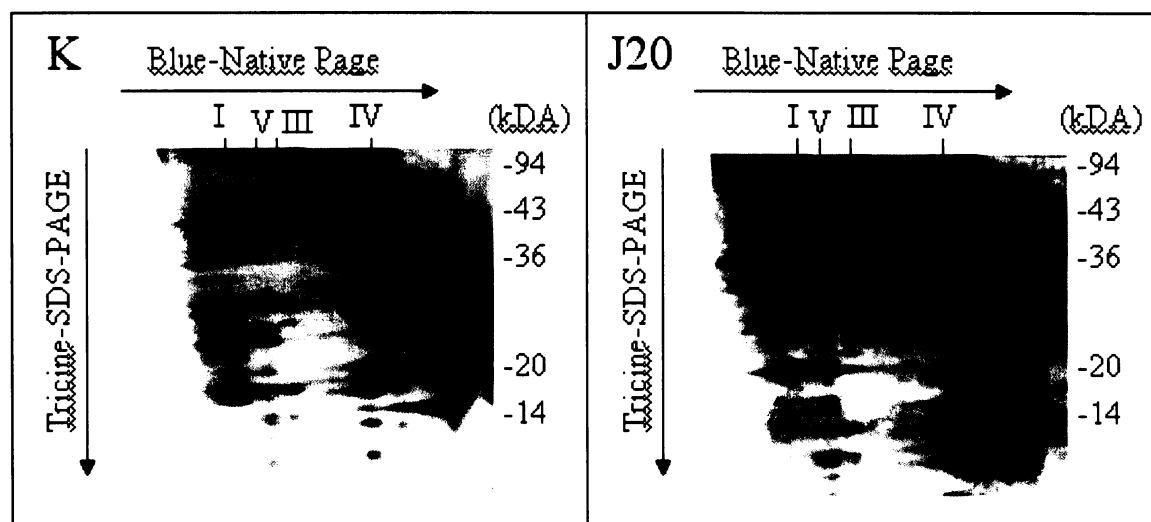
Ke stanovení množství proteinů a podjednotek dýchacího řetězce byly použity 3 metody: „Blue Native“, dvojrozměrná elektroforéza a SDS – PAGE s western blotem. Nejprve bylo prostřednictvím „Blue Native“ a dvojrozměrné elektroforézy doloženo snížené množství proteinů. Pro podrobnější analýzu byla optimalizována SDS – PAGE s western



blotem a následnou detekcí proteinů pomocí protilátek. „Blue Native“ elektroforéza byla provedena u J20 (20T) (obr. 4.3). Z obrázku je patrné rozdělení na jednotlivé multiproteinové komplexy dýchacího řetězce. Komplex I je jen málo patrný. Dvojrozměrná elektroforéza byla provedena také u J20 (obr. 4.4 str. 63). Tato metoda umožňuje sledovat jednotlivé komplexy rozdělené na podjednotky. Z obrázku je patrné snížené množství jednotlivých komplexů u fetálních jater pacienta oproti kontrole.

Pro přesnější analýzu množství proteinů byla vybrána metoda SDS – PAGE s následným western blotem a imunodetekcí.

obr. 4.3 „Blue Native“ elektroforéza. Byla provedena „Blue Native“ elektroforéza komplexů dýchacího řetězce u vzorku fetální jaterní tkáně J20 (28+3T) a posnatální jaterní tkáně ve stáří 3 měsíce. 20 µg proteinu solubilizovaného pomocí laurylmaltosidu bylo rozděleno na 6 – 15 % gradientovém gelu a barveno Coomassie Brilliant Blue R. Vlevo je označena pozice komplexů OXPHOS I, III, IV, a V.



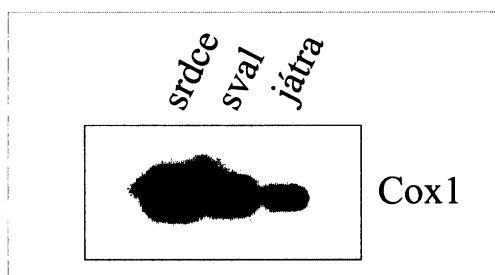
obr. 4.4: „Blue Native“/Dvojrozměrná elektroforéza

Dvourozměrná elektroforéza komplexů OXPHOS z jaterní fetální tkáně J20 ve stáří J20 (28+3T) a postnatální jaterní tkáně ve věku 3 měsíců (K). Jaterní mitochondrie (20 μg proteinu) byly analyzovány v prvním rozměru pomocí Blue Native a v druhém rozměru pomocí SDS – PAGE. Gely byly vizualizovány stříbřením.

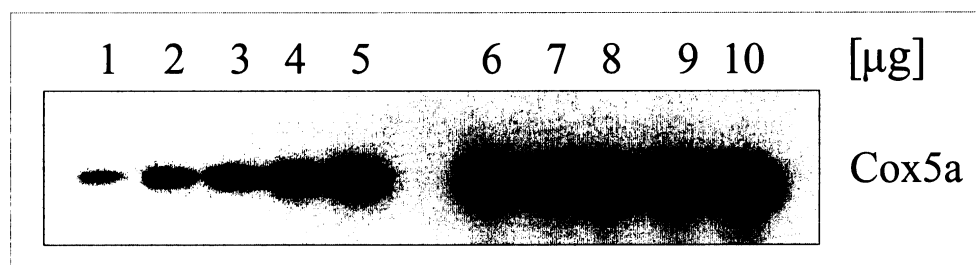
Optimalizace metody:

Nejprve byla provedena optimalizace metody pro jaterní tkáň. K dispozici bylo jen omezené množství mitochondrií z fetálních jater, proto byly k optimalizaci metody použity vzorky jaterní tkáně od zralých kontrol. Signál protilátky proti podjednotce Cox1 byl detekován na membráně obsahující 2,5 μg proteinu srdeční tkáně, 5 μg proteinu svalové tkáně a 10 μg proteinu jaterní tkáně. Z obr. 4.5, str. 64, je patrný nejsilnější signál u srdeční tkáně, přestože obsahoval nejméně proteinu. Dále byla provedena optimalizace množství aplikovaného proteinu vhodného pro detekci příslušných podjednotek. Na gel byly aplikovány mitochondrie o koncentraci 1,2 – 10 μg proteinu na „slot“. Byla vybrána optimální koncentrace proteinu 4 – 5 μg proteinu na „slot“ (obr 4.6, str. 64). 4 μg proteinu na „slot“ od vzorků J1, J7, J14 a kontroly byly použity k optimalizování množství používaných protilátek (viz tab. 3.5, str. 49 ; tab. 3.6; str. 49).

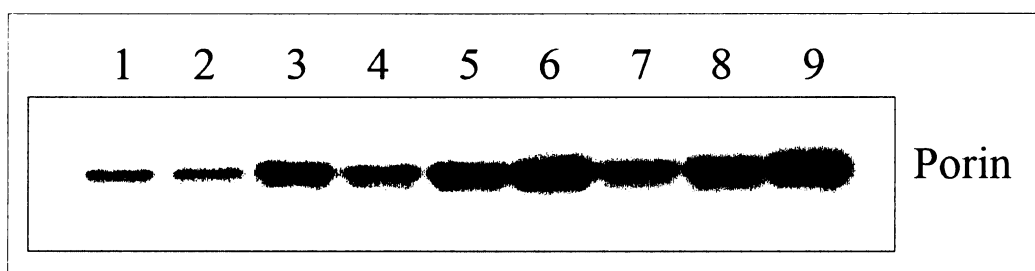
Později se ukázalo správnější aplikovat množství vzorků do „slotů“ nikoliv podle stejné koncentrace proteinu, ale podle stejné koncentrace proteinu vnější mitochondriální membrány – porinu. Při stejné koncentraci proteinu ve vzorcích se množství porinu liší (obr. 4.7, str. 65). Mitochondriální protein porin lze využít jako ukazatel množství mitochondrií.



obr. 4.5 Proteinová analýza pomocí western blotu srdeční, svalové a jaterní tkáně od dítěte zemřelého ve stáří 8 let. Koncentrace proteinu ve „slotu“ byla u srdeční tkáně 2,5 μg , u svalové tkáně 5 μg a u jaterní tkáně 10 μg . Koncentrace primární protilátky proti podjednotce komplexu IV Cox1 byla 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$.



obr. 4.6 Optimalizace koncentrace proteinu pro proteinovou analýzu pomocí western blotu. Do „slotů“ bylo nanášeno 1 – 10 μg proteinu od stejného vzorku jaterní tkáně od dítěte zemřelého ve stáří 8 let, k detekci byla použita protilátka proti podjednotce komplexu IV Cox5a o koncentraci 0,05 $\mu\text{g}/\text{ml}$.



obr. 4.7 Detekce porinu ve vzorcích jaterní tkáně pomocí western blotu.

1 – 8 jsou vzorky fetální jaterní tkáně, 9 je vzorek jaterní tkáně starší kontroly. Vzorky byly normalizovány na mitochondriální protein. Koncentrace proteinu každého vzorku je 4 $\mu\text{g/ml}$. Koncentrace titru protilátky proti porinu byla 0,05 $\mu\text{g/ml}$.

Výsledek postupu optimalizace proteinové analýzy fetálních jater pro western blot s následnou imunodetekcí:

Z 10 μl izolovaných mitochondrií z vzorků fetální jaterní tkáně a jednoho vzorku postnatální jaterní tkáně byly připraveny vzorky pro Tricin SDS – PAGE. Z 10 μl izolovaných mitochondrií bylo připraveno 200 – 300 μl vzorku o koncentraci cca 0,7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Bylo důležité pro celou škálu protilátek nanášet vzorky daných jater z jednoho zásobního vzorku po celou dobu analýzy. Nejprve byla provedena Tricin SDS – PAGE, kde všechny vzorky byly naneseny v koncentraci 5 μg proteinu na „slot“, proteiny z gelu byly přeneseny na PVDF membránu a provedena imunodetekce primární protilátkou proti porinu. Intenzita signálu byla vyhodnocena programem Quantity – One. Po dosažení stejného signálu porinu u všech vzorků byly postupně detekovány podjednotky komplexů OXPHOS a PDH.

Kvantifikace jednotlivých podjednotek:

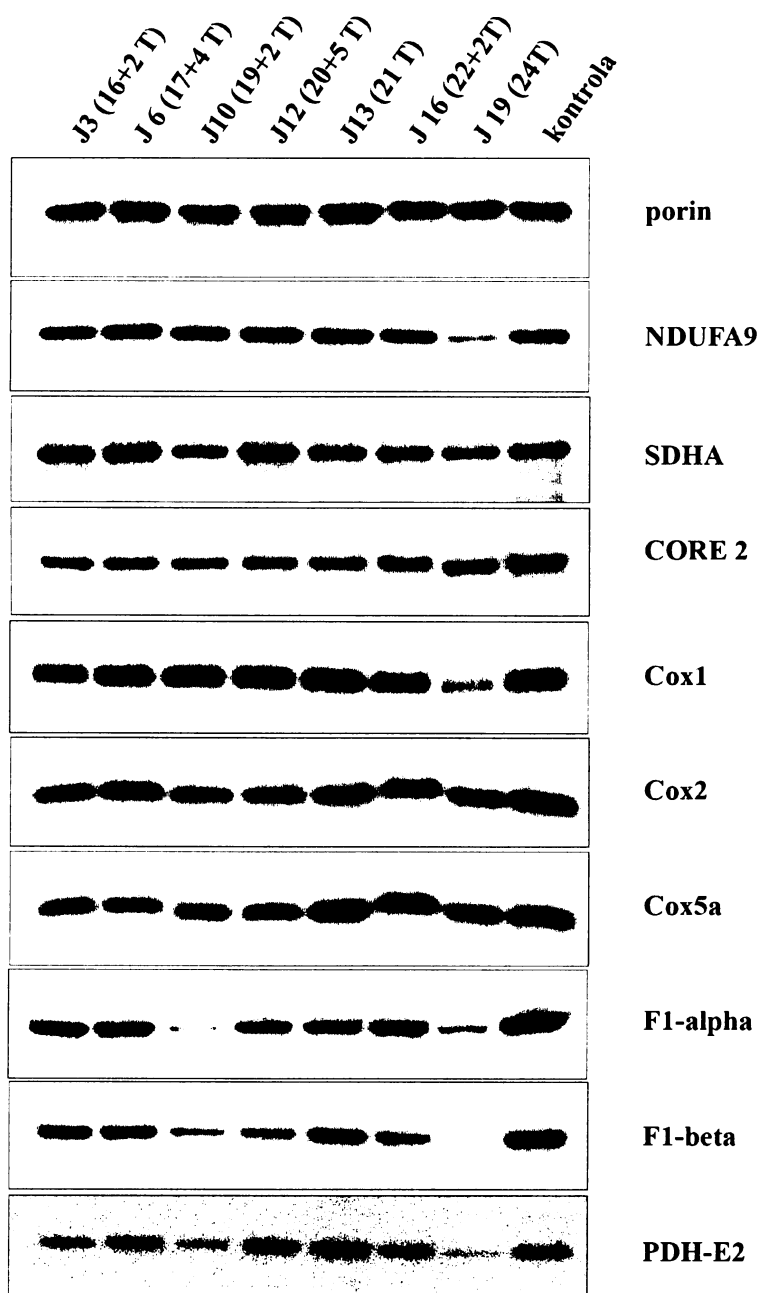
U vzorků fetální jaterní tkáně J3 (gestačního stáří 16+2 T), J6 (17+4T), J10 (18+2T), J12 (20+5T), J13 (21T), J16 (22+2T), J19 (24T) a postnatální jaterní tkáně ve stáří 3 měsíce byla provedena optimalizace na porin a imunodetekce (obr. 4.8, str. 67). Signály protilátek byly vyhodnoceny v programu Quantity – One (tab 4.4, str. 66). Intensity signálů jednotlivých protilátek u fetálních jater byly porovnány se signálem vzorku postnatálních jater, jehož intenzita byla zvolena jako 100 %. Kvantifikace u vzorků fetální jaterní tkáně J8 a J19 byla provedena, ale množství proteinů bylo nízké, proto

nebyly do tabulky zahrnuty. Hodnoty pro jednotlivé proteiny byly průměrovány. Množství podjednotek NDUFA9 (komplexu I) a SDHA (komplexu II) ve vzorcích fetálních jater bylo téměř stejné jako u postnatálních jater. Podjednotka CORE 2 (komplexu III) ve fetálních játrech byla snížena na 58 %, podjednotky Cox1 na 64 % a Cox2 na 40 % (mtDNA kódované podjednotky komplexu IV), podjednotka Cox5a na 47 % (nDNA kódovaná podjednotka komplexu IV). Podjednotky F1- α a F1- β byly sníženy na 54 % a 21 % (komplex V). Podjednotka PDH-E2 byla snížena na 52 % ve srovnání se starší kontrolou.

tab. 4.4. Kvantifikace signálu jednotlivých podjednotek komplexu OXPHOS v analyzovaných vzorcích fetální a postnatální jaterní tkáně pomocí programu Quantity – One. Signál kontrolního vzorku representoval 100 %.

vzorek (délka gestace)	NDUFA9	SDHA	CORE 2	Cox1	Cox2	Cox5a	ATP F1- α	ATP F1- β	PDH-E2
J3 (16+2)	96	96	43	39	41	44	60	29	38
J6 (17+4)	108	130	57	67	57	38	61	31	76
J12 (20+5)	138	133	64	87	36	44	39	14	94
J13 (21T)	101	97	47	64	26	32	28	10	67
J16 (22+2)	96	72	78	63	39	76	80	23	52
Průměr %	108	106	58	64	40	47	54	21	65

NDUFA9 (podjednotka komplexu I), SDHA (podjednotka komplexu II), CORE 2 (podjednotka komplexu III), Cox1, Cox2, Cox5a (podjednotky komplexu IV), F1- α , F1- β ; (podjednotky ATP syntasy) a PDH-E2 (podjednotka pyruvátdehydrogenásového komplexu)



obr. 4. 8 Proteinová analýza vzorků fetální jaterní tkáně pomocí western blotu.

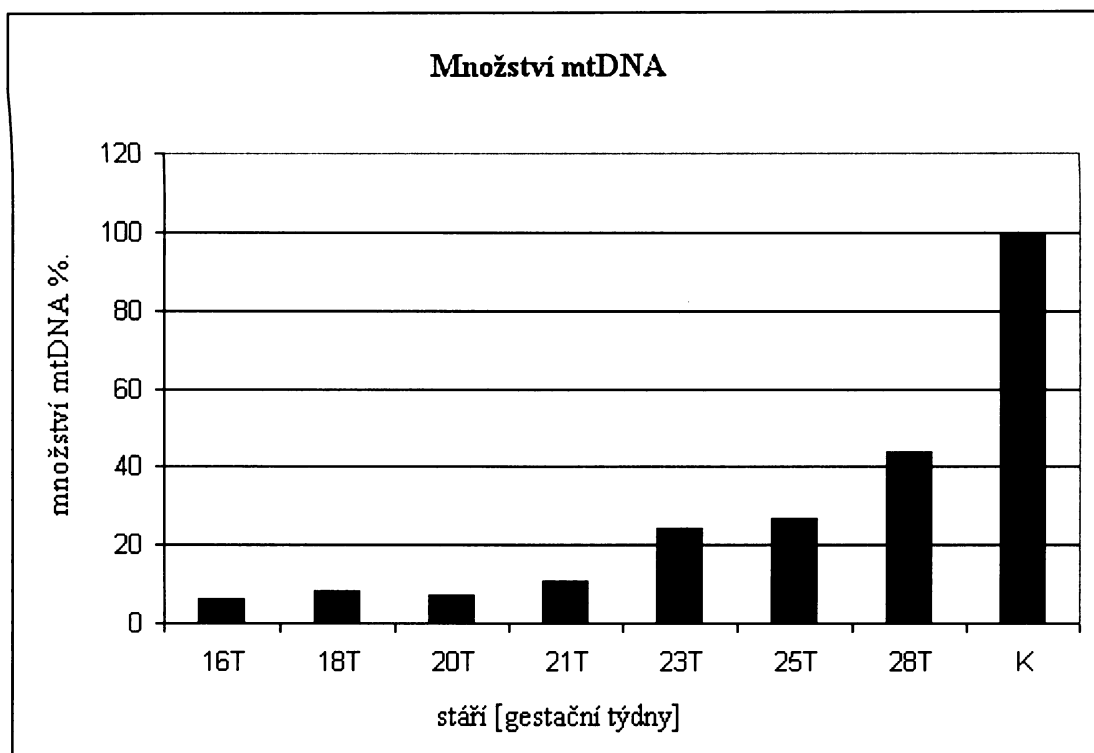
Vzorky J3 (16+2 T), J6 (17+4T), J10 (18+2T), J12 (20+5T), J13 (21T), J16 (22+2T), J19 (24T) a postnatální jaterní tkáně dítěte zemřelého ve stáří 3 měsíce (kontrola). 3,5 – 7 μg (odpovídající stejnému signálu na porin) proteinu bylo rozděleno tricine SDS – PAGE elektroforézou, přeneseno z gelu na PVDF

membránu a postupně detekováno jednotlivými protilátkami. Byly použity následující protilátky od firmy Mitoscience o koncentraci [mg/ml]: Porin: **0,15**; NDUFA9: **0,022** (podjednotka komplexu I); SDHA: **0,015** (podjednotka komplexu II), CORE 2: **0,025** (podjednotka komplexu III), Cox1: **0,015**; Cox2: **0,025**; Cox5a: **0,035** (podjednotky komplexu IV); F1- α : **0,035**, F2- β : **0,025** (podjednotky ATP syntasy) a PDH-E2: **0,75** (podjednotka pyruvát – dehydrogenásového komplexu).

4.5. Kvantifikace mtDNA*

Pomocí real – time PCR bylo analyzováno množství mitochondriální DNA ve vzorcích fetální jaterní tkáň J4 (16+4T), J7 (18T), J3 (20+4T), J14 (21T), J15 (21+3T), J18 (23+2T), J19 (25+4T), J20 (28+3T) (graf 4.5, str. 69). Dva vzorky fetální jaterní tkáň byly ve stáří 21 týdnů (hodnota byla spočítána jako průměr), ostatní gestační týdny reprezentoval vždy jeden vzorek. Obsah mtDNA byl normalizován na množství nDNA ve vzorku. Z grafu je patrný nárůst počtu kopií mtDNA se stoupajícím týdnem gestace na hladině významnosti $p < 0,05$.

* Analýza množství mtDNA pomocí real – time PCR byla provedena byla ve spolupráci s Mgr. Martinou Pejznochovou z Laboratoře pro studium mitochondriálních poruch .



graf 4.5. Množství mtDNA v jaterní fetální tkáni v závislosti na délce gestace.

MtDNA byla analyzována pomocí real – time PCR v 8 vzorcích fetální jaterní tkáně gestačního stáří 16 – 28 týdnů (2 vzorky byly ve stáří 21 týdnů, ostatní gestační týdny representoval vždy jeden vzorek) a jednoho postnatálního vzorku jaterní tkáně stáří 1 měsíc. Obsah mtDNA byl normalizován na množství nDNA ve vzorku. Vzrůstající trend byly statisticky významný na hladině $p < 0,05$.

5. Diskuze

Vývoj mitochondriálního metabolismu je tkáňově i druhově specifický. Obecně lze říci, že probíhá pozvolna po celou dobu gestace a k největším změnám dochází v období těsně před narozením a bezprostředně po něm. V izolovaných mitochondriích z fetální a neonatální potkaní jaterní tkáně byla publikována řada studií energetického metabolismu se shodným závěrem, že potkaní jaterní mitochondrie se stávají plně funkční až bezprostředně po narození [73, 74]. Valcarce prokázal, že maturace jaterních mitochondrií závisí na postnatální syntéze komplexů dýchacího řetězce [75]. Na zvířecích modelech (potkani, skot, prase) [76-78] bylo provedeno mnoho studií vývoje energetického metabolismu i v řadě dalších tkání, ale studie na lidských tkáních byly publikovány jen ojediněle [79-82]. Studium vývoje mitochondriálního metabolismu u člověka je stále obtížné zejména pro nízkou dostupnost materiálu a náročnost na provedení odběru tkáně. Naše studie přináší nové informace o stavu mitochondriálního energetického metabolismu v jaterní tkáni u člověka v prenatálním období.

Odběr materiálu

Odběr jaterní tkáně ve všech případech proběhl v časovém rozmezí od 0,5 – 2 hod po proběhlém potratu a ihned zmražen v tekutém dusíku. Ve studii na potkaním modelu, kde autoři analyzovali postmortální změny aktivity COX v závislosti na čase v mozku, srdci, ledvinách, plicích a játrech bylo zjištěno, že ztráta aktivity COX byla nejrychlejší v jaterní a plicní tkáni [83]. Rychlý odběr tkáně je nezbytný z důvodu eliminace sekundárního poškození vzorku vlivem proteolytické aktivity. Odebrané vzorky byly do doby zpracování skladovány při -80°C , ale byly zpracovávány s různým časovým odstupem (3dny – 5let). Nebyly nalezeny statisticky významné změny v aktivitách komplexů dýchacího řetězce, CS a PDH v závislosti na době skladování.

Histologická analýza

Hematopoetická funkce jaterní tkáně v prenatalním období a přítomnost hematopoetické tkáně ve fetálních játrech již byla dobře popsána v literatuře [84]. Fetální játra jsou tedy směsí různých typů buněk: hepatocytů, hemopoetických buněk v různém stádiu vývoje a zralých erytrocytů. Vzhledem k tomu, že vzorky jaterní tkáně byly k dispozici jen v zmraženém stavu a v jen omezeném množství, nebylo již možné oddělit hepatocyty a hemopoetické buňky, jak bylo provedeno v práci na potkaních fetálních jaterních mitochondriích, kde hepatocyty byly odděleny od prekurzorů krevních elementů na sacharózovém gradientu [64]. Studovali jsme, zda příměs mitochondrií hematopoietického původu ovlivňuje aktivity komplexů dýchacího řetězce. Analýza úrovně hematopoeze ve vzorcích jaterní tkáně různého gestačního stáří prokázala nejvyšší (až 50 %) obsah hematopoietických buněk okolo 20. týdne gestace, ve vzorku z 23. týdne gestace klesala. Výsledky histologické analýzy vzorků jaterní tkáně z našeho souboru jsou v souladu s literaturou [84]. Jaterní tkáň začíná být hematopoeticky aktivní kolem 6. gestačního týdne. Hematopoeza je největší od 12. týdne a začátkem třetího trimestru těhotenství hematopoetickou funkci postupně přebírá kostní dřeň. Výsledky histologické analýzy jsme korelovali s aktivitami komplexů dýchacího řetězce a pyruvátdehydrogenasy. V naší studii nebyl zjištěn vliv úrovně hematopoeze na aktivitu enzymů dýchacího řetězce, CS a PDH.

Izolace mitochondrií z jaterní tkáně

Ve studiích s laboratorními potkany bylo popsáno, že fetální a neonatální jaterní tkáň obsahuje výrazně méně mitochondrií na buňku ve srovnání s jaterní buňkou dospělého jedince [73]. Uvádí se, že výtěžek mitochondriálního proteinu z fetální jaterní tkáně je hruba poloviční ve srovnání s výtěžkem z neonatální jaterní tkáně a 20 % ve srovnání s izolací mitochondrií ze zralé nativní jaterní tkáně s použitím sacharózového gradientu. Počet mitochondrií na jednu buňku v jaterní tkáni u potkanů po narození stoupá [64]. Průměrný výtěžek mitochondriálního proteinu v našem experimentálním souboru fetální jaterní tkáně byl srovnatelný s výtěžkem v souboru kontrolní zralé jaterní tkáně. S největší pravděpodobností byl výtěžek jaterního mitochondriálního proteinu zatížen příměsí mitochondrií hemopoetického původu. Obecně nižší výtěžek mitochondriálního

proteinu v jaterní tkáni (výtěžek do 1 %) v našem souboru může být ovlivněn izolací ze zmražené tkáně a velmi malým vstupním množstvím materiálu ve srovnání s údaji publikovanými na zvířecích modelech (výtěžek 5 %).

Pro demonstraci tkáňové rozdílnosti jsme uvedli hodnoty výtěžků mitochondrií pro svalovou tkáň u člověka, zjištěné dříve v naší laboratoři. Ve svalové tkáni byl nárůst výtěžku mitochondrií izolovaných ze svalu dospělých kontrol 90 % ve srovnání s výtěžkem mitochondrií z fetálního svalu. Ve svalové tkáni u prasat byl zjištěn nárůst mitochondriálního proteinu z 1. do 5. dne po narození o 94 % [77].

Stanovení aktivit komplexů dýchacího řetězce, citrátsyntasy a pyruvátdehydrogenasy

Průměr aktivit komplexu I naměřených ve vzorcích jaterní tkáně z potratů byl snížený na 62 % proti průměrné aktivitě naměřené v postnatální jaterní tkáni, u komplexu II byl snížený na 22%, u CS na 53% a PDH na 68%. Rozdíl mezi aktivitou ve fetální a postnatální jaterní tkáni byl největší u komplexu II. Rozdíly v aktivitách u komplexu III a IV v obou porovnávaných skupinách našeho souboru nebyly statisticky významné, přestože měly stoupající trend jako výše jmenované enzymy.

Ve studii na fetální tkáni člověka, kde byla porovnávána jaterní tkáň od 8 potratů ve 20 – 28 týdnu gestace ve srovnání s 2 dospělými kontrolami ve věku 35 a 50let, byl zjištěn dvojnásobný nárůst aktivity COX [79]. U potkanů byl také pozorován dvojnásobný nárůst aktivity COX ve fetální jaterní tkáni ve srovnání se zralými kontrolami [75]. Statisticky významný v našem souboru byl nárůst aktivit i v homogenátu: u COX dvojnásobný, u CS trojnásobný.

Naše nálezy jsou v souladu s výsledky ve svalové tkáni člověka, kde byly srovnávány aktivity komplexů dýchacího řetězce, CS a pyruvátdehydrogenasy v souboru 13 neinfekčních potratů v 15 – 26 týdnu gestace a kontrolního souboru 20 dětí ve věku 0,5 – 2 let [85]. Statisticky významné rozdíly v nárůstu aktivity byly ve svalu nalezeny u komplexu I, II, III, IV dýchacího řetězce a kontrolního enzymu citrátsyntasy. Ve svalu nebyla statisticky významná pouze změna aktivity PDH.

Ve fetální jaterní tkáni jsme nenalezli statisticky významnou korelaci mezi váhou plodu a aktivitami komplexů dýchacího řetězce, CS a pyruvátdehydrogenasy (výsledky nejsou v práci uvedeny).

Ve svalové tkáni byla pozitivní korelace nalezena pouze u aktivity COX v závislosti na hmotnosti plodu [85]

V průběhu gestace v jaterní tkáni našeho souboru statisticky významně klesala aktivita komplexu I. Naopak ve svalu s délkou gestace významně stoupala aktivita COX a CS [82]. Vzhledem k tomu, že u komplexu II dýchacího řetězce, CS a PDH nebyly pozorovány statisticky významné změny v aktivitách v závislosti na délce gestace, ale jejich aktivity se významně lišily ve srovnání se staršími kontrolami, zdá se, že největší změny v aktivitách probíhají ihned po narození nebo během prvních týdnů života. Ve studiích s laboratorními potkany bylo publikováno, že po podání inhibitoru proteosyntézy cykloheximidu bylo dosaženo největší (téměř totální) inhibice v nárůstu postnatální aktivity u komplexu II, zatímco například u komplexu IV bylo pozorováno pouze mírné snížení aktivity ve srovnání s experimentem bez inhibitoru [61]. U potkanů byl ve svalové tkáni zjištěn nárůst aktivity komplexu IV, CS a PDH z nízkých hodnot, naměřených bezprostředně po narození, na hodnoty téměř dospělého jedince na konci třetího týdne života [86]. V mozkové tkáni u potkanů byl popsán nárůst aktivity cytochrom c oxidasy a ATP syntasy v prvních 4 týdnech postnatálního života [87, 88].

Proteinová analýza – optimalizace metody

Kombinací „Blue Native“ elektroforézy v prvním rozměru a SDS elektroforézy v rozměru druhém vzniká 2 – D polypeptidová mapa. Poskytuje informaci o složení a množství komplexu v analyzovaném vzorku. Tato metoda se používá pro „screening“ složek komplexů OXPHOS u pacientů s podezřením na mitochondriální onemocnění.

Proteinová analýza v jaterní tkáni u extrémně nezralých plodů nebyla doposud v naší laboratoři provedena, proto bylo nutno metodu nejprve optimalizovat. Pro naše použití se ukázalo nejvhodnější aplikovat 4 – 6 µg proteinu jaterní tkáně na „slot“. Po zjištění skutečnosti, že při stejné koncentraci proteinu ve vzorcích se signál pro porin liší, byly všechny vzorky normalizovány na porin. Porin je složkou vnější mitochondriální membrány a používá se jako marker počtu mitochondrií [43].

Obvykle se v proteinových studiích komplexů OXPHOS výsledek normalizuje na signál komplexu II, ale v naší studii byl komplex II jedním z objektů analýzy, proto jsme zvolili porin.

Ukončení SDS – PAGE záviselo na dalším použití gelu. Pokud chceme použít gel pro detekci proteinu menších než 30 kDa, byla elektroforéza přerušena po „domigrování“ proteinu 1 – 0,5 cm nad spodní okraj gelu, jinak byly vzorky nechány „migrovat“ až na konec gelu. Optimální použití jedné „přeblotované“ membrány je 2 x až 3 x. Pro dosažení co nejlepšího výsledku je vhodné použít k označení příslušné membrány jen jednu protilátku a po jejím „odstripování“ použít protiláky proti podjednotkám o lišící se molekulové hmotnosti. Z našich experimentů vyplývá, že detekce protilátek na jedné membráně je možná u protilátek proti Cox2 nebo Cox5a zároveň z jednou z těchto protilátek: NDUFA9, CORE 2, Cox1, ATP F₁- α , ATP F₁- β a porine. Dále je možná kombinace porinu s jednou z následujících protilátek: CORE, ATP F₁- α , ATP F₁- β . Protilátky proti SDHA a PDH – E2 bylo lepší používat jen samostatně.

Při proteinové analýze s použitím western blotu bylo použito 2,5 μ g proteinu srdeční tkáně, 5 μ g proteinu svalové tkáně a 10 μ g proteinu jaterní tkáně od dítěte které zemřelo ve věku 8 let. Signál podjednotky Cox1 byl výrazně nejnižší v jaterní tkáni. Jaterní tkáň neobsahuje zdaleka tolik mitochondriálního proteinu jako svalová a srdeční tkáň. Je to dáno energetickou náročností dané tkáně – kapacita OXPHOS je u každé tkáně jiná a proto se liší počtem mitochondrií a aktivitou enzymů OXPHOS. Největší OXPHOS kapacitu má mozek, dále srdeční, svalová tkáň, ledviny a endokrinní systém [89]

Kvantifikace množství jednotlivých podjednotek komplexů OXPHOS a PDH

Obsah podjednotek NDUFA9 (komplex I) a SDHA (komplex II) byl přibližně stejný u fetálních a postnatálních jater. Obsah podjednotky CORE (komplex III) byl oproti postnatálnímu vzorku snížen na 58%, podjednotky Cox1 (komplex IV) na 64 %, Cox2 (komplex IV) na 40 %, Cox5a (komplex IV) na 47 %. Ve studii s fetální jaterní tkání u člověka byly studovány změny u podjednotek COX. Změny v hladinách transkriptů z fetálního do dospělého stavu byly však nalezeny pouze pro podjednotku VIb (3 x nárůst) VIIb (2 x nárůst) [79].

Obsah podjednotek ATP syntasy F₁- α a F₁- β byl oproti postnatálnímu vzorku snížen na 54% a 21%. Naše výsledky jsou v souladu s literaturou. Ve studiích na potkaních fetálních játrech bylo zjištěno, že hladina mRNA pro F₁- β a mRNA pro COIII+ATP6 – 8 dosahovala ve fetálních vzorcích poloviční hodnoty pro zralá játra a množství proteinu F₁- β bylo sníženo na 15 % [75]. Ve studiích na mitochondriích izolovaných z potkaních

fetálních ledvin bylo pozorováno, že hladina podjednotky OSCP a F_1 ATPsyntasy je v průběhu gestace přibližně stejná a výrazně se mění až těsně před narozením a po porodu, kdy v prvním dnu života dosahuje 75 % hladiny dospělého jedince [90].

Obsah podjednotky PDH-E2 byl snížen oproti postnatálnímu vzorku na 65 %.

Valcarce [75] prokázal, že maturace jaterních mitochondrií závisí na postnatální syntéze komplexů dýchacího řetězce.

Vztah aktivit enzymů a jejich množství

Téměř stejný nárůst enzymové aktivity a množství proteinů z fetálního do postnatálního období byl v našem souboru zjištěn u PDH. Ve studiích na potkanech bylo popsáno, že bezprostředně po narození v játrech 2 x stoupá nejenom celková aktivita PDH během první hodiny života, ale paralelně stoupá i obsah všech podjednotek PDH [91].

Studie provedená na lidské svalové tkáni ukazuje nárůst aktivity PDHc a nárůst množství proteinu podjednotek PDH-E1 a PDH-E2 v souboru starších kontrol oproti hodnotám naměřených v souboru vzorků z fetální svalové tkáně [82]. Ve svalové tkáni potkana stoupala po narození aktivita PDHc do ukončení výživy mlékem od matky a množství podjednotek PDH-E1 a PDH-E2 stoupaly po narození do třetího týdne života [86].

U komplexu III obsah byl protein pro podjednotku CORE 2 snížen na 58 % ve srovnání se zralou kontrolou, ale aktivita představovala 69 % starších kontrol, u komplexu IV průměrná aktivita ve fetálních vzorcích byla 66 % hodnot zralých kontrol, ale proteinová hladina pro podjednotky Cox1, Cox2, Cox5a dosahovala 64 %, 40 % a 47 %. Výrazně snížené množství některé z podjednotek dýchacího řetězce nezbytně nemusí vést k proporcionálnímu snížení aktivity odpovídajícího komplexu. Jedním z vysvětlení je možnost existence nadbytku podjednotek, které mohou mít regulační roli v buněčném metabolismu. Rozdíly mohou také plynout z odlišných „treshlod“ hodnot pro každou tkáň a individuální enzym [92]. Pro komplex III byla prokázána vysoká hodnota „treshlodu“ (přes 80 %) a tedy možnost velké rezervy enzymové aktivity ve všech tkáních. V kardiocytech u potkanů byla vyslovena domněnka o relativním nadbytku aktivity komplexu IV v neonatálním období, která neodpovídá ještě zdánlivě nízkým energetickým požadavkům buňky v tomto období. Specifická aktivita COX v kardiocytech u 5-denních zvířat dosahovala 76 % hodnot dospělých jedinců, zatímco

CS pouze 33 % [93]. Výsledky proteinové analýzy u komplexu I a II dýchacího řetězce nekorelují s naměřenými aktivitami. U komplexu I jsme pozorovali téměř shodné proteinové množství pro NDUFA9 pro podjednotku 39 kDa komplexu I ve fetální a zralé jaterní tkáni. Aktivita u komplexu I se pohybovala okolo 62 % kontrolní skupiny. Zdá se, že pouze část přítomného proteinu je aktivní. U komplexu I byla popsána existence dvou kineticky a strukturně rozdílných aktivních a inaktivních forem [94]. V intaktních mitochondriích mohou reverzibilně přecházet jedna v druhou. V úvahu také přichází i možnost, že spektrofotometrická metoda pro stanovení komplexu I ve fetální jaterní tkáni není dostatečně citlivá. Podobně jsme u komplexu II pozorovali téměř shodné proteinové množství pro podjednotku SDHA komplexu II u fetální a zralé jaterní tkáně, ale aktivita u fetálních vzorků dosahovala pouze 22 % zralých kontrol. Při studiu vlivu složení lipidů mitochondriální membrány byla prokázána souvislost mezi aktivitou komplexů dýchacího řetězce a obsahem nenasycených mastných kyselin [95]. Ve fetálních játrech potkanů bylo zjištěno, že vnitřní mitochondriální membrána obsahuje velké procento nasycených mastných kyselin ve srovnání s dospělými jedinci, což způsobuje její sníženou fluiditu [96]. V mitochondriích izolovaných z potkaních testas bylo zjištěno, že aktivita komplexu II, ale i komplexu I, významně stoupá v závislosti na zvyšujícím se obsahu polynasycených mastných kyselin vlivem diety [97].

Kvantifikace mtDNA

Doposud se jenom málo studií zabývalo změnami v množství mtDNA během fetálního vývoje člověka [81, 98], ale existuje mnoho studií zaměřených na změnu v množství mtDNA během života dospělého jedince. Gadaleta a kol. [99] popisují nárůst počtu mtDNA s věkem v játrech, srdci a mozku mezi dospělými a staršími potkany. V jaterní tkáni u potkanů byl nalezen nárůst počtu kopií mtDNA u mladých jedinců ve stáří 3 – 60 dní, pak počet klesne a zůstává stejný do 2 roku života [100]. Ve svalové a srdeční tkáni u člověka byl prokázán nárůst počtu mtDNA s věkem [101]. Garcia a spol. [81] našli nárůst množství mtDNA během fetálního vývoje v srdeční tkáni u člověka.

Naše výsledky svědčí pro pozitivní trend mezi množstvím kopií mtDNA ve fetální jaterní tkáni a týdnem gestace. Ve fetální tkáni z ledvin potkanů byl pozorován výrazný nárůst poměru mtDNA/nDNA v průběhu gestace, odpovídající významné replikaci mtDNA v tomto období. Zmnožení kopií mtDNA nemusí být nutně známkou zvýšení počtu mitochondrií [90].

6. Závěr

Provedli jsme enzymovou, proteinovou, molekulárně biologickou a histologickou analýzu vzorků jaterní fetální tkáně:

1. Byly izolovány mitochondrie ze 20 vzorků jaterní tkáně od potracených dětí v gestačním stáří 12 – 28 týdnů.

2. V mitochondriální frakci izolované ze vzorků fetální jaterní tkáně byly analyzovány aktivity komplexů I, II, I+III, II+III, III a IV dýchacího řetězce, kontrolního enzymu citrátsyntasy a pyruvátdehydrogenasy. Průměrné hodnoty specifických aktivit jednotlivých komplexů ve skupině vzorků jaterní fetální tkáně ve stáří 12 – 28 týdnů byly porovnány s hodnotami aktivit ve skupině starších kontrol. Aktivity komplexu I, II, citrátsyntasy a pyruvátdehydrogenasy byly významně sniženy oproti hodnotám v postnatální tkáni. Největší rozdíl byl naměřen u komplexu II. **Snížení aktivity komplexů III a IV v mitochondriální frakci nebylo statisticky významné.** Rozdíly v aktivitách ve fetální a postnatální jaterní tkáni korelují s výsledky pro svalovou tkáň.

3. Byly nalezeny optimální podmínky pro proteinovou analýzu vzorků fetální jaterní tkáně pomocí western blotu. Pomocí optimalizované metody bylo analyzováno proteinové množství pojednotek NDUFA9, SDHA, CORE 2, Cox1, Cox2, Cox5a, ATP F₁- α , ATP F₁- β , PDH-E2 a porin. Množství podjednotek bylo sniženo oproti kontrolním hodnotám u podjednotek komplexu III, IV, ATP syntasy a pyruvátdehydrogenasy. Množství proteinu bylo téměř totožné s kontrolami u komplexů I a II.

4. Ve vzorcích fetální jaterní tkáně byla provedena analýza množství mtDNA. Množství mtDNA s rostoucím gestačním stářím stoupalo.

5. V jednotlivých vzorcích jaterní tkáně byla analyzována úroveň hemopoese. Množství hemopoetických buněk bylo ve vzorku jaterní tkáně gestačního stáří 16 týdnů 25 % – 30 %, ve vzorku jaterní tkáně gestačního stáří 18 týdnů 50 % a ve vzorku jaterní tkáně gestačního stáří 23 týdnů 10 %.

6. Práce byla prezentována na konferenci: Dědičné Metabolické Poruchy, 21.pracovní dny, Sliach, květen 17-19. 2006 (prezentace formou posteru) a na 8. Studentské vědecké konferenci 1.LF UK, Praha, červen 22-23. 2007, (prezentace formou přednášky).
Abstrakta viz. příloha.

7. Seznam použité literatury

- 1 Altman, R. (1890) *Die Elementarorganismen und Ihre Beziehungen Zu Den Zellen*, Verlag von Veit., Leipzig
- 2 Zeman, J. (2002) *Posgraduální medicína* **7**, 535-43
- 3 Voet, D. and Voet, J. G. (2004) in *Biochemistry*, vol. **22** (Harris, D. and Fitzgerald, P., eds.), pp. 797-842
- 4 Koehler, C. M. and Bauer, M. F. (2004) in *Mitochondrial Function and Biogenesis*, vol. 1 (Hohmann, S., ed.), pp. 2-34
- 5 Lightowers, R. N., Chinnery, P. F., Turnbull, D. M. and Howell, N. (1997) *Trends Genet* **13**, 450-5
- 6 Taanman, J. W. (1999) *Biochim Biophys Acta* **1410**, 103-23
- 7 Koehler, C. M. and Bauer, M. F. (2004) in *Mitochondrial Function and Biogenesis*, vol. **7** (Hohmann, S., ed.), pp. 149-76
- 8 Hatefi, Y. (1985) *Annu Rev Biochem* **54**, 1015-69
- 9 Friedrich, T. and Bottcher, B. (2004) *Biochim Biophys Acta* **1608**, 1-9
- 10 Sazanov, L. A., Carroll, J., Holt, P., Toime, L. and Fearnley, I. M. (2003) *J Biol Chem* **278**, 19483-91
- 11 Sazanov, L. A. (2007) *Biochemistry* **46**, 2275-88
- 12 Sazanov, L. A. and Hinchliffe, P. (2006) *Science* **311**, 1430-6
- 13 Potluri, P., Yadava, N. and Scheffler, I. E. (2004) *Eur J Biochem* **271**, 3265-73
- 14 Friedrich, T. (2001) *J Bioenerg Biomembr* **33**, 169-77
- 15 Carroll, J., Shannon, R. J., Fearnley, I. M., Walker, J. E. and Hirst, J. (2002) *J Biol Chem* **277**, 50311-7
- 16 Janssen, R. J., Nijtmans, L. G., van den Heuvel, L. P. and Smeitink, J. A. (2006) *J Inherit Metab Dis* **29**, 499-515
- 17 Bai, Y. and Attardi, G. (1998) *Embo J.* **17**, 4848-58
- 18 Kirby, D. M., Salemi, R., Sugiana, C., Ohtake, A., Parry, L., Bell, K. M., Kirk, E. P., Boneh, A., Taylor, R. W., Dahl, H. H., Ryan, M. T. and Thorburn, D. R. (2004) *J Clin Invest* **114**, 837-45
- 19 Antonicka, H., Ogilvie, I., Taivassalo, T., Anitori, R. P., Haller, R. G., Vissing, J., Kennaway, N. G. and Shoubridge, E. A. (2003) *J Biol Chem* **278**, 43081-8
- 20 Chomyn, A. (2001) *J Bioenerg Biomembr* **33**, 251-7
- 21 Bourges, I., Ramus, C., Mousson de Camaret, B., Beugnot, R., Remacle, C., Cardol, P., Hofhaus, G. and Issartel, J. P. (2004) *Biochem J* **383**, 491-9
- 22 Chevallet, M., Dupuis, A., Lunardi, J., van Belzen, R. and Albracht, S. (1997) *Eur J Biochem* **250**, 451-8.
- 23 Schulte, U., Fecke, W., Krull, C., Nehls, U., Schmiede, A., Schneider, R., Ohnishi, T. and Weiss, H. (1994) *Biochim Biophys Acta* **1187**, 121-4
- 24 Kita, K., Vibat, C. R., Meinhardt, S., Guest, J. R. and Gennis, R. B. (1989) *J Biol Chem* **264**, 2672-7
- 25 Capaldi, R. A., Sweetland, J. and Merli, A. (1977) *Biochemistry* **16**, 5707-10
- 26 Horsefield, R., Yankovskaya, V., Sexton, G., Whittingham, W., Shiomi, K., Omura, S., Byrne, B., Cecchini, G. and Iwata, S. (2006) *J Biol Chem* **281**, 7309-16
- 27 Ackrell, B. A. (2000) *FEBS Lett* **466**, 1-5

- 28 Capaldi, R. A. (1982) *Biochim Biophys Acta* **694**, 291-306
- 29 Berry, E. A., Guergova-Kuras, M., Huang, L. S. and Crofts, A. R. (2000) *Annu Rev Biochem* **69**, 1005-75
- 30 Rieske, J. S., Hansen, R. E. and Zaugg, W. S. (1964) *J Biol Chem* **239**, 3017-22
- 31 Kim, C., Balny, C. and King, T. (1987) *J Biol Chem* **262**, 8103-8
- 32 Stiburek, L., Hansikova, H., Tesarova, M., Cerna, L. and Zeman, J. (2007) *Physiol Res* **55**, S27-41
- 33 Capaldi, R. A. (1990) *Arch Biochem Biophys* **280**, 252-62
- 34 Stiburek, L., Vesela, K., Hansikova, H., Pecina, P., Tesarova, M., Cerna, L., Houstek, J. and Zeman, J. (2005) *Biochem J* **392**, 625-32
- 35 Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R. and Yoshikawa, S. (1996) *Science* **272**, 1136-44
- 36 Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R. and Yoshikawa, S. (1995) *Science* **269**, 1069-74
- 37 Gilderson, G., Salomonsson, L., Aagaard, A., Gray, J., Brzezinski, P. and Hosler, J. (2003) *Biochemistry* **42**, 7400-9
- 38 Taanman, J. W. (1997) *J Bioenerg Biomembr* **29**, 151-63
- 39 Margeot, A., Garcia, M., Wang, W., Tetaud, E., di Rago, J. P. and Jacq, C. (2005) *Gene* **354**, 64-71
- 40 Wikstrom, M., Jasaitis, A., Backgren, C., Puustinen, A. and Verkhovsky, M. I. (2000) *Biochim Biophys Acta* **1459**, 514-20
- 41 Carr, S. H. (2003) *Acc. Chem. Res.* **36**, 309-16
- 42 Nijtmans, L. G., Taanman, J. W., Muijsers, A. O., Speijer, D. and Van den Bogert, C. (1998) *Eur J Biochem* **254**, 389-94
- 43 Williams, S. L., Valnot, I., Rustin, P. and Taanman, J. W. (2004) *J Biol Chem* **279**, 7462-9
- 44 Hiser, L., Di Valentin, M., Hamer, A. and Hosler, J. (2000) *J Biol Chem* **275**, 619-23
- 45 Schagger, H. and Pfeiffer, K. (2000) *Embo J* **19**, 1777-83
- 46 Schafer, E., Seelert, H., Reifschneider, N. H., Krause, F., Dencher, N. A. and Vonck, J. (2006) *J Biol Chem* **281**, 15370-5
- 47 Stiburek, L., Hansikova, H., Tesarova, M., Cerna, L. and Zeman, J. (2007) *Physiol Res* **55 Suppl 2**, S27-41
- 48 Walker, J. E. and Collinson, I. R. (1994) *FEBS Lett* **346**, 39-43
- 49 Abrahams, J., Leslie, A., Lutter, R. and Walker, J. (1994) *Nature* **370**, 621-8
- 50 Papa, S., Zanotti, F., Cocco, T., Perrucci, C., Candita, C. and Minuto, M. (1996) *Eur J Biochem* **240**, 461-7
- 51 Guerrieri, F., Capozza, G., Houstek, J., Zanotti, F., Colaianni, G., Jirillo, E. and Papa, S. (1989) *FEBS Lett* **250**, 60-6
- 52 Tomashuk, J. J. and Brusilow, W. S. (2000) *J Bioenerg Biomembr* **32**, 493-500
- 53 Boyer, P. D. (1993) *Biochim Biophys Acta* **1140**, 300 - 309
- 54 Capaldi, R. A. and Aggeler, R. (2002) *Trends Biochem Sci* **27**, 154 - 60
- 55 Schagger, H. (2002) *Biochim Biophys Acta* **1555**, 154-9
- 56 Pfanner, N. and Geissler, A. (2001) *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 339-49
- 57 Gething, M. J. and Sambrook, J. (1992) *Nature* **355**, 33-45
- 58 Maas, E. and Bisswanger, H. (1990) *FEBS Lett* **277**, 189-90

- 59 Zhou, Z. H., McCarthy, D. B., O'Connor, C. M., Reed, L. J. and Stoops, J. K. (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 14802-7
- 60 Khailova, L. S., Korochkina, L. G. and Severin, S. E. (1989) *Ann N Y Acad Sci* **573**, 36-54
- 61 Cuezva, J. M., Valcarce, C., Luis, A. M., Izquierdo, J. M., Alconada, A., Ostronoff, L. K., Flores, A., Liras, A. and Chamorro, M. (1992) in *Proc Int Symp Physiologic Basic of prenatal Care*, pp. 47-62, Madrid
- 62 Sauer, P. J., Carnielli, V. P., Sulkers, E. J. and van Goudoever, J. B. (1994) *Acta Paediatr Suppl* **405**, 49-53
- 63 Valcarce, C., Navarrete, R. M., Encabo, P., Loeches, E., Satrustegui, J. and Cuezva, J. M. (1988) *J Biol Chem* **263**, 7767-75
- 64 Pollak, J. K. (1975) *Biochem J* **150**, 477-88
- 65 Pollak, J. K. and Sutton, R. (1980) *Biochem J* **192**, 75-83
- 66 Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) *J Biol Chem* **193**, 265-75
- 67 Bradford, M. M. (1976) *Anal Biochem* **72**, 248-54
- 68 Srere, P. A. (1969) *Citrate synthase*, vol. 13
- 69 Rustin, P., Chretien, D., Bourgeron, T., Gerard, B., Rotig, A., Saudubray, J. M. and Munnich, A. (1994) in *Clin Chim Acta*, vol. 228, pp. 35-51
- 70 Sheu, K. F., Hu, C. W. and Utter, M. F. (1981) *J Clin Invest* **67**, 1463-71
- 71 Sperl, W., Ruitenbeek, W., Kerkhof, C. M., Sengers, R. C., Trijbels, J. M., Guggenbichler, J. P., Janssen, A. J. and Bakkeren, J. A. (1990) *Eur J Pediatr* **149**, 487-92
- 72 Schagger, H. and von Jagow, G. (1991) *Anal Biochem* **199**, 223-31
- 73 Pollak, J. K. and Duck-Chong, C. G. (1973) *Enzyme* **15**
- 74 Nakazawa, T., Asami, K., Suzuki, H. and Yukawa, O. (1973) *J. Biochem* **73**, 397-406
- 75 Valcarce, C., Izquierdo, J. M., Chamorro, M. and Cuezva, J. M. (1994) *Biochem J* **303**, 855-62
- 76 Sato, I., Konishi, K., Mikami, A. and Sato, T. (2000) *Okajimas Folia Anat Jpn* **76**, 353-61
- 77 Schmidt, I. and Herpin, P. (1997) *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **118**, 639-47
- 78 Marin-Garcia, J., Ananthakrishnan, R., Agrawal, N. and Goldenthal, M. J. (1994) *J Mol Cell Cardiol* **26**, 1029-36
- 79 Bonne, G., Seibel, P., Possekkel, S., Marsac, C. and Kadenbach, B. (1993) *Eur J Biochem* **217**, 1099-107
- 80 Wenchich, L., Zeman, J., Hansikova, H., Plavka, R., Sperl, W. and Houstek, J. (2002) *Biol Neonate* **81**, 229-35
- 81 Marin-Garcia, J., Ananthakrishnan, R. and Goldenthal, M. J. (2000) *Mol Cell Biochem* **210**, 47-52
- 82 Honzik, T., Wenchich, L., Bohm, M., Hansíková, H., Pejznochová, M., Zapadlo, M., Plavka, R. and Zeman, J. (2005)
- 83 Ikegaya, H., Iwase, H., Hatanaka, K., Sakurada, K., Matsuda, Y., Kobayashi, M. and Takatori, T. (2000) *Forensic Sci Int* **108**, 181-6
- 84 Chandra, S. R. (1997) in *Potter's Pathology of the fetus and infant*, vol. 2 (Gilbert-Barness, E., ed.), pp. 823-27
- 85 Honzik, T. (2006) in *First Faculty of Medicine, Charles University, Prague*

- 86 Sperl, W., Sengers, R. C., Trijbels, J. M., Ruitenbeek, W., De Graaf, R., Ter Laak,
H., Van Lith, T., Kerkhoff, C. and Janssen, A. (1992) *Biol Neonate* **61**, 188-200
- 87 Nakai, A., Taniuchi, Y., Asakura, H., Oya, A., Yokota, A., Koshino, T. and Araki,
T. (2000) *Brain Res Dev Brain Res* **121**, 67-72
- 88 Kalous, M., Rauchova, H. and Drahota, Z. (2001) *Physiol Res* **50**, 315-9
- 89 Papa, S. (1996) *Biochim Biophys Acta* **1276**, 87-105
- 90 Prieur, B., Cordeau-Lossouarn, L., Rotig, A., Bismuth, J. and Geloso, J.-P. (1995)
Biochem J **305**, 675-80
- 91 Serrano, E., Luis, A. M. and Encabo, P. (1989) *Ann NY Acad Sci* **573**, 412-15
- 92 Rossignol, R., Faustin, B., Rocher, C., Malgat, M., Mazat, J. P. and Letellier, T.
(2003) *Biochem J* **370**, 751-62
- 93 Drahota, Z., Milerová, M., Stieglerová, A. and Houstek, J. (2004) *Physiol Res* **53**,
119-22
- 94 Grivennikova, V. G., Kapustin, A. N. and Vinogradov, A. D. (2001) *J.Biol.Chem.*
277, 17970-77
- 95 Hulbert, J. A., Turner, N., Hinde, J., Else, P. and Guderley, H. (2006) *J. Comp*
Physiol B **176**, 93-5
- 96 Luit, H., Berger, R. and Hommes, F. (1975) *Biol Neonate* **26**, 1-8
- 97 Vázquez - Memije, M. E., Cárdenas- Méndez, M. J., Tolosa, A. and Hafidi, E. M.
(2005) *Experimental Gerontology* **40**, 482-90
- 98 Heerdt, B. and Augenlicht, L. (1990) *Exp Cell Res* **186**, 54-9
- 99 Gadeleta, M. N., Rainaldi, G., Lezza, A. M. S., Milella, F., Fracasso, F. and
Cantatore, P. (1992) *Mut Res* **275**, 181-93
- 100 Nicklas, J. A., Brooks, E., Hunter, T. C., Single, R. and R.F., B. (2004) *Env Mol*
Mut **44**, 313-20
- 101 Barrientos, A., Casademont, J., Cardellach, F., Adrite, E., Estivil, X., Urbano-
Marquez A, Fernandez-Checa, J. C. and Nunes, V. (1997) *Biochem Mol Med* **62**,
165-71

Finálny program

21. pracovné dni **DEDIČNÉ METABOLICKÉ PORUCHY**

17. – 19. mája 2006

Hotel Kaskády, Sliač – Sielnica



DETSKÁ FAKULTNÁ NEMOCNICA S POLIKLINIKOU BANSKÁ BYSTRICA
FAKULTNÁ NEMOCNICA S POLIKLINIKOU F. D. ROOSEVELTA BANSKÁ BYSTRICA
REGIONÁLNA LEKÁRSKA KOMORA BANSKÁ BYSTRICA



AKCIA JE ORGANIZOVANÁ V SPOLUPRÁCI SO
Slovenskou pediatrickou spoločnosťou SLS

HLAVNÍ SPONZORI:

NUTRICIA

milupa
NAŠE ZNALOSTI A VAŠE PÉČE

SHS
INTERNATIONAL

Studium maturace komplexů dýchacího řetězce v jaterní tkáni v prenatálním období

Havlíčková V, Stibůrek L, Honzík T, Pejznochová M, Magner M., Hansíková H, Zeman J,

Klinika Dětského a dorostového lékařství, Praha

Fetální období je charakterizováno rozsáhlou kaskádou vývojových stádií, která jsou kontrolována genetickými faktory i vlivy zevního prostředí. Většina nemocí u velmi nezralých dětí jsou sekundárního původu z důvodu nezralosti různých tkání i organel buňky včetně mitochondriálních funkcí. Maturace mitochondriálního energetického systému může u novorozenců s nízkou porodní hmotností výrazně ovlivnit novorozeneckou morbiditu.

Cílem naší studie bylo analyzovat aktivity, množství a složení komplexů dýchacího řetězce v jaterní tkáni různého gestačního stáří

Metody: Mitochondriální frakce byla připravena diferenční centrifugací ve vzorku odebrané jaterní tkáně u 9 velmi nezralých plodů (12-23 týden gestace) bezprostředně po potratu. Kontrolní skupinu tvořilo 7 vzorků jaterní tkáně od dětí ve věku 2 měsíce - 5 let, u kterých nebylo prokázáno mitochondriální onemocnění. Aktivity NADH:Q10 oxidoreduktázy (komplexu I), sukcinát:Q10 oxidoreduktázy (komplexu II), Q10H2: cytochrom c reduktázy (komplexu III), NADH:cytochrom c oxidoreduktázy, (komplexu I+III), sukcinát: cytochrom c reduktázy (komplexu II+III), a cytochrom c oxidázy (komplexu IV) a kontrolního enzymu citrát syntázy byly měřeny spektrofotometricky. Množství a složení jednotlivých komplexů dýchacího řetězce bylo analyzováno pomocí 2D-PAGE. Kvantitativní analýza obsahu jednotlivých proteinů oxidativní fosforylace byla provedena pomocí western blotu s využitím baterie specifických protilátek.

Výsledky: Aktivity komplexů I, II, II+III, a I+III byly významně sniženy, komplexů I, III a citrát syntázy mírně sniženy a komplexu IV srovnatelné s aktivitami komplexů dýchacího řetězce v kontrolní skupině. **Blue-nativní elektroforéza prokázala signifikantně snížené množství komplexů I, III, IV a V ve srovnání s kontrolním materiálem.**

Závěr: V tkáních velmi nezralých novorozenců je obtížné rozlišit, zda změny v aktivitách dýchacího řetězce jsou způsobeny primární (dědičnou) poruchou na úrovni dýchacího řetězce a nebo získány sekundárně z důvodu nezralosti nebo vnějších faktorů, jako je například zvýšená degradace proteinů při sepsi. Studie přispívá ke zjištění specifických aktivit a množství komplexů dýchacího řetězce v jaterní tkáni během vývoje.

Podporováno GAUK 16/2004

STUDIUM MITOCHONDRIÁLNÍHO ENERGETICKÉHO METABOLISMU VE FETÁLNÍ JATERNÍ TKÁNI

Autoři: Havlíčková V, Stibůrek L, , Pejznochová M., Honzík T, Magner M,
Hůlková H., Zeman J, Hansíková H.

Školitel: RNDr.Hana Hansíková, CSc, Klinika Dětského a dorostového
lékařství 1. LF UK a VFN

V tkáních nezralých novorozenců je obtížné rozlišit, zda změny v aktivitách dýchacího řetězce (RC) jsou způsobeny dědičnou poruchou nebo jsou získány sekundárně působením zevních faktorů či nezralostí.

Cílem studie bylo analyzovat aktivity, množství a složení komplexů RC, citrát syntázy (CS) a pyruvátdehydrogenázy (PDH) v jaterní tkáni potracených plodů různého gestačního stáří.

Materiál a metody: Soubor tvořilo 20 vzorků jaterní tkáně odebraných bezprostředně po potratu plodu ve 12-28. týdnu gestace. Kontrolní skupinu tvořilo 10 autoptických vzorků jaterní tkáně od dětí (0 - 8 let), u kterých nebylo prokázáno mitochondriální onemocnění. Aktivity komplexů I, II, III, IV dýchacího řetězce a CS byly měřeny spektrofotometricky v mitochondriích izolovaných ze zamražené jaterní tkáně. Aktivita PDH byla měřena radioizotopově. Množství a složení jednotlivých komplexů RC a PDH bylo analyzováno pomocí 2D-PAGE a western blotu. mtDNA byla kvantifikována pomocí real-time PCR.

Výsledky: Aktivity komplexů I, II, III, IV dýchacího řetězce, PDH a CS byly významně sniženy v porovnání s aktivitami komplexů RC v kontrolní skupině. Nejvýraznější rozdíly byly nalezeny u komplexu I, II a CS. Množství komplexů I, II, III, IV, V a PDH bylo sniženo ve srovnání s kontrolním materiálem. Množství mtDNA stoupalo v závislosti na týdnu gestace.

Závěr: Z naší studie vyplývá, že pro správnou biochemickou diagnostiku mitochondriálních onemocnění v jaterní tkáni v neonatálním období, obdobně jako ve svalové tkáni, jsou nezbytné věku odpovídající referenční hodnoty. *Podporováno IGA MZ NR-9410-3*

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a adresa	Číslo občanského průkazu	Datum vypůjčení	Poznámka