

## Abstrakt

System oxidační fosforylace (OXPHOS) je zodpovědný za produkci naprosté většiny ATP v savčích organismech. Tento proces, lokalizovaný ve vnitřní mitochondriální membráně, je mimo jiné regulován jaderně kódovanými podjednotkami cytochrom *c* oxidázy (COX), která je terminálním enzymem elektron transportního řetězce. Podjednotka Cox4 se účastní regulace OXPHOS systému a spolu s podjednotkou Cox1 utváří první intermediát v sestavování COX. Není-li tento intermediát správně sestaven, nedojde následně ke vložení Cox2 katalytické podjednotky a tím k maturaci katalyticky funkčního COX enzymu. Mimo to je Cox4 podjednotka přítomna ve dvou izoformách (Cox4i1, Cox4i2), které hypoteticky slouží k optimalizaci funkce respiračního řetězce během změn v zásobování tkání kyslíkem. Funkční dopad výměny izoform nebyl nicméně doposud v savčích tkáních a buňkách podrobně prozkoumán.

V rámci této práce byly pomocí CRISPR CAS9-10A párující nikázy připraveny jedinečné modely HEK293 buněk s úplnou absencí (knock-out, KO) podjednotky Cox4, a byly dále charakterizovány. Vyřazení funkce obou izoform Cox4i1 a Cox4i2 (COX4i1/4i2 KO klony) vedlo ke generalizovanému snížení COX podjednotek spojenému s úplnou absencí sestavené COX. Množství detekovaných podjednotek komplexu I, stejně jako obsah sestaveného komplexu I, byly sníženy u COX4i1/4i2 KO klonů. Naopak, množství komplexu II, komplexu III a komplexu V nebylo výrazně narušeno. V souladu s tímto pozorováním i metabolické značení 13 mitochondriálně kódovaných proteinů odhalilo narušení proteosyntézy podjednotek COX i komplexu I, zatímco komplex III a komplex V nebyly ovlivněny. Změny mitochondriální proteosyntézy rovněž korelovaly se sníženým množstvím mitochondriálních ribozomálních proteinů. Dle očekávání nebyla u COX4i1/4i2 KO klonů detekována mitochondriální respirace, jejíž nefunkčnost byla kompenzována zvýšenou glykolytickou kapacitou.

COX4i1/4i2 KO modely připravené v HEK293 buněčné linii vykazovaly fenotyp úplné ztráty COX, vedoucí k plné závislosti buněk na nemitochondriální ATP produkci. Navrhujeme, že narušení mitochondriální proteosyntézy představuje sekundární efekt dysfunkce elektron transportního řetězce. COX4i1/4i2 dvojité KO klony připravené v rámci předkládané diplomové práce budou použity jako nástroj pro vytvoření knock-in modelů Cox4i1 i Cox4i2 izoformy, které poslouží k objasnění jejich biologické úlohy.

**Klíčová slova:** cytochrom *c* oxidáza, COX, Cox4 izoformy, Cox4i1, Cox4i2, CRISPR