

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

**Katedra biochemie**

CHARAKTERIZACE RESPIRAČNÍCH SUPERKOMPLEXŮ  
V RŮZNÝCH TYPECH SAVČÍCH MITOCHONDRIÍ

Diplomová práce

studijního oboru Klinická a toxikologická analýza

Vedoucí diplomové práce :

MUDr. Josef Houštěk, DrSc. (Oddělení bioenergetiky, Fyziologický ústav AV ČR)

Doc. RNDr. Jiří Hudeček, CSc.

Praha 2008

Nikola Kovářová

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele MUDr. Josefa Houšťka, DrSc. a konzultanta Mgr. Petra Peciny, PhD., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze (a pracoviště školitele MUDr. Josefa Houšťka, DrSc.) je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity (nebo pracoviště školitele MUDr. Josefa Houšťka, DrSc.).

V Praze dne...*5. 5. 2008*.....

*Nikola Kovářová*  
.....

Nikola Kovářová

## **Poděkování:**

Jsem velmi ráda, že mi bylo umožněno věnovat se zajímavé práci v laboratoři bioenergetiky AV ČR pod vedením pana MUDr. Josefa Houšťka. Získala jsem zde mnoho nových praktických zkušeností v laboratoři i mnoho vědomostí. Panu doktorovi Houšťkovi bych chtěla poděkovat hlavně za poskytnutí cenných rad, trpělivost a pomoc v celém průběhu mé diplomové práce. Děkuji panu Doc. Jiřímu Hudečkovi, který podporoval mou diplomovou práci jako interní školitel. Mé poděkování patří také konzultantovi panu doktorovi Petrovi Pecinovi, který mě naučil, jak správně přistupovat k řešení dané problematiky. Jeho zkušenosti a rady mi při vypracovávání diplomové práce byly velmi nápomocné. Za pomoc a konzultace děkuji i panu Mgr. Janu Paulovi. Mojí práci mi denně zpříjemňovala pohodová a přátelská atmosféra v laboratoři, o kterou se zasloužil celý kolektiv. Za stálou podporu během mého studia, nepostradatelné příjemné domácí zázemí, lásku a důvěru nesmírně děkuji svým rodičům.

Práce byla podporovaná Grantovou Agenturou České Republiky (303/07/0781).

## Obsah:

Seznam zkratk a chemických značek .....	6
Seznam veličin a jednotek .....	7
Vysvětlivky .....	8
Seznámení s problematikou .....	9
1. Úvod .....	10
1.1 Mitochondrie .....	10
1.2 Dýchací řetězec .....	12
1.3 Komplexy dýchacího řetězce .....	13
1.3.1 Komplex I (NADH-CoQ oxidoreduktasa) .....	13
1.3.2 Komplex II (sukcinát-CoQ oxidoreduktasa) .....	14
1.3.3 Komplex III (cytochrom <i>bc<sub>1</sub></i> komplex) .....	16
1.3.4 Komplex IV (cytochrom <i>c</i> oxidasa) .....	17
1.3.5 Komplex V (ATP syntasa) .....	19
1.4 Biogeneze komplexů dýchacího řetězce .....	21
1.4.1 Biogeneze komplexu I .....	21
1.4.2 Biogeneze komplexu II .....	22
1.4.3 Biogeneze komplexu III .....	22
1.4.4 Biogeneze komplexu IV .....	23
1.4.5 Biogeneze ATP syntasy .....	23
1.5 Modely dýchacího řetězce .....	25
1.6 Superkomplexy dýchacího řetězce .....	25
1.6.1 Kardiolipin .....	27
1.6.2 Charakterizace struktury OXPHOS superkomplexů .....	28
1.6.3 Stechiometrie komplexů v superkomplexech .....	33
1.6.4 Superkomplexy savčích mitochondrií .....	33
1.6.5 Role superkomplexů v lidské fyziologii a patofyziologii .....	33
1.7 Mitochondriální onemocnění .....	34
1.7.1 Mitochondriální onemocnění způsobená mutacemi v mtDNA .....	34
1.7.2 Mitochondriální onemocnění způsobená mutacemi v nDNA .....	35
1.7.3 Mitochondriální onemocnění spojená s poruchou assemblace COX .....	36
1.7.3.1 Surf1 protein – asemblační faktor cytochrom <i>c</i> oxidasy .....	37
2. Cíl práce .....	40
3. Použité přístroje a chemikálie .....	41

4. Experimentální část .....	41
4.1 Experimentální modely .....	41
4.2 Izolace mitochondrií z myších tkání .....	41
4.2.1 Izolace mitochondrií ze svalu .....	41
4.2.2 Izolace mitochondrií z jater .....	42
4.2.3 Izolace srdečních mitochondrií .....	42
4.2.4 Izolace mitochondrií z fibroblastů .....	42
4.2.4.1 Sklizení buněk .....	42
4.2.4.2 Izolace mitochondrií .....	43
4.3 Stanovení koncentrace proteinů podle Bradfordové .....	43
4.4 Separační elektroforetické metody .....	44
4.4.1 Nativní elektroforéza (BN-PAGE) .....	46
4.4.1.1 Příprava vzorků .....	46
4.4.1.2 Pracovní postup .....	46
4.4.2 2D elektroforéza BN-PAGE/SDS-PAGE, pracovní postup .....	47
4.4.3 2D nativní elektroforéza (BN-PAGE/BN-PAGE), pracovní postup .....	48
4.5 Western-blot a imunodetekce na PVDF membráně .....	48
4.5.1 Elektrotransfer na PVDF membránu .....	48
4.5.2 Imunodetekce na PVDF membráně .....	49
4.6 Kvantifikace respiračních komplexů ve volné formě a v superkomplexech .....	50
4.7 Barvení gelů Coomassie blue R-250 barvou .....	50
5. Výsledky .....	51
5.1 Solubilizace respiračních komplexů lauroyl maltosidem a digitoninem .....	51
5.2 Analýza složení superkomplexů v myších tkáních pomocí 2D BN-PAGE/SDS-PAGE elektroforézy .....	52
5.3 Analýza složení superkomplexů v lidských fibroblastech pomocí 2D BN-PAGE/SDS-PAGE elektroforézy .....	55
5.4 Kvantitativní analýza jednotlivých forem komplexů dýchacího řetězce .....	57
5.4.1 Formy komplexu IV v myších tkáních a lidských fibroblastech .....	57
5.4.1.1 COX superkomplexy v myších tkáních a lidských fibroblastech .....	59
5.4.2 Formy komplexu I v myších tkáních a lidských fibroblastech .....	59
5.4.3 Formy komplexu III v myších tkáních a lidských fibroblastech .....	60
5.5 Identifikace jednotlivých OXPHOS komplexů v superkomplexech pomocí 2D BN-PAGE/BN-PAGE elektroforézy .....	61

6. Diskuze .....	65
7. Závěr .....	68
8. Seznam literatury .....	69
Příloha	

## Seznam zkratek a chemických značek

ATP	adenosintrifosfát
ADP	adenosindifosfát
Bis-Tris	bis-(2-hydroxyethyl)-imino-tris-(hydroxymethyl)-methan
BSA	hovězí sérový albumin
bp	párů basí
CoQ	koenzym Q
COX	cytochrom <i>c</i> oxidasa
CO <sub>2</sub>	oxid uhličitý
2D	dvourozměrný
DMEM	kultivační médium (obsahující L-glutamin, pyruvát sodný a 4,5 g/l glukosy)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EGTA	kyselina ethylen glykol bis-(β-aminoethyl ether) N,N,N',N' - tetraoctová
FADH <sub>2</sub>	redukovaný flavinadenosindinukleotid
HEPES	N-2- hydroxyethylpiperazin-N' -ethan sulfonová kyselina
HCl	kyselina chlorovodíková
Hsp	„Heat shock proteins“ (proteiny teplotního šoku)
H <sub>2</sub> O	voda
IR	infračervená oblast
LM	lauroyl maltosid (n-dodecyl β-D-maltosid)
KCl	chlorid draselný
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	dihydrogenfosforečnan draselný
MB2	mitochondriální pufr
mRNA	messengerová ribonukleová kyselina
NADH	redukovaný nikotinadenosindifosfát
NaCl	chlorid sodný
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného
NaOH	hydroxid sodný
OXPHOS	system oxidační fosforylace
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza

PBS	fyzilogický roztok pufovaný fosfátem
PIC	proteinový inhibiční koktejl
PVDF	polyvinylidenfluorid
RNA	ribonukleová kyselina
rRNA	ribosomální ribonukleová kyselina
SBG	Serva blue G barvivo
SDS	dodecylsulfát sodný
TEMED	N, N, N', N' - tetraethylendiamin
Tricin	N, tris(hydroxymethyl)-aminoethan
Tris	bis[2-hydroxyethyl]-tris[hydroxymethyl]methylamin
Triton X-100	p-isooctylphenoxy-polyethoxyethanol
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
Tween 20	polyoxyethylensorbitanmonolaurát

### Seznam veličin a jednotek

Å	angström, jednotka délky (1 angström = $10^{-10}$ m)
AU	arbitrární jednotka (bez vazby na jednotku systému SI)
cm <sup>2</sup>	centimetr čtvereční, jednotka velikosti plochy
g	gram, hmotnostní jednotka
g	gravitační zrychlení ( $9,81 \text{ m.s}^{-2}$ )
h	hodina, časová jednotka
kDa	kilodalton, jednotka pro molekulovou hmotnost proteinů (1 dalton = 1u = $1,660\ 53 \cdot 10^{-27}$ kg)
M	molární, vyjadřuje molaritu roztoku (jednotka mol/l)
mA	miliampér, jednotka proudu
mg	miligram, hmotnostní jednotka
mg/ml	miligram na mililitr, jednotka hmotnostní koncentrace
ml	mililitr, objemová jednotka
mM	milimolární, vyjadřuje molaritu roztoku (jednotka mmol/l)
mm	milimetr, jednotka délky
nm	nanometr, jednotka vlnové délky
rpm	počet otáček za minutu



s	sekunda, časová jednotka
u/ml	jednotka na mililitr, penicilinová jednotka (vyjadřuje penicilinovou aktivitu 0,6 µg penicilinu G)
V	volt, jednotka napětí
V	objem, základní jednotkou je litr
µg/ml	mikrogram na mililitr, jednotka hmotnostní koncentrace
µm	mikrometr, jednotka délky
°C	Celsiův stupeň, jednotka teploty

### Vysvětlivky

Alexa Fluor 680

(goat-anti-mouse IgG)

sekundární protilátka proti myšímú imunoglobulin G (kozí, značená fluorescenčně)

asemblace

sestavování

Housekeepingové geny

udržovací geny nutné pro fungování organismu

Chaperony

proteiny, které pomáhají bílkovinám nalézt prostorové uspořádání odpovídající nativní konformaci, zabraňují bílkovinám svinout se předčasně a brání intermolekulárním interakcím ještě nesbalených bílkovin a tím i jejich precipitaci

knock-out genu

vyřazení genu

PIC

směs proteasových inhibitorů pro užití se savčími buňkami a tkáňovými extrakty

Složení: Aprotinin, Leupeptin, Bestatin, EG64, Pepstatin, AEBSF – 4-(2-aminoethyl)benzensulfonylfluorid

substrátový channelling

přímý přenos substrátů (intermediátů) k cílovému enzymu

## Seznámení s problematikou

Mitochondriální oxidační fosforylace je velmi důležitá metabolická dráha z hlediska produkce ATP u většiny eukaryotických organismů. Probíhá ve vnitřní mitochondriální membráně, kde se nachází oxidačně fosforylační systém - dýchací řetězec. Dýchací řetězec je tvořen enzymovými komplexy, které spolu ve vnitřní mitochondriální membráně asociují za tvorby strukturně vyšších jednotek zvaných respirační superkomplexy. V savcích mitochondriích jsou tyto superkomplexy složeny z respiračních komplexů I, III a IV.

Cílem této studie bylo zjistit, v jakém množství se superkomplexy v různých myších tkáních nacházejí a jaké je jejich složení vzhledem k fyziologické funkci a energetickému obratu dané tkáně. Pro analýzu jsme použili různé elektroforetické metody (BN-PAGE, 2D BN-PAGE/SDS-PAGE, 2D BN-PAGE/BN-PAGE) v kombinaci s Western blotem a imunodetekcí specifickými protilátkami. Protože většina popsaných superkomplexů obsahuje cytochrom *c* oxidasu (COX), zaměřili jsme se na výskyt COX v superkomplexech v mitochondriích izolovaných z jater, srdce, mozku, svalu a fibroblastů kontrolních myší a COX-defektních myší s knock-outem *SURF1* genu. Absence Surf1 proteinu, specifického asemblačního faktoru COX, způsobuje deficit COX různé intenzity v jednotlivých tkáních. Získané výsledky jsme porovnali s lidskými fibroblasty, kontrolními a od pacienta s defektem COX způsobeným mutací *SURF1* genu, které jsme analyzovali stejným způsobem.

Zjistili jsme, že v myších tkáních jsou přítomné superkomplexy I-III<sub>2</sub> a III<sub>2</sub>-IV, jak u kontroly, tak u COX-defektních myší. Superkomplex I-III<sub>2</sub>-IV byl přítomen v malém množství pouze v myších fibroblastech. V mitochondriích z COX-defektních myší bylo množství superkomplexu III<sub>2</sub>-IV snižené, zatímco množství I-III<sub>2</sub> se od kontroly výrazně nelišilo. COX byla přítomna hlavně v monomerní i dimerní formě a její množství v mitochondriích COX-defektních myší bylo snižené. V mitochondriích z lidských fibroblastů byl detekován superkomplex I-III<sub>2</sub>-IV a III<sub>2</sub>-IV a deficit COX se výrazně projevil jako snížené množství COX-superkomplexů u pacienta.

Naše výsledky ukazují na tkáňově a druhově specifické rozdíly v asemblaci a kompozici respiračních superkomplexů v savcích mitochondriích.

# 1. Úvod

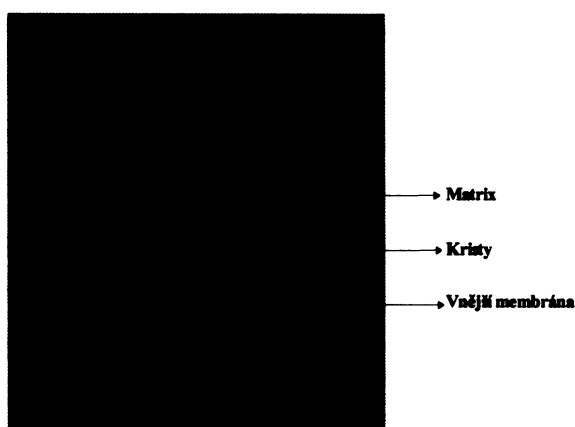
## 1.1 Mitochondrie

Mitochondrie jsou přítomny téměř ve všech eukaryotních buňkách – u rostlin, živočichů a ve většině nižších eukaryontů (někteří prvoci jsou amitochondriální, jako například *Giardia*, *Entamoeba*, *Trichomonas*...). Jsou místem velkého počtu metabolických drah a slouží jako hlavní producenti ATP – univerzálního energetického paliva. Podle endosymbiotické teorie primitivní anaerobní eukaryonta (nebo prokaryonta) byla schopna endocytovat aerobní purpurové bakterie (pozdější mitochondrie). Bakterie se adaptovaly na nové podmínky, tj. vnitřní prostředí hostitele, a začaly žít se svým hostitelem v endosymu. Fúzí purpurových fotosyntetizujících bakterií řadících se mezi *Eubacteria* s buňkami vývojové větve *Urakarya* došlo ke vzniku eukaryont obsahujících mitochondrie [1]. Ustavená symbióza vedla ke ztrátě přebytečných genů, přenosu genů z bakterie do jádra a k následné distribuci genů mezi dvěma genomy, jaderným a mitochondriálním [3]. Eukaryotní buňka zajišťuje mitochondriím jejich rozmnožování a proteosyntézu. Tento vzájemný vztah je nyní tak silný, že žádná eukaryonta nemohou přežít bez mitochondrií a fotoautotrofní eukaryonta jsou kromě mitochondrií také životně závislá na chloroplastech.

Obecně jsou mitochondrie podobné svou velikostí a tvarem bakteriím a jsou obvykle zobrazovány jako podlouhlé oválné útvary o velikosti 0,5-1  $\mu\text{m}$  (obr. 1). Zrychlené záběry živých buněk ukazují mitochondrie jako pozoruhodně pohyblivé orgány, které neustále mění tvar a polohu. V buňce jsou přítomny ve velkém množství a ve spojení s mikrotubuly cytoskeletu mohou vytvářet dlouhé pohyblivé seřetězce. V jiných buňkách zůstávají vázány v jednom místě, aby dodávaly ATP přímo do míst jeho vysoké spotřeby. Obsahují svou vlastní DNA a RNA a uskutečňují transkripci a translaci pomocí vlastních ribosomů, které jim umožňují syntetizovat proteiny kódované mitochondriální DNA (mtDNA).

Každá mitochondrie má dvě membrány tvořené fosfolipidovou dvojvrstvou, vnitřní a vnější, které oddělují dva mitochondriální kompartmenty – vnitřní prostor zvaný matrix a, mnohem užší, zevní mezimembránový prostor. V mitochondriální *matrix* jsou lokalizovány, kromě enzymů Krebsova cyklu, mitochondriální DNA, ribosomů a dalších komponent, také proteiny tepelného šoku (chaperony - proteinových rodin hsp70 a hsp60), které spolu s extramitochondriálními chaperony katalyzují transport a změny konformace prekurzorových proteinů směřujících do mitochondrie [4]. Chaperony udržují tyto proteiny v rozvinuté formě a umožňují tak jejich transport přes translokátory (TOM a TIM) umístěné v mitochondriálních membránách. K transportu a k úpravám přenášeného proteinu je potřeba energie, proto při

těchto procesech dochází ke spotřebě ATP. Hladká **vnější membrána** obsahuje mnoho molekul transportního proteinu zvaného porin, který tvoří vodné kanály napříč dvojnou vrstvou lipidů, a zajišťují propustnost membrány pro všechny molekuly do ~ 5 kDa. Membrána dále obsahuje proteiny komplexu TOM esenciální pro import jaderně-kódovaných mitochondriálních proteinů. Ve vnější membráně se vyskytují enzymy metabolismu mastných kyselin, fosfolipidů a lipidů. **Vnitřní membrána** tvoří řadu záhybů zvaných křisty (obr. 1), které zasahují do prostoru matrix, značně zvětšují povrch vnitřní membrány a tím i plochu pro energetickou produkci. Vnitřní membrána obsahuje vysoký podíl fosfolipidu kardiolipinu a je prakticky impermeabilní pro ionty a také pro většinu malých molekul. Většina proteinů zanořených ve vnitřní mitochondriální membráně jsou enzymy dýchacího řetězce a aerobní fosforylace, což jsou flavoproteiny, cytochromy, H<sup>+</sup>-ATPáza a ubichinon (koenzym Q). Také jsou zde přítomny enzymy prodlužující řetězce mastných kyselin počínaje 16C. Dále se v ní váží i některé koenzymy enzymů reagujících v matrix. Protože je vnitřní membrána propustná jen pro malé molekuly bez náboje, jsou zde umístěny přenašeče iontů, ATP, ADP, aminokyselin a mastných kyselin, které umožňují vstup těchto vybraných molekul do/z matrix [1,4]. Vnitřní mitochondriální membrána obsahuje dále dva proteinové translokátory TIM22 a TIM23. TIM23 transportuje jaderně-kódované mitochondriální proteiny s N-koncovou signální sekvencí do matrix. TIM22 zprostředkovává inzerci některých proteinů do vnitřní mitochondriální membrány, jmenovitě transportních proteinů jako ADP/ATP translokátor nebo fosfátový transportér. Ve vnitřní membráně se nachází také OXA1 komplex, který zprostředkovává inzerci proteinů vnitřní mitochondriální membrány syntetizovaných v mitochondrii.



**Obr. 1 3D model mitochondrie získaný elektronovou tomografickou mikroskopií (převzato z [2])**

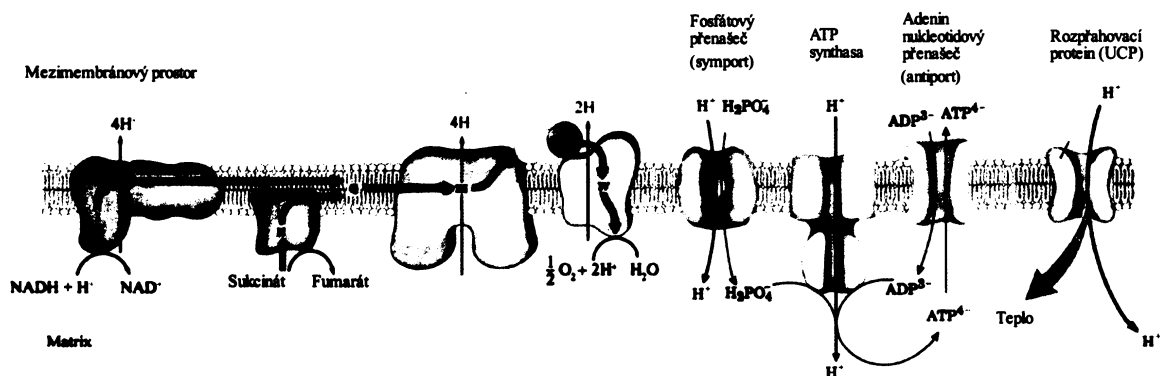
## 1.2 Dýchací řetězec

Mitochondrie zpracovávají acetylové skupiny v cyklu kyseliny citronové, přičemž produkují NADH a FADH<sub>2</sub> – aktivované nosičové molekuly nesoucí vysokoenergetické elektrony, které jsou dále využívány systémem oxidační fosforylace (OXPHOS). Elektrontransportní řetězec zajišťující oxidační fosforylaci se nachází v mnoha kopiích ve vnitřní mitochondriální membráně a je znám jako dýchací řetězec (obr. 2) [4]. Proteiny mitochondriálního elektrortransportního řetězce jsou seskupeny do několika velkých enzymových komplexů. Každý komplex zahrnuje transmembránové proteiny, které kotví celý proteinový komplex pevně ve vnitřní mitochondriální membráně. Mezi tyto komplexy patří komplex I (NADH-CoQ oxidoreduktasa), komplex II (sukcinát-CoQ oxidoreduktasa), komplex III (cytochrom *bc<sub>1</sub>* komplex) a komplex IV (cytochrom *c* oxidasa). Každý z komplexů obsahuje kovové ionty a další prostetické skupiny, které tvoří dráhu pro průchod elektronů komplexem. Z elektronových akceptorů NADH a FADH<sub>2</sub> jsou elektrony transportovány přes komplex I a II na dvou-elektronový přenašeč koenzym Q (CoQ). Elektrony jsou dále přenášeny prostřednictvím komplexu III z koenzymu Q na další jedno-elektronový přenašeč cytochrom *c*, jenž zajišťuje transport elektronů na konečný akceptor komplex IV. Komplex IV váže molekulu kyslíku, která je následně redukována na vodu. Transport elektronů v dýchacím řetězci začíná z místa nejnižšího redoxního potenciálu od NADH (-0,315 V) nebo FADH<sub>2</sub> (+0,03V) ke kyslíku, místu s nejvyšším redoxním potenciálem (+0,815V) a podle chemiosmotické teorie [5] je spojen s translokací protonů z mitochondriální matrix do mezimembránového prostoru. Změny redoxního potenciálu jsou spojené s pumpováním protonů přes komplex I, III a IV. Komplex II, který transportuje elektrony ze sukcinátu přes FADH<sub>2</sub> na koenzym Q nevykazuje aktivitu protonové pumpy. Tato lineární posloupnost elektronového transportu byla poprvé popsána z výsledků měření na kyslíkové elektrodě [6].

Volná energie uvolněná v průběhu elektronového transportu je uchována ve formě protonového gradientu napříč vnitřní mitochondriální membránou. Elektrochemický potenciál protonového gradientu ( $\Delta\mu\text{H}^+$ ) je následně využit ATP synthasou (F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATPasou) pro fosforylaci ADP. ATP je pak transportováno do cytosolu přes ADP/ATP přenašeč. Protonový gradient je také využíván pro transport metabolitů a makromolekul napříč membránou a k tvorbě tepla místo ATP. Produkce tepla je umožněna fyziologicky v hnědé tukové tkáni díky přítomnosti rozpřahovacího (uncoupling) proteinu (UCP1), který se vyskytuje v mitochondriích savců a jiných vyšších eukaryot [7]. Do uncoupling proteinové rodiny patří dále UCP2, UCP3, UCP4, BMCP1. Fyziologická role těchto proteinů je většinou neznámá, i

když za experimentálních podmínek bylo možné ukázat jejich schopnost rozpřahovat mitochondriální respiraci a disipovat protonový gradient [8].

Dýchací řetězec obsahuje také další dehydrogenasy, glycerolfosfát dehydrogenasu [9] a flavoprotein vázající acetyl CoA – dehydrogenasu [10].

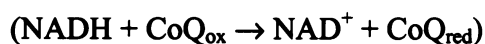


**Obr. 2 Schéma systému oxidační fosforylace (převzato z [11])**

Schéma obsahuje respirační proteinové komplexy (komplex I, II, III, IV, V), které transportují elektrony z NADH nebo FADH<sub>2</sub> na kyslík. Napříč vnitřní mitochondriální membrány dochází ke vzniku protonového gradientu, který je následně využíván F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATPasou pro fosforylaci ADP, ATP/ADP antiport (30 kDa ATP/ADP přenašečem) a transport anorganického fosfátu (30 kDa fosfátovým přenašečem) do mitochondrie. Může být také disipován ve formě tepla uncoupling proteinem 1.

### 1.3 Komplexy dýchacího řetězce

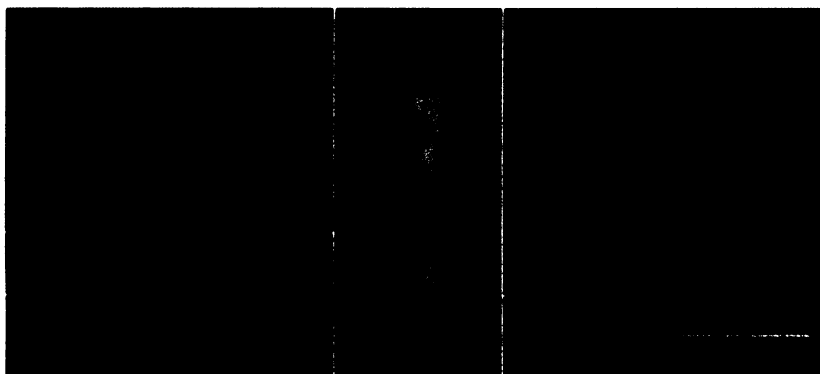
#### 1.3.1 Komplex I (NADH-CoQ oxidoreduktasa)



NADH-CoQ oxidoreduktasa je největší proteinový komplex vnitřní mitochondriální membrány (~ 900 kDa), obsahuje jednu molekulu redoxně aktivní prostetické skupiny flavin mononukleotidu (FMN) a šest až sedm Fe-S klastrů, které se podílí na elektronovém transportu. V savčích mitochondriích je složen nejméně ze 43 podjednotek, přičemž savčí mitochondriální genom kóduje 7 podjednotek a zbývající jsou kódovány jaderným genomem. Fe-S klastry komplexu I jsou binukleární (2Fe-2S) nebo tetranukleární (4Fe-4S), na které se koordinačně váží čtyři sulfhydrylové skupiny cysteinů [12]. Komplex I obsahuje dva binukleární klastry N1a, N2b a čtyři tetranukleární klastry N2, N3, N4 a N5 [13].

FMN a ubichinon jsou koenzymy komplexu I a oba mohou zaujmout až tři oxidační stavy. Jsou schopny přijmout a uvolnit buď jeden nebo dva elektrony, jelikož jejich semichinonové

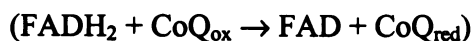
formy jsou stabilní. Součástí molekuly CoQ je hydrofobní řetězec, který je zapuštěn do fosfolipidové dvojvrstvy vnitřní mitochondriální membrány. U savců je tento hydrofobní řetězec tvořen deseti izoprenoidními jednotkami a koenzym je proto nazýván také CoQ<sub>10</sub> [12]. Mechanismus elektronového transportu komplexem I není přesně znám. Elektrony z NADH jsou nejspíš nejprve přenášeny na dvouelektronový akceptor FMN, který převádí elektrony jeden po druhém na Fe-S klastry, a to nejprve na N1a, následně na zbývající klastry, kdy N2 klastr přenáší elektrony na CoQ. Vzniklé semichinoidní formy CoQ jsou vázány na membránu [14]. Přítomnost těchto radikálů se zdá být nezbytná pro reakce spojené s transportem elektronů na komplexu I, protože rozpáření dýchacího řetězce, které způsobuje sníženou produkci volných radikálů, neovlivňuje přítomnost semiubichinonů [15].



**Obr. 3** Rekonstrukce 3D struktury komplexu I, elektronová mikroskopie (převzato z [16])

Membránová doména komplexu I je orientována horizontálně, matrixové rameno směřuje nahoru. Viditelná je úzká stopka spojující globulární doménu matrixového ramene s membránovou doménou. Lipidová dvojvrstva, do které je komplex I částečně zanořen, je vyznačena bílou čerchovanou čarou.

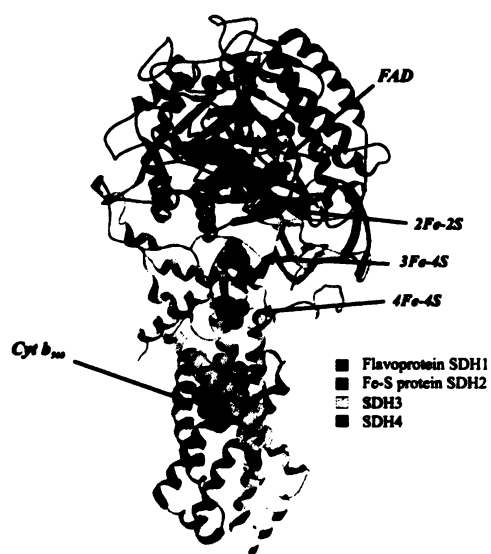
### 1.3.2 Komplex II (sukcinát-CoQ oxidoreduktasa)



Komplex II, 120 kDa enzym, katalyzuje oxidaci sukcinátu na fumarát a elektrony uvolněné při této reakci přenáší na CoQ. Je složen ze čtyř podjednotek, z nichž jednu představuje sukcinát dehydrogenasa, enzym citrátového cyklu [12]. Za enzymatickou aktivitu komplexu II jsou zodpovědné dvě hydrofilní podjednotky SDH1, SDH2 a dvě malé hydrofobní podjednotky SDH3 a SDH4. Všechny podjednotky jsou kódovány jaderným genomem [17]. Fe-S klastry komplexu II (S1 2Fe-2S, S2 4Fe-4S, S3 3Fe-4S) jsou lokalizovány v Fe-S proteinu SDH2. Podjednotky SDH3 a SDH4 formují membránovou

kovu enzymu a obsahují vazebné místo pro CoQ a cytochrom  $b_{560}$ . Přesná funkce tohoto cytochromu není jasná, avšak ze studií na *Caenorhabditis elegans* vyplývá, že se podílí na elektronovém transportu na CoQ a zamezuje produkci volných radikálů [18]. Vazebná místa pro ubichinon se nachází ve struktuře SDH3 podjednotky, která má ubichinon reduktasovou aktivitu [19].

Standardní redoxní potenciál pro elektronový transport ze sukcinátu na CoQ není dostatečný pro tvorbu volné energie nezbytné pro ATP syntézu. Komplex II však umožňuje zapojit do elektrotransportního řetězce tyto elektrony s relativně vysokým potenciálem a v tom spočívá jeho důležitost. Redukci ubichinonu na ubichinol katalyzují ještě další dva enzymy vnitřní mitochondriální membrány. Jedná se o glycerol-3-fosfát dehydrogenasu z glycerofosfátového člunku a flavoprotein ubichinon oxidoreduktasu podílející se na oxidaci mastných kyselin. Zvyšují tak výkon oxidační fosforylace pomocí činnosti komplexu III a IV [12].

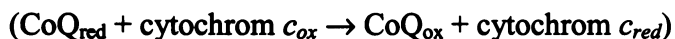


**Obr. 4** Struktura komplexu II z *Escherichia coli* (převzato z [20])

Podjednotky komplexu II jsou označeny barvami, černé šipky označují redoxní centra komplexu II. (Struktura komplexu II byla vytvořena na základě údajů z Proteinové Databanky (<http://www.rcsb.org>))



### 1.3.3 Komplex III (cytochrom $bc_1$ komplex)



Komplex III přenáší elektrony z redukovaného CoQ na cytochrom  $c$  a biologicky funkční je ve formě dimeru (480 kDa). Komplex III je složen z 11-ti podjednotek, z nichž 3 obsahují redoxní centra. Jedná se o podjednotku cytochrom  $b$  obsahující ve své struktuře dva typy hemů, a to hem  $b_{562}$  ( $b_K$ ), jehož absorpční maximum je při vlnové délce 562 nm, a hem  $b_{566}$  ( $b_T$ ) s absorpčním maximem 566 nm. Další jsou podjednotka cytochrom  $c_1$ , obsahující jeden hem  $c$ , a Rieskeho protein (ISP) obsahující 2Fe-2S klastr [12]. Mezi malé podjednotky patří Core1 a Core2, jejichž funkce je doposud nejasná. *In vitro* experiment však ukázal, že tyto podjednotky mají peptidasovou aktivitu a odštěpují mitochondriální pre-sekvenci [21]. Další malé podjednotky obsahují vazebné místo pro CoQ, nebo ulehčují elektronový přenos z 2Fe-2S klastru k cytochromu  $c_1$ .

Transmembránovou část dimeru komplexu III tvoří 13 transmembránových helixů každého protomeru. Osmi helixy přispívá cytochrom  $b$ , zbylé helixy náleží membránovým kotvám cytochromu  $c_1$  a ISP proteinu. Matrixová část komplexu III je tvořena strukturně homologními podjednotkami Core1, Core2 a podjednotkou 6 a 9.

Mechanismus elektronového transportu spojený s translokací protonů ( $\text{H}^+$ ) je znám jako Q cyklus. V tomto cyklu podstupuje CoQ (ubichinon - Q) dvoustupňovou redukci přes stabilní meziprodukt semichinon. Semichinon (QH.) je redukován na vnitřní straně membrány na hydrochinon ( $\text{QH}_2$ ) komplexem I.  $\text{QH}_2$  difunduje k cytosolové straně membrány a redukuje cytochrom  $b_K$  za uvolnění  $\text{H}^+$ . K translokaci druhého  $\text{H}^+$  dochází, redukuje-li dále semichinon na cytosolové straně cytochrom  $c_1$ . Cytochrom  $c_1$  odevzdá elektron rovnou na volný elektronový přenašeč cytochrom  $c$ . Q difunduje na stranu matrix, cytochrom  $b_K$  redukuje cytochrom  $b_T$  na matrixové straně a Q je cytochromem  $b_T$  redukován na QH. s původní absorpcí  $\text{H}^+$  z matrix [12].



**Cytochrom  $c_1$**   
 ISP  
**Hem  $c_1$**   
 Cytochrom b  
**Hem  $b_L$**   
**Hem  $b_H$**   
 FeS klastry  
**podjednotka 7**  
**podjednotka 6**  
 Core 1  
 Core 2

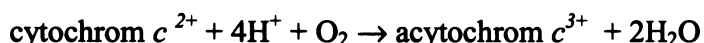
**Obr. 5** Strukturní model dimeru komplexu III (převzato z [22])

Polypeptidy jsou znázorněny jako barevné pásky, hemy ve své struktuře a Rieskyho Fe-S protein jako klubka. Barevně je zde vyznačeno 5 z 11-ti podjednotek, jejichž sekvence byla nalezena. Vrchní část molekuly se nachází v mezimembránovém prostoru mitochondrie (tvořena větší částí cytochromu  $c_1$  a ISP proteinu), prostřední část je zanořena ve vnitřní membráně (z 13-ti transmembránových helixů každého  $bc_1$  monomeru) a spodní největší část je přítomna v matrix (tvořena podjednotkami 6, Core 1, Core 2 a částí podjednotky 7).

### 1.3.4 Komplex IV (cytochrom $c$ oxidasa)

Cytochrom  $c$  oxidasa (COX) je terminálním enzymem dýchacího řetězce lokalizovaným ve vnitřní mitochondriální membráně, kde přenáší elektrony z redukovaného cytochromu  $c$  na molekulární kyslík. Patří do skupiny oxidas a obsahuje hem  $a$ , hem  $a_3$  a měďnaté ionty. Aktivní místo COX je tvořeno hemem  $a_3$  a blízce asociovaným měďnatým iontem ( $Cu_B$ ) [23].

V membráně se COX může vyskytovat jako monomer (~205 kDa) nebo dimer (~410 kDa) a katalyzuje jedoelektronovou oxidaci čtyř po sobě následujících molekul cytochromu  $c$  s původní čtyřelektronovou redukcí jedné molekuly kyslíku [12]:



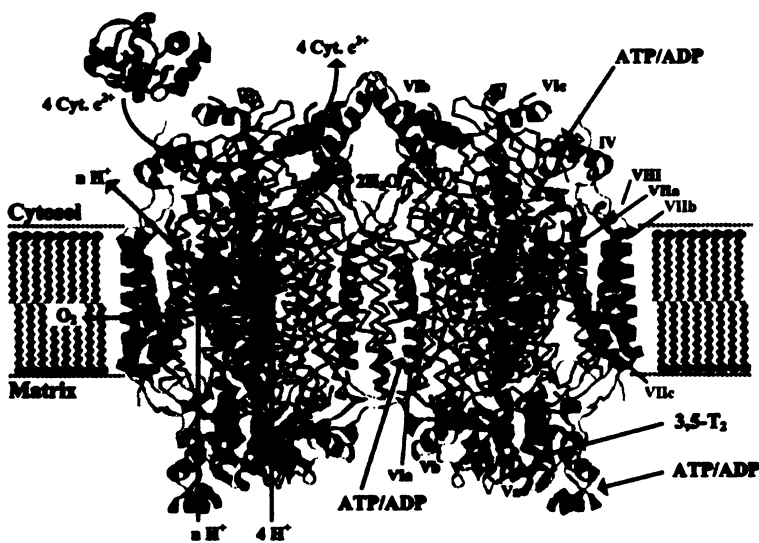
Tato exergonická reakce je spřažena s tvorbou elektrochemického potenciálu na vnitřní mitochondriální membráně, tvořeného pH gradientem a membránovým potenciálem gradientu

protonů. Elektrochemický potenciál je vytvářen jak spotřebou protonů při redukci molekuly kyslíku na vodu, tak i aktivním čerpáním protonů přes membránu. Nejčastější udávaná stechiometrie protonového transportu je  $1 \text{ H}^+ / 1 \text{ e}^-$  [24].

Savčí COX je složena ze 13 podjednotek. Tři největší podjednotky (I, II a III) jsou kódovány mitochondriální DNA. Jsou homologní podjednotkám prokaryotické COX a formují katalytické jádro enzymu. Zbývajících 10 podjednotek (IV, Va, Vb, VIa, VIb, VIc, VIIa, VIIb, VIIc a VIII) bylo zabudováno do struktury COX během eukaryotické evoluce a je kódováno jaderným genomem. Na struktuře transmembránové části enzymu se podílí podjednotky IV, VIa, VIc, VIIa, VIIb, VIIc a VIII jedním helixem, COXI 12-ti helixy, COXII dvěma helixy a COXIII sedmi helixy. Extramembránová část na cytosolické straně membrány je dotvářena podjednotkou VIIb, na straně matrix podjednotkami Va a Vb. 10 jaderně kódovaných podjednotek se přímo neúčastní elektronového transportu nebo protonového přenosu, ale většina studií na kvasinkovém či savčím modelu udává, že jsou zapojeny do sestavování enzymu z podjednotek a regulaci jeho aktivity. Na struktuře COX se také podílí osm molekul fosfolipidů (tři molekuly fosfatidylethanolaminu a pět molekul fosfatidylglycerolu) těsně asociovaných s COX prostřednictvím solných můstků a vodíkových vazeb [25]. V krystalové struktuře COX z mitochondrií hovězího srdce bylo nalezeno několik molekul lipidu kardiolipinu. Prostřednictvím jedné molekuly kardiolipinu dochází k vazbě dvou monomerů COX za vzniku dimeru.

U savců byly nalezeny dvě tkáňově specifické izoformy podjednotek VIa, VIIa, VIII. U lidí je podjednotka VIII jen v jedné izoformě, taktéž podjednotka VIIa u potkanů. Srdeční izoformy podjednotek (VIaH, VIIaH, VIIIH) jsou exprimovány v srdeční tkáni a kosterním svalstvu, zatímco jaterní izoformy (VIaL, VIIaL, VIIIL) se vyskytují ve všech tkáních. V srdeční tkáni a kosterním svalstvu plodu jsou exprimovány prenatálně jaterní izoformy podjednotek VIa, VIIa, až po narození jsou nahrazovány srdečními izoformami [26].

Transport elektronů z cytochromu *c* na kyslík je zajišťován dvojicí hemů  $a + a_3$  a dvojicí měďnatých kationtů  $\text{Cu}_A$  a  $\text{Cu}_B$ . Jak už bylo řečeno, redoxní centra s vyšším potenciálem hem  $a_3$  a  $\text{Cu}_B$  vytváří binukleární centrum pro vazbu molekuly kyslíku. Přijetím dvou elektronů dochází k redukci obou kovových iontů a následnou redukci molekuly kyslíku přes peroxy – intermediáty. Přijetím třetího elektronu vzniká ferryl intermediát, čtvrtý elektron navrátí systém do původního oxidovaného stavu a dojde k uvolnění dvou molekul vody. Hem *a* a  $\text{Cu}_B$ , mající nižší potenciály, zprostředkovávají transport elektronů z vazebného místa pro cytochrom *c* do binukleárního centra [12]. Tento proces je spojen s translokací  $4 \text{ H}^+$  z matrix do cytosolu prostřednictvím dvou hydrofilních kanálů D a K [27].



**Obr.6 Krystalová struktura dimeru COX z mitochondrií hovězího srdce (převzato z [26])**

Na cytosolové straně je znázorněn cytochrom *c* (tmavě modrá). Ve struktuře jsou mitochondriálně kódované podjednotky I, II a III označeny žlutě, ostatní jaderně kódované podjednotky jsou označeny různými barvami. Hemy *c*, *a* a *a*<sub>3</sub> jsou vyznačeny černě, kovové ionty oranžově, Cu<sub>A</sub> a Cu<sub>B</sub> modře. Na levém monomeru je schematicky přiblížena chemická reakce probíhající na COX. Na levém monomeru jsou popsány jaderně kódované podjednotky a vazebná místa pro regulační složky ATP nebo ADP a 3,5-dijodothyronin (3,5-T<sub>2</sub>).

### 1.3.5 Komplex V (ATP synthasa)

Volná energie elektrochemického gradientu protonů na mitochondriální membráně je využita především proton translokující ATP synthasou k syntéze ATP. ATP synthasa (~620 kDa) je enzymový komplex vnitřní mitochondriální membrány a je složená ze dvou funkčních sektorů F<sub>0</sub> a F<sub>1</sub> spojených dvěma stopkami (obr. 7) [12]. Savčí enzym je složen ze 16-ti typů podjednotek, včetně regulační podjednotky IF<sub>1</sub>. F<sub>1</sub> je hydrofilní proteinový komplex složený z podjednotek  $\alpha_3$ ,  $\beta_3$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ , zatímco hydrofobní transmembránový proteinový komplex F<sub>0</sub> je složený z podjednotek *a*, *b*, *c*<sub>10</sub>, *d*, *e*, *f*, *g*, F<sub>6</sub>, A6L a OSCP. Podjednotky *a* a A6L jsou kódovány mitochondriální DNA, ostatní podjednotky jsou kódovány jadernou DNA (nDNA) [28].

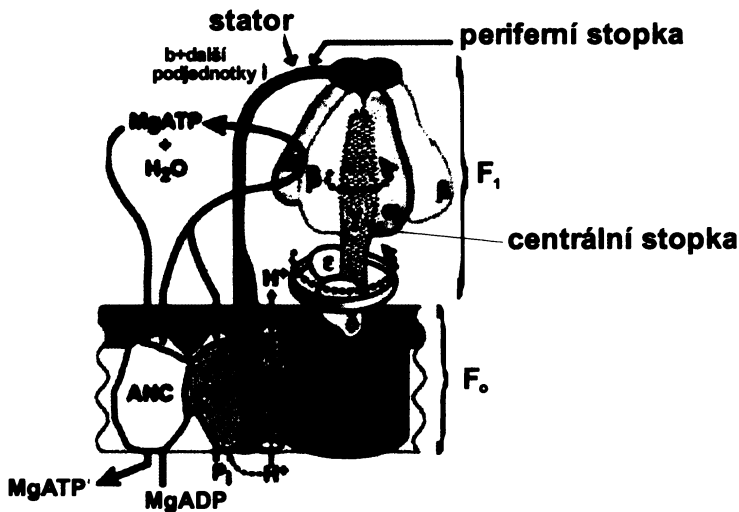
F<sub>1</sub> představuje katalytickou část enzymu pro syntézu ATP, ale sama o sobě katalyzuje pouze ATP hydrolyzu. Její hlavní část je tvořena hexametrem  $\alpha_3 \beta_3$ . Na rozhraní  $\alpha$  a  $\beta$  podjednotek se nachází vlastní 3 katalyticky aktivní místa. Podjednotky  $\alpha$  a  $\beta$  jsou uspořádány střídavě tvořící globulární katalytickou doménu, která obklopuje  $\gamma$  podjednotku. Centrální stopku F<sub>1</sub>

části tvoří  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  podjednotky. Podjednotky  $\gamma$  a  $\delta$  jsou vázány na „prsteneč“ z  $c$  podjednotek  $F_0$  části a tvoří část centrální stopky [29].

$F_1$  a  $F_0$  subkomplexy jsou dále spojeny periferní stopkou složenou z OSCP proteinu (protein zodpovědný za citlivost enzymu vůči oligomycinu),  $F_6$ ,  $b$  a  $d$  podjednotek. Periferní stopka je v kontaktu s vrcholem  $F_1$  části a zabraňuje tak její rotaci. OSCP se rozkládá podél povrchu  $F_1$  směrem k  $F_0$  části. Podjednotky  $d$  a  $F_6$  interagují s  $b$  podjednotkou. OSCP- $b$ - $d$ - $F_6$  subkomplex vytváří separovanou doménu a v molekule enzymu zastává funkci statoru [30,31].

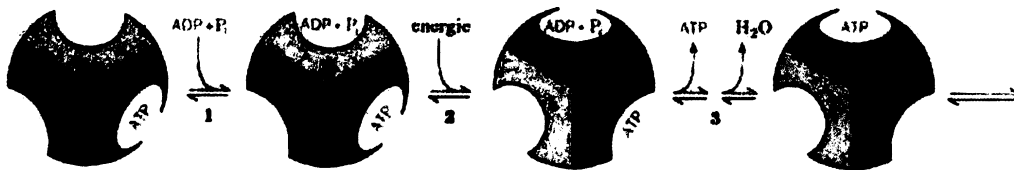
Hydrofobní transmembránový  $F_0$  subkomplex je složený ze dvou částí. První část, napojená na centrální stopku, je tvořena prstencem z deseti  $c$  podjednotek ( $c$ -prsteneč) [32]. Podjednotky  $c$  jsou nazývány také jako DCCD vázající proteolipidy. Jsou citlivé na v tucích rozpustné karboxylové činidlo DCCD (dicyklohexylkarbodiimid), které navázáním na  $c$  podjednotky inhibuje činnost ATP synthasy [21]. Druhá část, spojená s  $c$ -prstencem, je složena z dalších membránově vázaných podjednotek, mezi které patří podjednotky  $a$ ,  $A6L$  a pravděpodobně také  $e$ ,  $f$  a  $g$  [33].

ATP synthasa je protonová pumpa a pracuje jako reverzibilní molekulární stroj.  $C$ -prsteneč  $F_0$  části a  $\gamma$  podjednotka centrální stopky představují rotor, zatímco protonový kanál je tvořen jak  $c$  tak  $a$  podjednotkami  $F_0$  části. Mechanismus tvorby ATP je založen na transformaci potenciálu protonů v konformační energii. Protony protékající protonovým kanálem způsobují rotaci 10-ti podjednotek  $c$  spolu s podjednotkami  $F_1$  centrální stopky. Podjednotka  $\gamma$ , kolem které se nachází  $\alpha_3 \beta_3$  hexamer, tak způsobí svým rotačním pohybem konformační změny v katalytických a nukleotidvazajících místech na  $\beta$  podjednotkách. Během jednoho rotačního cyklu se změní konformace každé  $\beta$  podjednotky v jinou konformaci, díky které se mění afinita vazebného místa v podjednotce (obr.8).



**Obr. 7** Struktura savčí ATP synthasy (převzato z [34])

Savčí ATP synthasa je tvořena 16-ti podjednotkami. Fosfátový přenašeč (PIC) a adenin nukleotidový přenašeč (ANC) s ATP synthasou funkčně a zřejmě i strukturně asociují. ATP synthasa/PIC/ANC superkomplex byl nazván jako ATP synthasom.



**Obr. 8** Energeticky závislý mechanismus vazebných změn pro syntézu ATP (převzato z [12])

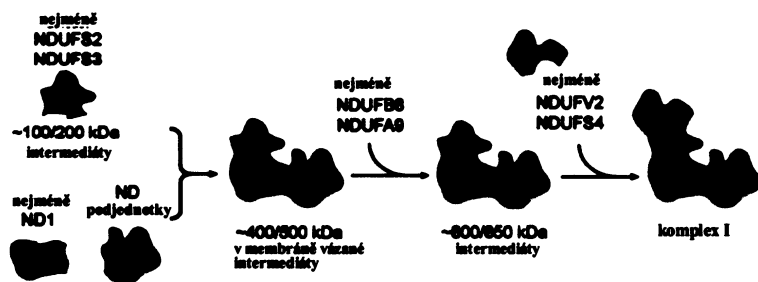
F<sub>1</sub> obsahuje tři shodné heterodimery podjednotek  $\alpha$  a  $\beta$ , které spolu navzájem interagují, ale liší se v konformaci. 1-vazba ADP a P<sub>i</sub> k místu L, 2-energeticky závislá konformační změna přemění vazebná místa L na T, T na O a O na L, 3-syntéza ATP v místě T a uvolnění ATP z místa O. Enzym se po dalších dvou cyklech tohoto sledu vrací do původního stavu.

## 1.4 Biogeneze komplexů dýchacího řetězce

### 1.4.1 Biogeneze komplexu I

Sestavování savčího komplexu I probíhá postupným připojováním asemblačních intermediátů složených z několika podjednotek, které vznikají přednostně. Pro asemblaci lidského komplexu I byly doposud navrženy 4 modely, které se shodují na vzniku periferního a membránového ramene, která se nevytvářejí nezávisle, ale pomocí membránově ukotveného subkomplexu periferního ramene (tzv. lešení). Asemblace komplexu I vyžaduje přítomnost

chaperonů, tzv. asemblačních faktorů, které nejsou součástí finální struktury. Identifikovány byly PTC1 (funkce zatím neznámá), NDUFAF1 (přechodně asociuje s intermediáty v prvních krocích asemblace), B17.2-L a nedávno identifikovaný faktor Ecsit, který byl nalezen v 500-850 kDa chaperonovém komplexu, stejně jako NDUFAF1, a je nutný pro stabilitu NDUFAF1. Více faktorů zatím nebylo možné identifikovat díky přechodným vazbám na podjednotky a jejich pravděpodobné účasti i v jiných dějích [35].



**Obr. 9 Model asemblace lidského komplexu I (převzato z [35])**

Tento model se v zásadě podobá asemblaci komplexu I ostatních organismů. Základem je vznik subkomplexu z jaderně kódovaných podjednotek zakotveného v membráně (subkomplex je tvořen minimálně podjednotkami NDUF82 a NDUF83 a v membráně je ukotven vazbou přinejmenším na podjednotku ND1, která je přítomna v dalším asemblačním intermediátu tvořeného ND podjednotkami), na který se váží zbývající podjednotky za tvorby membránového a periferního ramene. Vzniklý 400/500 kDa membránově vázaný intermediát obsahuje pravděpodobně také podjednotky NDUF81, NDUF87, NDUF88 a ND2, ND3, ND6. Asemblace pokračuje připojením NDUFB8, NDUF9 a pravděpodobně i NDUFV1, NDUFV3 a NDUF86 podjednotky. Celý holoenzym je pak dotvořen navázáním přinejmenším NDUFV2, NDUF84 podjednotek.

### 1.4.2 Biogeneze komplexu II

Komplex II, na rozdíl od ostatních komplexů dýchacího řetězce, je složen z nejméně podjednotek (čtyř jaderně kódovaných podjednotek), avšak o jeho asemblaci je známo málo.

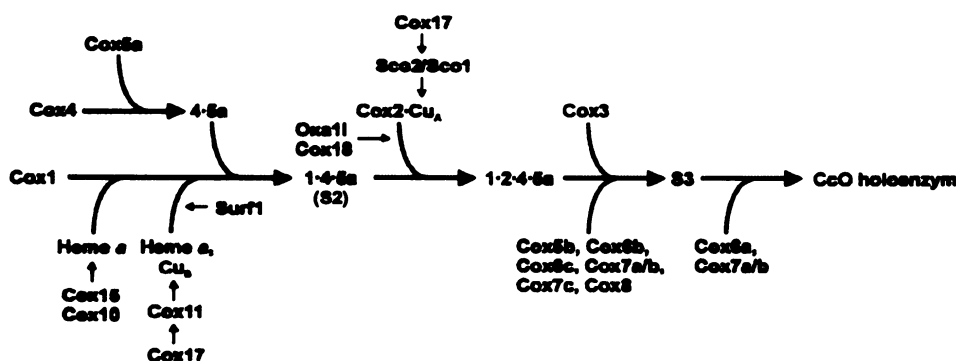
### 1.4.3 Biogeneze komplexu III

Tvorba komplexu III je koordinovaný proces, v průběhu kterého dochází ke tvorbě specifických asemblačních intermediátů. Zatím nejpřesnější popis asemblace komplexu III pochází ze studií komplexu v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae*. Nejprve cytochrom *b* vytváří subkomplex s podjednotkami Qcr7p a Qcr8p, který následně váže Core 1 a Core 2

proteiny. Cytochrom  $c_1$  zatím vytváří další subkomplex s Qcr6p a Qcr9p. Vznik dvou separovaných subkomplexů chrání jednotlivé podjednotky před možnou proteolýzou. Ještě před zabudováním Rieskeho FeS proteinu a Qcr10p do struktury se cytochrom  $b$  a cytochrom  $c_1$  subkomplexy spojí v jeden cytochrom  $bc_1$  subkomplex. Komplex III dále vytváří dimer, jako svoji funkční strukturu. Proces asemblace vyžaduje řadu jaderně kódovaných asemblačních proteinů. Identifikovaný byl Bcs1 protein (Bcs1p), lidský analog je Bcs1 L, patřící do AAA proteinové rodiny, který se účastní inkorporace Rieskeho FeS proteinu a Qcr10p k cytochrom  $bc_1$  subkomplexu. Jeho vazba a disociace z tohoto asemblačního intermediátu je řízena ATP hydrolýzou [36]. Jedná se tedy o ATP dependentní chaperon. Mezi další specifické asemblační faktory patří Cbp3p a Cbp4p, mající funkce chaperonů [37].

#### 1.4.4 Biogeneze komplexu IV

Tvorba COX z jednotlivých podjednotek probíhá postupně a je spojena se vznikem několika asemblačních intermediátů (obr.10). Tento proces není spontánní a vyžaduje řadu pomocných jaderně kódovaných asemblačních faktorů, které se účastní ve všech krocích COX biogeneze od regulace exprese mitochondriálně a jaderně kódovaných podjednotek, zabudování hemu  $a$  a mědi do podjednotek COX1 a COX2 až do vzniku celého COX holoenzymu a jeho následného vázání do oligomerních forem. Na biogenezi kvasinkové COX se podílí více než 20 faktorů a asi u 16-ti z nich existuje savčí homolog. Nejlépe je popsána funkce u OXA1, COX 10, 11, 15, 17, SCO1, SCO2 a SURF1 [38]. Ve fázích vzniku  $S_2$  intermediátu se účastní COX 10, COX15, COX17, COX 11, SURF1 a ve fázích následujících SURF1, OXA1, COX18, COX 17, SCO1 a SCO2.



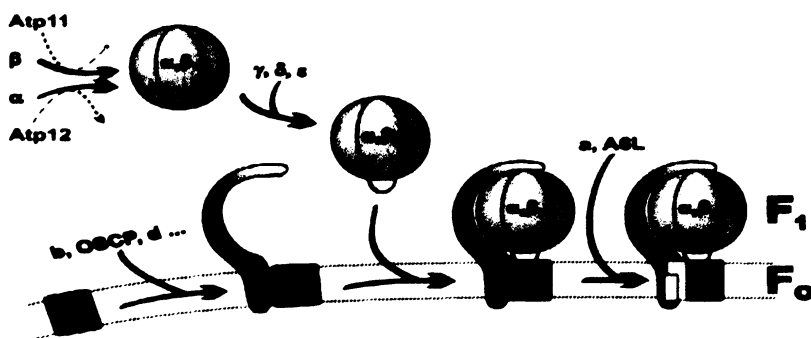
Obr. 10 Schéma asemblace lidské cytochrom  $c$  oxidasy (převzato z [39])



Asemblační intermediát S1 obsahuje podjednotku COX1, S2 subkomplex vzniká po inkorporaci heterodimeru z podjednotek IV a Va. Po připojení podjednotky COX2 začíná zabudování jaderně kódovaných podjednotek Vb, VIb, VIc, VIIb, VIIc a VIII za vzniku subkomplexu S3. Sestavování COX končí po navázání dvou posledních podjednotek VIa a VIIa, které umožňují dimerizaci COX.

### 1.4.5 Biogeneze ATP synthasy

Na asemblaci ATP synthasy se podílí řada asemblačních faktorů a tento proces je zatím nejlépe prozkoumán u kvasinek. Mechanismus tvorby savčí ATP synthasy není přesně znám. Asemblace  $F_1$  části je nejspíš v savčích buňkách analogická asemblaci v kvasinkách díky strukturální podobnosti  $F_1$  části u savců a kvasinek, což neplatí v případě  $F_0$  části, která je u savců složena z více podjednotek. Schéma asemblace ATP synthasy je znázorněno na obrázku 11. U kvasinek bylo identifikováno 5 asemblačních faktorů (chaperonového typu) se substrátově specifickou funkcí. Atp 11p a Atp 12p interagují s podjednotkami  $\beta_3$  a  $\alpha_3$  a umožňují tak tvorbu  $F_1$  části. Fmc 1p faktor stabilizuje a udržuje aktivitu Atp 12p při zvýšené teplotě. Atp 10p a Atp 22p se podílí na tvorbě  $F_0$  části, kdy Atp 10p se účastní posledního kroku asemblace, a to inkorporace podjednotky 6 do  $F_0$  části. U savců byly nalezeny asemblační faktory Atp 11 a Atp12 a homology kvasinkového faktoru ATP 23 pro zabudování podjednotky  $\alpha$ . Naopak kvasinkové  $F_0$ -specifické faktory ATP 10 a ATP 22 u savců chybí [28].



Obr. 11 Schéma asemblace lidské ATP synthasy (převzato z [28])

Prvním krokem při asemblaci savčí ATP synthasy je tvorba  $F_1$  části z  $\alpha_3$  a  $\beta_3$  podjednotek a následně se formuje  $F_0$  část. Na podjednotku  $c$ , vázanou v membráně, se postupně připojí pevná stopka, tvořená z příslušných podjednotek, a dále se na podjednotku  $c$  váže  $F_1$  část. Asemblace končí inkorporací mitochondriálně kódovaných podjednotek  $\alpha$  a A6L.

## 1.5 Modely dýchacího řetězce

Pro uspořádání enzymů respiračního řetězce ve fosfolipidové membráně byly navrženy dva modely - model tekutého stavu („Fluid state“ model) a model pevného stavu („Solid state“ model).

„Fluid state“ model dýchacího řetězce je představován volně difundujícím komplexem I a komplexem IV ve vnitřní mitochondriální membráně, kde je elektronový transport uskutečněn na základě náhodných kolizí komponent dýchacího řetězce a malých elektronových nosičů. Tato teorie je podporována díky možnosti purifikace všech pěti komplexů dýchacího řetězce v jejich fyziologicky aktivní formě.

Z mnoha důvodů je však stále více uznávaným modelem „Solid state“ model, kde jsou substráty přímo směřovány z jednoho enzymu na druhý, jelikož (i) při izolaci OXPHOS komplexů dochází ke ko-purifikaci více než jen jedné oxidoreduktasy, (ii) opakované experimenty dokazují vyšší elektrontransportní aktivitu, pokud jsou OXPHOS komplexy přítomné v přesně definované stechiometrii, (iii) bodové mutace v genech kódujících primární strukturu podjednotek jednoho OXPHOS komplexu ovlivňují stabilitu ostatních respiračních komplexů, (iv) „flux control“ experimenty poukazují na přítomnost větších jednotek, než samotných OXPHOS komplexů, (v) superkomplexy složené z více než jednoho typu OXPHOS komplexu je možno znázornit pomocí nativní elektroforézy nebo sacharidovou gradientovou centrifugací, (vi) elektronová mikroskopie odhalila různé asociace OXPHOS komplexů v respiračních superkomplexech.

Podobnými experimentálními postupy byla potvrzena existence superkomplexů v mitochondriích kvasinek a savců i v různých typech bakterií.

Na základě „Fluid state“ modelu tedy nelze vysvětlit řadu experimentálních pozorování, nicméně interakce OXPHOS komplexů nejsou jednoduše „pevné“, ale je zde uvažována jakási dynamická rovnováha (přirozenost) [40,41].

## 1.6 Superkomplexy dýchacího řetězce

Komplexy dýchacího řetězce jsou stavební kameny strukturně a funkčně větších jednotek zvaných superkomplexy, které jsou přítomny například v bakteriálních membránách, řasách, houbách, rostlinách a v savčích mitochondriích. Jednotlivé typy popsaných superkomplexů představují dimer ATP synthasy (prokazatelně nejstabilnější u řas *Chlamydomonas* a *Polytomella*),  $I_1III_2$  ( $III_2$ -dimer) superkomplex (poprvé popsán u *Arabidopsis*),  $III_2IV_{1-2}$  ( $IV_{1-2}$  - jedna až dvě kopie monomeru komplexu IV) superkomplex (vyskytující se hlavně v

kvasinkách ) a I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>IV<sub>1-4</sub> superkomplex, zvaný též respirasom (prvně izolovaný ze savčích hovězích mitochondrií) [40]. Hlavní komponenta spojující komplex III a IV dohromady u *Saccharomyces cerevisiae* a v savčích mitochondriích je kardiolipin [42,43]. V lidských mitochondriích byla nalezena stabilizace komplexu I pomocí vazby na komplex III. Superkomplexy jsou většinou stabilní vůči sonikaci, ale jsou zato citlivé na většinu detergentů [42].

Současná představa je, že superkomplexy fungují jako regulační jednotky respirace a mezi významnou funkcí superkomplexů patří substrátový „chanelling“, kterým urychlují elektronový transport. Intermediáty dýchacího řetězce jsou tedy přímo směřovány ke specifickým enzymům a neuplatňují se zde možné kompetice s jinými enzymy. Předpokládá se, že „volné“ elektronové přenašeče ubichinon a cytochrom *c* jsou právě řízeny tímto chanellingem. Na základě pevné vazby cytochromu *c*<sub>552</sub> k superkomplexu je extrémní forma substrátového chanellingu cytochromu *c* přítomna u *Paracoccus denitrificans* [42]. Substrátový chanelling byl též prokázán u kvasinek *Sacharomyces cerevisiae*. Experimentálně (*in vitro*) a elektronovou mikroskopií bylo nicméně zjištěno, že substrátový chanelling pravděpodobně nenastává v případě superkomplexu I-III<sub>2</sub>, jelikož předpokládané vazebné místo pro redukci ubichinonu ve struktuře komplexu I a vazebné místo pro oxidaci ubichinolu ve struktuře komplexu III nejsou v takové blízkosti, která by zajistila urychlení elektronového transportu. Substrátový chanelling je naopak možný v případě superkomplexu III<sub>2</sub>-IV<sub>1-2</sub>, kde jsou vazebná místa pro cytochrom *c* u komplexu III a IV v dostatečné blízkosti [40].

U savčích mitochondrií probíhá substrátový chanelling u části elektronového transportu, část je zprostředkována difundujícími elektronovými přenašeči. Představa supramolekulárního uspořádání OXPHOS systému je taková, že respirační komplexy netvoří vždy superkomplexy, jelikož koncentrace jednotlivých komplexů ve vnitřní membráně je odlišná. S největší pravděpodobností zde koexistují volné a asociované komplexy. Množství těchto forem je nejspíš regulováno dosud nepoznanými faktory, mezi něž může patřit i kardiolipin [40]. Otázkou je, do jaké míry mají tyto stavy fyziologický význam z hlediska energetické funkce mitochondrií.

Superkomplexy dále (i) určují ultrastrukturu vnitřní mitochondriální membrány, (ii) zvyšují stabilitu OXPHOS komplexů, (iii) zvyšují kapacitu pro inzerci proteinů vnitřní mitochondriální membrány [40] a (iv) existuje také domněnka, že stabilní superkomplexy by mohly zamezovat tvorbě reaktivního intermediátu semiubichinonu, jelikož jeho interakci s molekulou kyslíku vzniká nebezpečný superoxidový anion radikál, který je zapojen do

patologických procesů mitochondriálních onemocnění. Tato potenciální schopnost superkomplexů však ještě nebyla experimentálně ověřena [44].

### 1.6.1 Kardiolipin

Kardiolipin (CL) je minoritní tetra acyl fosfolipid, poprvé izolovaný z hovězího srdce. CL v eukaryotech obsahuje ve své struktuře převážně 18-ti uhlíkaté nenasycené řetězce mastných kyselin (MK). Tato (18:2)<sub>4</sub> konfigurace kyselinových řetězců je zodpovědná za vysokou afinitu CL k proteinům vnitřní mitochondriální membrány. V savčích buňkách je CL přítomen hlavně ve vnitřní mitochondriální membráně jako esenciální lipid pro optimální funkce mnoha enzymů a transportních proteinů zapojených do mitochondriálního energetického metabolismu. U prokaryot je lokalizován v bakteriální cytoplasmatické membráně. Změny v kompozici řetězců MK, změny ve struktuře CL (peroxidace) nebo snížení množství CL (hydrolyzou endogenními fosfolipasami) vedou k různým patologickým změnám spojeným s mitochondriální dysfunkcí.

Přítomnost CL je nezbytná pro řadu mitochondriálních procesů. Tento fosfolipid má unikátní schopnost interagovat s proteiny a má významnou roli v udržování fluidity a osmotické stability vnitřní mitochondriální membrány. CL je potřebný pro správné strukturní uspořádání a aktivitu respiračních komplexů zapojených v oxidační generaci ATP a pravděpodobně se přímo podílí na funkci cytochromu *bc<sub>1</sub>*, zabraňuje osmotické nestabilitě a rozprášení vnitřní mitochondriální membrány. CL také elektrostaticky ukotvuje cytochrom *c* do vnitřní mitochondriální membrány a může tak proto mít důležitou regulační roli při uvolňování cytochromu *c*, čímž dochází ke spuštění apoptické dráhy buňky. CL je dále nezbytný při mitochondriální biogenezi a při asemblaci respiračních superkomplexů [45].

CL specificky a pevně asociuje s komplexem III a IV, čímž umožňuje organizaci dýchacího řetězce prokaryot a eukaryot do superkomplexů. Komplexy III a IV formují superkomplex – heterodimer složený z homodimerů těchto komplexů. Superkomplex III<sub>2</sub>-IV<sub>2</sub> je stabilní při vyšších koncentracích digitoninu a lze jej zobrazit nativní elektroforézou. Experimentálně bylo zjištěno, že jakmile dojde k odstranění CL z komplexu III (nebo komplexu IV), struktura komplexu se rozruší a komplex tak následně ztrácí svou funkci. U kmene kvasinek s nulovou expresí kardiolipin synthasy (*crd1Δ kmen*) bylo zjištěno, že nedochází k asociaci komplexů v superkomplex III<sub>2</sub>-IV<sub>2</sub>. Detekovány byly pouze homodimery komplexů. Množství superkomplexu III<sub>2</sub>-IV<sub>2</sub> je závislé na obsahu CL v mitochondrii a CL je tedy nezbytný pro interakci komplexu III a komplexu IV *in vivo*.

Redoxní komplexy v mitochondriích a v bakteriích jsou asemblovány prostřednictvím kardiolipinem obohacených domén. Dutiny vzniklé zakotvením transmembránových helixů cytochromu *c*<sub>1</sub> a cytochromu *b* jsou pravděpodobným místem pro interakce komplexu III a IV. CL vyplňuje tyto dutiny a umožňuje tak amfipatické spojení mezi komplexy [43].

### 1.6.2 Charakterizace struktury OXPHOS superkomplexů

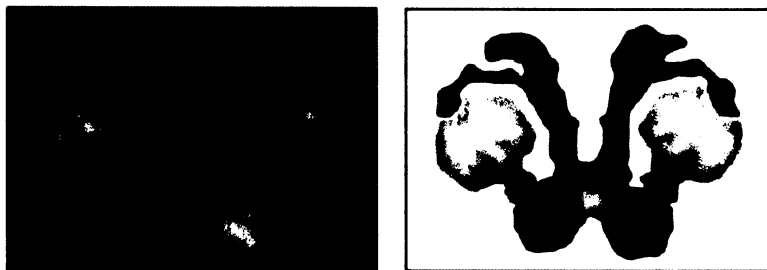
Stěžejním bodem pro strukturní charakterizaci respiračních superkomplexů je jejich solubilizace neiontovými detergenty. Stabilní superkomplexy lze získat použitím klasických detergentů Tritonu X-100 a digitoninu. Nejvhodnější metodou pro separaci a znázornění superkomplexů je modrá nativní elektroforéza (BN-PAGE) často používaná v kombinaci s SDS elektroforézou (SDS-PAGE) ve druhém rozměru, kdy dochází k disociaci superkomplexů na podjednotky [46].

Tímto postupem bylo identifikováno mnoho superkomplexů v různých typech organismů, přičemž množství a stabilita těchto superkomplexů se liší u jednotlivých organismů. Superkomplexy lze také znázornit pomocí elektronové mikroskopie [40].

#### *Dimer ATP synthasy*

Dimer ATP synthasy (~1300 kDa) byl poprvé popsán u kvasinek. Tento superkomplex je spojen pomocí tří specifických podjednotek *e*, *g*, a *k* a bylo zjištěno, že delece genu kódujícího podjednotku *g* narušuje nejen dimerizaci ATP synthasy, ale také výrazně mění mitochondriální ultrastrukturu .

Elektronová mikroskopie struktury dimeru ATP synthasy z hovězích mitochondrií, kvasinek a *Polytomelly* (obr.12) potvrdila domněnku, že tento dimer je zodpovědný za formování krist, jelikož interakce monomerů ATP synthasy způsobuje vznik lokálních ohybů vnitřní mitochondriální membrány. Mutanty s defektem ATP synthasy tak nemají typické kristy a jejich mitochondrie jsou zvětšené.



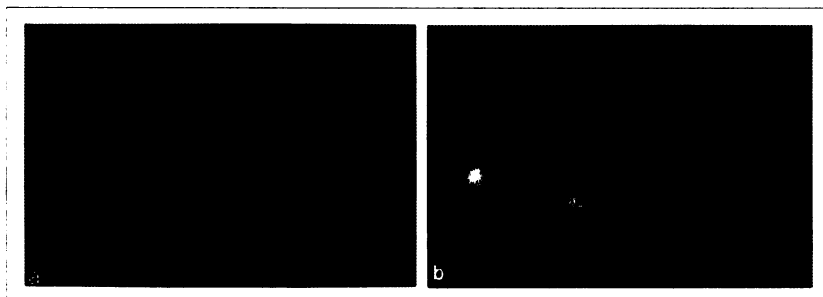
**Obr. 12 Dimer ATP synthasy *Polytomelly* (převzato z [40])**

Snímek byl pořízen elektronovým mikroskopem. Superkomplex obarven 1% uranylacetátem.

### ***I-III<sub>2</sub> superkomplex***

*I-III<sub>2</sub>* superkomplex (~1500 kDa) je zatím nejlépe popsán u vyšší rostliny *Arabidopsis thaliana* (obr.13). Pomocí BN-PAGE byl u *Arabidopsis* odhalen také superkomplex *I<sub>2</sub>-III<sub>4</sub>*. Elektronová mikroskopie poskytla 2D projekci tohoto superkomplexu z mitochondriální matrix, která ukazuje postranní asociaci dimeru komplexu III s membránovou částí komplexu I obklopující komplex *III<sub>2</sub>* v místě interakce, jehož struktura není přesně známa. V porovnání se savčím *I-III<sub>2</sub>* superkomplemem je membránová část komplexu I mírně delší, což může vysvětlovat speciální stabilitu tohoto superkomplexu u *Arabidopsis* [40].

Existují jisté strukturální odlišnosti *I-III<sub>2</sub>* superkomplexu savců a rostlin. Zatímco savčí *I-III<sub>2</sub>* superkomplex je charakteristický svým trojúhelníkovým tvarem, rostlinný *I-III<sub>2</sub>* superkomplex byl zobrazen ve tvaru V, což je dáno značně odlišnou podjednotkovou kompozicí rostlinného komplexu I od savčího [47].



**Obr. 13 Superkomplex *I-III<sub>2</sub>* z *Arabidopsis thaliana* (převzato z [47])**

a-Superkomplex *I-III<sub>2</sub>*. Do snímku je inkorporována rentgenová struktura komplexu III (modrý) a elektronovou mikroskopií pořízený snímek komplexu I (žlutý). Části komplexu I vyskytující se u *Arabidopsis* jsou zvýrazněny oranžově, zelenou linkou jsou znázorněny hydrofilní domény komplexu III uvnitř matrix. b- Snímek superkomplexu *I-III<sub>2</sub>* *Arabidopsis* pořízen elektronovým mikroskopem (barvení 1% uranylacetátem).

### ***III<sub>2</sub>-IV<sub>1-2</sub> superkomplex***

První strukturní model tohoto superkomplexu byl nedávno popsán u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Elektronová mikroskope odhalila 2D projekce III<sub>2</sub>-IV<sub>1</sub> (~650 kDa) a III<sub>2</sub>-IV<sub>2</sub> (~850 kDa) superkomplexů, kde se monomery komplexu IV váží svou konvexní stranou na dimer komplexu III (obr. 14). Druhá strana každého monomeru představuje vazebné místo pro dimerizaci, což může vést k oligomerizaci superkomplexu. Veškerý komplex IV v mitochondriích kvasinek je vázán do superkomplexů. Hlavní funkce III<sub>2</sub>-IV<sub>2</sub> superkomplexu je, že tvoří „lešení“ pro efektivní elektronový transport mezi komplexem III a IV prostřednictvím cytochromu *c*, který se částečně na superkomplex váže [48].



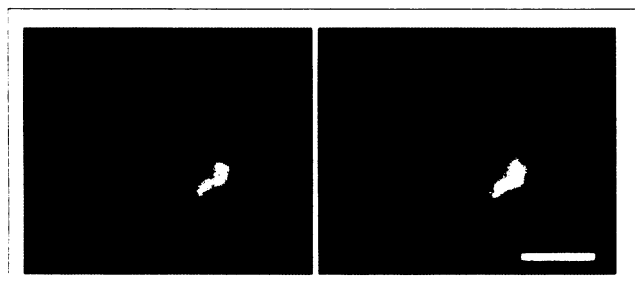
**Obr. 14** III<sub>2</sub>-IV<sub>1-2</sub> superkomplex *Saccharomyces cerevisiae* (převzato z [48])

A- III<sub>2</sub>-IV<sub>1-2</sub> superkomplex s navázaným cytochromem *c* na komplex III. Červená a modrá šipka značí protein QCR6 komplexu III a vazebné místo pro cytochrom *c* na komplexu IV. Helixy a smyčky komplexů jsou zvýrazněny barevně. První interakční stranu komplexu III představuje cytochrom *b* (zelená), cytochrom *c*<sub>1</sub> (červená), podjednotka RIP1 (tyrkysová), QCR6 proteinové rameno (modrá), podjednotka QCR7 (oranžová), podjednotka QCR8 (světle fialová), podjednotka QCR9 (žlutá), kardiolipin a fosfatydl ethanolamin (cihlová) a druhou interakční stranu komplexu IV tvoří Cox I (tmavě modrá), Cox II (zelená), Cox III (růžová), Cox IV (purpurová), Cox VIc (hnědá), Cox VIIa (světlá oranžová) a Cox VIIc (světle hnědá) podjednotky. A<sub>2</sub>-Zobrazení III<sub>2</sub>-IV<sub>1-2</sub> superkomplexu elektronovým mikroskopem.

### ***I-III<sub>2</sub>-IV<sub>1-4</sub> superkomplex***

Tento superkomplex představuje nejvyšší formu asemblace OXPHOS komplexů a je nazýván též respirasom. Elektronová mikroskopie znázornila I-III<sub>2</sub>-IV<sub>1</sub> superkomplex (~1700 kDa) jako nepravidelný trojúhelník ve dvou různých orientacích (pravá a levá), přičemž jedna vždy převažuje. Dva výrazné velké výběžky tvoří matrixové rameno komplexu I a dimer komplexu III. Podél malého výběžku tvořeného matrixovou doménou dimeru komplexu III je rozprostřena membránová doména komplexu I. Komplex IV je umístěn v opozici ku matrixovému ramenu komplexu I. Zajímavé je, že komplex IV interaguje s ostatními

složkami superkomplexů prostřednictvím místa, kterým jinak interaguje s dalším monomermem za tvorby dimeru. V membránové rovině byl superkomplex zobrazen ve tvaru písmene L (obr. 15).



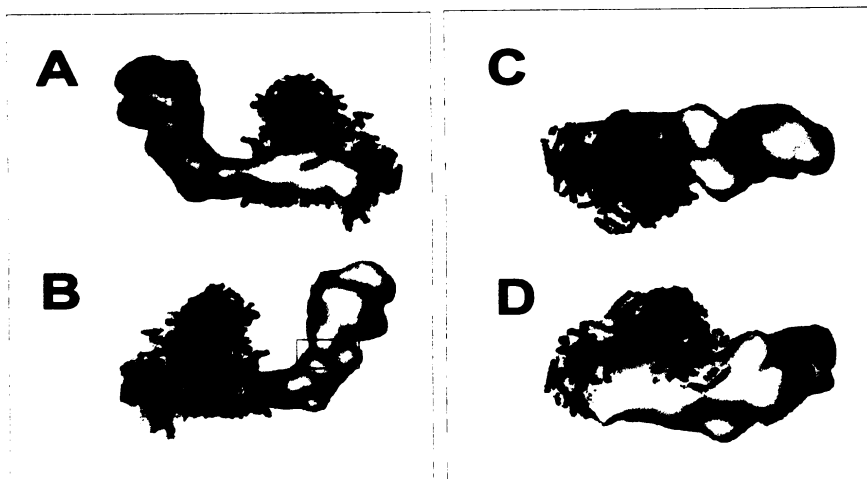
**Obr. 15 2D mapa I-III<sub>2</sub>-IV<sub>1</sub> superkomplexu pořízená elektronovou mikroskopií (převzato z [41])**

Na snímku jsou znázorněny 2 možné interakce komplexu III (červená) a komplexu IV (zelená) v I-III<sub>2</sub>-IV<sub>1</sub> superkomplexu. Zbývající část superkomplexu je komplex I. A-komplex IV interaguje větší plochou s komplexem I. B-komplex IV interaguje větší částí s komplexem III, s komplexem I je v minimálním kontaktu.

Nedávno byla úspěšně prezentována 3D projekce superkomplexu I-III<sub>2</sub>-IV<sub>1</sub> z hovězích srdečních mitochondrií (obr. 16). Toto zobrazení umožnilo jednoznačně určit pozice a orientace všech tří komplexů v superkomplexu. Dále mohla být přesně lokalizována vazebná místa pro cytochrom *c* a ubiquinol ve struktuře jednotlivých komplexů a tím bylo potvrzeno, že vazebné místo pro mobilní elektronové nosiče jednoho komplexu je v úzké blízkosti s vazebným místem druhého komplexu, což umožňuje přímý substrátový channelling v superkomplexu díky krátké difusní vzdálenosti mobilních elektronových nosičů.

Prostorové uspořádání komplexů superkomplexu I-III<sub>2</sub>-IV<sub>1</sub> odpovídá uspořádání zjištěnému z 2D struktury. Navíc byla zjištěna strukturální odlišnost matrixového ramene individuálního komplexu I od komplexu I v superkomplexu způsobená konformační variabilitou jeho domén. Také vazbou dimeru komplexu III do superkomplexu dochází k jeho nepatrné změně ve struktuře. 3D mapa I-III<sub>2</sub>-IV<sub>1</sub> též ukazuje rozsáhlé interakční plochy komplexu III<sub>2</sub> a IV s komplexem I, který je tak udržován ve své stabilní konformaci [49].





**Obr. 16 3D mapa superkomplexu I-III<sub>2</sub>-IV<sub>1</sub> izolovaného z hovězích srdečních mitochondrií (převzato z [49])**

A, B - Zobrazení superkomplexu I-III<sub>2</sub>-IV<sub>1</sub> podél membránové roviny. Komplex I-žlutý, komplex III<sub>2</sub>-červený, komplex IV-zelený. Vazebné místo pro cytochrom *c* (označeno světle modrým rámečkem) v komplexu III je v cytochrom *c*<sub>1</sub> podjednotce, v případě komplexu IV interaguje cytochrom *c* s globulární doménou podjednotky II. Vazebná místa pro ubiquinon jsou pro komplex I označena tmavě šedým a pro komplex III tmavě modrým rámečkem. C - Superkomplex I-III<sub>2</sub>-IV<sub>1</sub> zobrazen z matrixové strany. D - Superkomplex I-III<sub>2</sub>-IV<sub>1</sub> zobrazen z mezimembránového prostoru.

### 1.6.3 Stechiometrie komplexů v superkomplexech

Superkomplexy I-III<sub>2</sub> a I-III<sub>2</sub>-IV<sub>1</sub> z hovězích srdečních mitochondrií solubilizované digitoninem byly v aktivním stavu izolované nativní elektroforézou a strukturně charakterizovány elektronovou mikroskopií. Výsledky ukázaly, že tyto dva superkomplexy jsou strukturně příbuzné, jelikož I-III<sub>2</sub> superkomplex je stavebním základem pro větší I-III<sub>2</sub>-IV<sub>1</sub> superkomplex.

Stechiometrie jednotlivých komplexů v superkomplexech má také své funkční opodstatnění. Krystalická struktura komplexu III napovídá, že tento komplex je funkční ve formě dimeru. Tomu napovídá i fakt, že dimer komplexu III je esenciální pro asemblaci a stabilitu komplexu I. Oba monomery se totiž vzájemně odlišují ve vazebných vlastnostech k cytochromu *c*, vazebným místem, ve kterém probíhá redukce ubiquinonu, a elektrony jsou tedy přenášeny mezi ekvivalentními hemy ve dvou monomerech.

Komplex IV je ve své krystalické struktuře také jako dimer, ale v superkomplexe I-III<sub>2</sub>-IV<sub>1</sub> se vyskytuje jako monomer. Dimerizace komplexu IV má tedy spíše strukturní, než funkční opodstatnění. Jak už bylo zmíněno, komplex IV asociuje s komplexem III<sub>2</sub> a I prostřednictvím

stejného místa, které je jinak místem pro dimerizaci. Dochází nejspíš ke kompetici mezi tvorbou dimeru nebo superkomplexu I-III<sub>2</sub>-IV<sub>1</sub>, přičemž komplex IV se v tomto velkém superkomplexu může vyskytovat v 1-4 kopiích. Důležité však je, že komplex IV vysoce stabilizuje I-III<sub>2</sub>-IV<sub>1</sub> superkomplex, protože minoritní frakce superkomplexu I-III<sub>2</sub> po izolaci disociuje na jednotlivé komplexy, zatímco I-III<sub>2</sub>-IV<sub>1</sub> superkomplex zůstává intaktní a aktivní. Tyto poznatky naznačují, že I-III<sub>2</sub>-IV<sub>1</sub> superkomplex by mohl být fyziologicky významnou funkční jednotkou respiračního řetězce savčích mitochondrií [49].

#### 1.6.4 Superkomplexy savčích mitochondrií

Funkční asociace komplexu I a III byla dokázána porovnáním katalytických aktivit těchto komplexů a aktivity vzniklého superkomplexu I-III<sub>2</sub> v závislosti na solubilizaci mitochondrií detergenty digitoninem a dodecylmaltosidem. Strukturní asociace komplexů I, III a IV byla dokázána kvantitativní solubilizací různými detergenty a následnou separací pomocí BN-PAGE. Například při solubilizaci mitochondrií Tritonem X-100 (vyšším poměrem Triton X-100/protein) byl separován individuální komplex I, III a IV a superkomplexy, které obsahovaly monomerní komplex I, dimerický komplex III a rozdílné množství komplexu IV (0 až 4 kopie). Při solubilizaci digitoninem byly pozorovány pouze dva superkomplexy I-III<sub>2</sub> a I-III<sub>2</sub>-IV o hmotnostech 1500 a 1700 kDa. Předpokládá se, že se tyto superkomplexy v nativních mitochondriálních membránách řetězí do ještě větších celků [42].

#### 1.6.5 Role superkomplexů v lidské fyziologii a patofyziologii

Superkomplexy I-III<sub>2</sub> a I-III<sub>2</sub>-IV<sub>1</sub> byly identifikovány jako dva hlavní fragmenty respirasomu ve zdravé lidské mitochondrii, ale ne vždy u pacientů s mitochondriální poruchou. Analýza buněk pacientů s nedostatečně asemblovanými komplexy I nebo IV ukázala, že tyto komplexy nejsou potřebné pro stabilitu ostatních OXPHOS komplexů. Bylo však zjištěno, že genetický defekt způsobující zkrácení cytochromu *b*, který se projevuje poruchou asemblace komplexu III, následně způsobuje neúplnou asemblaci komplexu I [42]. Dochází tedy ke vzniku kombinovaného komplexu III/I defektu. U pacientů s deficitem komplexu IV (nesoucích mutaci *SURF1* genu) bylo prokázáno rapidně snížené množství komplexu IV a I-III<sub>2</sub>-IV<sub>1</sub> superkomplexu, avšak množství ostatních komplexů nebylo ovlivněno a superkomplex I-III<sub>2</sub> byl detekován ve zvýšeném množství. Komplex I a III<sub>2</sub>

v tomto případě formují stabilní jádro respirasomu (I-III<sub>2</sub>), na které se posléze váže komplex IV. Na druhé straně, primární defekt komplexu I nebo komplexu III se u pacientů projevilo absencí tohoto stabilního I-III<sub>2</sub> jádra. Defekt komplexu I se u pacientů vyznačoval absencí komplexu I, I-III<sub>2</sub> i I-III<sub>2</sub>-IV<sub>1</sub> superkomplexu, ale normální hladinou ostatních komplexů III, IV a V. Ve třetím případě defekt komplexu III u pacientů způsobil výraznou redukci komplexu III, ale množství komplexu IV a V ovlivněno nebylo. Komplex I byl detekován jen v malém množství přítomném v I-III<sub>2</sub>-IV<sub>1</sub> superkomplexu, ale i toto malé množství asemblovaného komplexu I může být dostačující pro dosažení jeho požadované aktivity. Přítomnost komplexu III je tedy nutná pro asemblaci a stabilitu komplexu I [44].

Jak v případě normálních mitochondrií, tak u mitochondrií s různými defekty respiračních enzymů, zůstává stěžejní otázkou, jaké množství, resp. podíl, respiračních enzymů se nachází *in vivo* ve formě superkomplexů a jaký to má funkční význam.

## 1.7 Mitochondriální onemocnění

Dysfunkce enzymů OXPHOS spojené se sníženou produkcí ATP vedou ke vzniku velké skupiny tzv. mitochondriálních onemocnění. Protože mitochondrie jsou svojí oxidační fosforylací primárními zdroji energie, jejich defekty nejvíce postihují orgány s vysokými energetickými nároky. Maternálně zděděné nebo autosomálně recesivní choroby způsobené mitochondriálními mutacemi se proto nejvíce projevují v mozku, svalech, srdci, játrech, ledvinách a  $\beta$ -buňkách pankreatu.

Respirační řetězec je metabolická dráha kontrolovaná jak mitochondriální DNA tak jadernou DNA. Mitochondriální onemocnění lze proto rozdělit na onemocnění způsobená mutacemi v mtDNA, která podléhají pravidlům mitochondriální genetiky, na rozdíl od onemocnění způsobených mutacemi v nDNA řízenými pravidly autosomální dědičnosti [50].

### 1.7.1 Mitochondriální onemocnění způsobená mutacemi v mtDNA

Lidská mtDNA je kruhová, dvouvláknová molekula o velikosti 16,569 kb vyskytující se v buňce ve stovkách až tisících kopiích. Obsahuje 37 genů, a to 2 rRNA geny, 22 tRNA genů a 13 strukturních genů kódujících podjednotky komplexu I (ND1-ND4, ND4L, ND5 a ND6), komplexu III (cytochrom *b*), komplexu IV (COX I, COX II a COX III) a komplexu V (ATP6 a ATP8). Mutace mtDNA se obvykle vyskytují jen v určitém počtu mtDNA a v buňce (ve tkáni) existují spolu s normálními mtDNA. Jedná se o tzv. heteroplazmii. Po překročení množství mutovaných mtDNA dochází k projevu mitochondriálního onemocnění. Prahová

hodnota pro daný typ mutace v mtDNA je tkáňově specifická. Mutace mtDNA se dělí na (i) mutace narušující proteinovou syntézu a (ii) a mutace v genech kódujících podjednotky komplexů dýchacího řetězce. V tabulce 1 níže jsou uvedeny příklady některých mutací.

<b><i>Mutace narušující proteinovou syntézu</i></b>	
<b>Mutace mtDNA</b>	<b>Klinický fenotyp</b>
Delece mtDNA	KSS, oční myopatie, PS
Bodová mutace tRNA <sup>Leu (UUR)</sup>	MELAS
Bodová mutace tRNA <sup>Lys</sup>	MERRF
Jiné bodové mutace tRNA	Rozmanité fenotypy
<b><i>Mutace v mtDNA genech kódujících podjednotky OXPHOS komplexů</i></b>	
<b>Gen</b>	<b>Klinický fenotyp</b>
ATP6 (komplex V)	NARP, MILS
ND1, ND4, ND6 (komplex I)	LHON
ND1, ND4 (komplex I)	myopatie
Cytochrom <i>b</i> (komplex III)	myopatie
COX III (komplex IV)	myopatie

**Tabulka 1 Příklady mutací v mtDNA**

**KSS** - Kearnuv-Sayruv syndrom; **PS** - Pearsonuv syndrom; **MELAS** - Mitochondriová encefalomyopatie s laktátovou acidosou a příhodami podobnými záchvatům mrtvice; **MERRF** - Mutace proteinové syntézy (Myoklonická epilepsie s potřanými svalovými vlákny); **NARP** - Neurogenní svalová ochablost s ataxií a pigmentovými změnami v sítnici; **MILS** – maternálně zděděný Leighuv syndrom; **LHON** - Leberova dědičná optická neuropatie

### 1.7.2 Mitochondriální onemocnění způsobená mutacemi v nDNA

Tato onemocnění jsou více početná, jelikož struktura a správná funkce dýchacího řetězce je přísně kontrolována právě nDNA. nDNA kóduje nejen veškeré podjednotky komplexu II, většinu podjednotek ostatních komplexů dýchacího řetězce, CoQ<sub>10</sub> a cytochrom *c*, ale také asemblační faktory, které jsou potřebné pro biogenezi OXPHOS komplexů. nDNA dále (i) řídí syntézu fosfolipidů vnitřní mitochondriální membrány a guanosin trifosfátu (podobnému dynaminu), který umožňuje pohyb mitochondrií po mikrotubulech, (ii) kóduje faktory řídicí integrity a replikaci mtDNA, (iii) kóduje složky transportního aparátu, který umožňuje transport jaderně kódovaných proteinů z cytosolu do mitochondrií. Mutace genů kódujících podjednotky a asemblační faktory komplexů a s nimi spojená onemocnění jsou uvedeny níže v tabulce 2.

<b>Mutace v jaderných genech kódujících podjednotky a asemblační faktory komplexů</b>	
<b>Gen pro podjednotku</b>	<b>Klinický fenotyp</b>
NDUF (komplex I)	LS
SDHA (komplex II)	LS
<b>Gen pro asemblační faktor</b>	<b>Klinický fenotyp</b>
BCS1L (komplex III)	GRACILE
SURF1 (komplex IV)	LS
SCO1 (komplex IV)	Hepatoencefalomyopatie
SCO2 (komplex IV)	Kardioencefalomyopatie
COX10 (komplex IV)	Nefroencefalomyopatie
COX15 (komplex IV)	Kardioencefalomyopatie
ATP 12 (komplex V)	Fatální multisystémové novorozenecké onemocnění (postihující mozek, játra, srdce, svaly)

**Tabulka 2 Příklady mutací nDNA**

LS – Leighův syndrom; GRACILE – Retardace růstu, aminoacidurie, zvýšený cholesterol, laktátová acidosa, brzké úmrtí

Z hlediska organizace dýchacího řetězce jsou zajímavé mutace nDNA způsobující izolovaný defekt jednoho enzymového komplexu, který se podílí na formování superkomplexů. V tomto směru je namístě zabývat se otázkou, zda také dochází ke změnám ve složení superkomplexů a do jaké míry. Nejfrekventovanější jsou mutace jaderných genů kódujících asemblační intermediáty komplexu IV, které se účastní při sestavování tohoto enzymu. Defekty či absence těchto asemblačních faktorů vedou ke vzniku neúplných forem COX a s tím spojené snížené aktivitě enzymu a k poklesu množství COX holoenzymu.

### 1.7.3 Mitochondriální onemocnění spojená s poruchou asemblace COX

Defekty COX způsobené mutacemi ve strukturních genech mtDNA jsou popisovány od roku 1995. Jedná se o čtyři mutace genu podjednotky COX I, tři mutace genu podjednotky COX II a čtyři mutace genu podjednotky COX III [51]. Pro tyto mutace je charakteristický izolovaný defekt COX. Podle uvažované prahové teorie se projeví defekt enzymu až po překročení prahu pro danou mutaci, což je většinou > 75 % heteroplazmie.

V posledních letech bylo popsáno mnoho patogenních mutací lokalizovaných v jaderných genech kódujících COX specifické asemblační faktory SURF1, SCO1, SCO2, COX10, COX15 a LRPPRC (gen kódující mRNA vazebný protein). Jako první byly identifikovány

mutace v *SURF1* genu, které způsobují vážné a zároveň nejčastější defekty COX projevující se poškozením funkce dýchacího řetězce o různé intenzitě v různých tkáních. S tím jsou také spojeny změny ve struktuře superkomplexů a jejich množství, jelikož COX je ve většině případech jejich součástí.

### 1.7.3.1 Surf1 protein – asemblační faktor cytochrom *c* oxidasy

Asemblační faktory COX nejsou součástí molekuly enzymu, ale jsou esenciální pro jeho asemblaci. Geny kódující buď asemblační faktory, nebo samotné podjednotky COX představují potenciální kandidáty pro patologické změny související s COX defekty.

*SURF1* gen o délce 4,7 kb obsahuje devět exonů a je lokalizován v tzv. surfeit lokusu – genovém klastru šesti housekeepingových genů na devátém chromosomu v oblasti 9q34 [52]. *SURF1* gen kóduje Surf1 protein (Surf1p) o délce 300 aminokyselin, který je nezbytný pro asemblaci COX a funkci dýchacího řetězce. Role Surf1p byla studována na všech úrovních exprese COX. Nebyly nalezeny žádné změny množství mitochondriálně nebo jaderně kódovaných COX transkriptů, ani změny v jejich translaci, což poukazuje na funkci Surf1p v pozdějších fázích exprese COX. Analýzou mitochondrií pacientů s defektem COX, projevujícím se jako Leighův syndrom, pomocí dvourozměrné elektroforézy BN-PAGE/SDS-PAGE byla zjištěna akumulace nejmenších asemblačních intermediátů COX. Asemblace byla přerušena ve fázi S2 intermediátu, což dokazuje, že Surf1p se uplatňuje při inkorporaci jedné či více podjednotek, mezi které mohou patřit COX II, COX III a většina jaderně kódovaných COX podjednotek [53].

V současnosti bylo popsáno více než 30 různých patogenních mutací v *SURF1* genu. Většina z nich jsou nesmyslné mutace charakteristické vznikem předčasněho stop kodónu, následuje translace nekompletních forem Surf1p, které jsou rapidně degradovány, nebo nestabilita *SURF1* mRNA, která řídí syntézu proteinu [54]. Většina mutací byla shrnuta v práci Pequignot a kol. 2001 [55] a stále jsou publikovány nově nalezené mutace *SURF1*.

Při studii fibroblastů tří pacientů s Leigh syndromem (LS) bylo sekvenční analýzou *SURF1* genu odhaleno 7 heterozygotních mutací, z nichž 6 bylo nových. Jednalo se o inzerci, nesmyslnou mutaci, sestřihovou mutaci intronu 7 a 3 mutace způsobující substituci aminokyselin modifikující Surf1p. Transkripce COX genů byla normální, přičemž translace nebo stabilita asemblovaných subkomplexů byla narušena [56].

Gly<sup>124</sup> je lokalizován ve vysoce konzervovaném regionu *SURF1* genu a mutace G385 A(Gly<sup>124</sup>→Glu), způsobující deficit COX, poukazuje na jeho zásadní roli pro strukturu a

funkci Surf1p. Asp<sup>202</sup> je konzervovaný u savců a substituce G618 C (Asp<sup>202</sup>→ His) je nejspíš polymorfismus, jelikož tato substituce byla nalezena vždy v jedné alele u dvou kontrol. Další mutací je T751 C měnící Ile<sup>246</sup> na Thr. V této pozici je striktně konzervovaná hydrofobní aminokyselina ve všech eukaryotech a některých bakteriích a nahrazení Ile<sup>246</sup>→ Thr narušuje  $\beta$  strukturu enzymu ve všech vyšších eukaryotech. Substituce Ile<sup>246</sup> na Thr představuje molekulární defekt způsobující onemocnění, protože hydrofobní aminokyselina nebo  $\beta$  struktura jsou nezbytné pro funkci Surf1p [56].

Zkrácení Surf 1 proteinu je zapříčiněno velmi častou mutací charakteristickou pro LS, a to 10-bp delecí (TCTGCCAGCC) spojenou s AT insercí v pozici 326 způsobující nesmyslný kodón v místě mutace. Další takovou mutací je 4-bp (CTGC) inserce v pozici 589 také obsahující stop kodón. Bylo popsáno ještě dalších 9 mutací (posunová mutace, inserce a delece) tvořících předčasný stop kodón [57-59]. Na úrovni míst sestřihu byly pozorovány 3 sestřihové mutace, a to na donorovém místě sestřihu intronu 4 [57], intronu 5 [58,59], intronu 3 [59] a intronu 7 v jedné alele [56].

Dále byla popsána sestřihová mutace způsobující ztrátu exonu 8 [60] a tři nové mutace v lymfoblastických buňkách u japonských pacientů s Leigh syndromem [61]. Mutace C574→ T způsobující změnu konzervovaného argininu 192 na tryptofan (Arg<sup>192</sup>→ Trp) byla popsána ze screeningu českých pacientů [62]. Genetický screening 65-ti čínských pacientů s Leigh syndromem odhalil u osmi případů mutaci *SURF1* s převahou substituce G618 C (Asp<sup>202</sup>→ His).

Absence Surf1p tedy způsobuje vážné defekty COX spojené se sníženou hladinou COX podjednotek, sníženou aktivitou enzymu v různých tkáních pacientů (na 1 – 20 % oproti kontrole) a pokles mitochondriálního membránového potenciálu, což negativně ovlivňuje syntézu ATP. Na základě poruchy asemblace je v mitochondriálních membránách buněk pacientů snížené množství enzymu a akumulují se asemblační intermediáty COX. Tyto strukturální změny mají za následek pozměněné elektron – a proton – transportní vlastnosti enzymu. Mutace *SURF1* genu se klinicky projevují jako výše zmíněný Leighův syndrom (LS) [63].

Leighův syndrom neboli subakutní nekrotizující encefalomyopatie je progresivní neurodegenerativní autosomálně recesivní onemocnění. Choroba nejčastěji propuká v průběhu prvního roku po narození a je charakteristická celkovou psychomotorickou retardací, bilaterálně symetrickými lézemi v podkorové oblasti mozku, záškuby či zatměním v očích. V krvi i cerebrospinální tekutině je zvýšená hladina laktátu (laktátová acidosa). Onemocnění je fatální, pacienti většinou umírají po opakovaných respiračních infekcích na

kardiorespirační selhání mezi třetím až pátým rokem života [64]. Mimo mutací v *SURF1* genu je Leighův syndrom způsoben bodovými mutacemi v genech pro mitochondriální tRNA a defekty dalších mitochondriálních enzymů, a to pyruvát dehydrogenasy, ATP synthasy, NADH-ubichinon oxidoreduktasy a sukcinát dehydrogenasy.



## 2. Cíl práce

Pomocí elektroforetických metod a s využitím specifických protilátek charakterizovat respirační superkomplexy v mitochondriích z myších tkání (srdce, játra, sval, mozek, kultivované fibroblasty) a z lidských fibroblastů. Specifické cíle práce byly:

- 1) charakterizovat specifické složení superkomplexů dýchacího řetězce v různých tkáních kontrolních myší (dále kontrola)
- 2) jelikož se cytochrom *c* oxidasa často vyskytuje v respiračních superkomplexech, snažili jsme se zjistit, jak ovlivňuje snížené množství COX složení, množství a sestavování superkomplexů v myších tkáních se selektivním COX-defektem na podkladě poruchy asemblačního proteinu Surf1 (dále COX-defektní myši)
- 3) pro analýzu řady mitochondriálních chorob se používají fibroblasty a proto bylo naším dalším cílem charakterizovat superkomplexy v mitochondriích z kontrolních myších a lidských fibroblastů
- 4) dále jsme se snažili nalézt změny ve výskytu a složení superkomplexů ve fibroblastech z COX-defektních myší a ve fibroblastech od COX-defektního pacienta s mutací *SURF1* genu

### 3. Použité přístroje a chemikálie

Použité přístroje a chemikálie jsou sepsány v příloze této diplomové práce.

### 4. Experimentální část

#### 4.1 Experimentální modely

Jako experimentální model byly použity mitochondrie izolované z tkání myši (játra, srdce, mozek, kosterní sval a fibroblasty), a to z kontrolních myši a z myši s izolovanou COX deficiencí způsobenou absencí Surf1p na základě knock-outu. Myši s knock-outem *SURF1* genu byly vytvořeny v laboratoři prof. M. Zevianiho (Istituto Neurologico Carlo Besta, Milán, Itálie) [65] na základě inserce loxP sekvence do exonu 7 myšního *SURF1* genu.

Dále byly použity kultury kožních fibroblastů od pacienta se *SURF1* mutací projevující se jako Leighův syndrom. Pacient byl smíšený heterozygot s oběma mutovanými alelami, první alela obsahovala inserci AT na pozici 312 vedoucí ke vzniku předčasného stop kodónu a druhá alela delecí 18 bp vedoucí k porušení sestřihu a vynechání exonu 8 [63]. Lidské fibroblasty byly kultivovány v DMEM médiu s 10% fetálním hovězím sérem a 20mM HEPES o pH 7,5 v přítomnosti penicilinu o koncentraci 10 u/ml a streptomycinu o koncentraci 10 µg/ml. Kultivace probíhala v termostatu při 37°C v atmosféře s 5% CO<sub>2</sub>. Imortalizované myší fibroblasty byly kultivovány v přítomnosti antibiotika geneticinu o koncentraci 50 µg/ml. Jako kontrolní materiál byly použity fibroblasty od jedinců bez mitochondriálních onemocnění.

#### 4.2 Izolace mitochondrií z myších tkání

Izolace mitochondrií ze všech tkání byla provedena při 4 °C, pro centrifugaci byla použita chlazená centrifuga Sigma BK18.

##### 4.2.1 Izolace mitochondrií ze svalu

Vzorek svalové tkáně byl zvážěn ve vychlazeném KP médiu (150 mM KCl, 2 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, PIC (1:500), pH 7,4) a nastříhán na malé kousky na Petriho misce položené na ledu. Po nastříhání byla svalová tkáň přenesena ve špičce pipety do skleněného homogenizéru a rozmixována pomocí sondy o průměru 8 mm na ultrathoraxu KIA (2-krát 15 sekund na stupeň 4), a poté zhomogenizována pomocí teflonového pístu (při 600 rpm 5-krát tahem pístu). Získaný 5% homogenát byl rozpipetován

do 2 ml zkumavek eppendorf a centrifugován 10 minut při 600 g. Získaný postnukleární supernatant byl centrifugován 10 minut při 10 000 g. Sedimentované mitochondrie byly promyty v K médiu (150 mM KCl, 2 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 7,4) a ještě jednou stočeny 10 minut při 10 000 g. Po resuspendování sedimentu v malém objemu K média byla stanovena koncentrace proteinu ve vzorku metodou podle Bradfordové.

#### **4.2.2 Izolace mitochondrií z jater**

Jaterní tkáň byla rozstříhána na malé kousky a po propláchnutí v STEAP médiu (250 mM sacharosa, 10 mM Tris, 2 mM EDTA, PIC (1:500), pH 7,2) zvážena (2 myši játra ~ 2 g). Poté byla tkáň po částech homogenizována v homogenizátoru teflon/sklo 6-8-krát tahem pístu při 600 rpm. Vzniklý 10% homogenát byl centrifugován 10 minut při 800 g pro odstranění jader a zbytků tkáně. Postnukleární supernatant byl zfiltrován přes gázu, centrifugován 15 min při 5200 g a vyflotovaná bílá tuková vrstva byla odstraněna. Získaný sediment obsahující mitochondrie byl resuspendován v polovičním objemu STEAP média a centrifugován 10 minut při 13 000 g. Pelet byl jednou promyt v STEAP médiu a opět stočen 10 minut při 13 000 g. V poslední fázi izolace byl pelet resuspendován v STE médiu (250 mM sacharosa, 10 mM Tris, 2 mM EDTA, pH 7,2), 1g tkáně v 1 ml STE, a zhomogenizován v menším homogenizéru 4-5-krát tahem pístu. Koncentrace proteinu ve vzorku jaterních mitochondrií byla stanovena metodou podle Bradfordové.

#### **4.2.3 Izolace srdečních mitochondrií**

Mitochondrie ze srdeční tkáně byly izolovány stejným postupem, jako z jaterní tkáně, jen po stočení 10% homogenátu při 600 g se postnukleární supernatant rovnou centrifugoval při 13 000 g.

#### **4.2.4 Izolace mitochondrií z fibroblastů [66]**

##### **4.2.4.1 Sklizení buněk:**

Kultivační médium bylo slito do kádinky a uschováno na ledu. Adherované buňky na dně lahve byly propláchnuty 5 ml PBS (0,14 M NaCl, 5 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2-7,3). Po odsání PBS byl k buňkám přidán TE roztok (2% trypsin s 2% EDTA), 1,5 ml na plochu dna kultivační lahve 75 cm<sup>2</sup>, a buňky byly inkubovány při 37°C, dokud se nezačaly odlupovat. Do každé lahve bylo poté přidáno asi 5-10 ml kultivačního média a buňky byly slity do 15 ml centrifugační zkumavky sarstedt. Dno lahve bylo

několikrát opláchnuto médiem, aby se uvolnily veškeré buňky. Spojené sebrané buňky byly centrifugovány za pokojové teploty 5 min při 1800 rpm na Centrifuze Cenatur 2. Sediment byl resuspendován v ledovém PBS, objem vzorku byl doplněn PBS do 15 ml a opět stočen 5 min při 600 g. Sedimentované buňky stejného typu byly resuspendovány v malém objemu PBS, resuspendované pelety byly spojeny do jedné předvážené zkumavky sarstedt a centrifugovány 5 min při 600 g. Po odsání supernatantu a zvážení zkumavky s peletem byla vypočtena hmotnost peletu.

#### **4.2.4.2 Izolace mitochondrií**

Zvážený pelet byl resuspendován v desetinásobku objemu 10 mM Tris pufru, který obsahoval inhibitory proteas (PIC) v poměru 1:500. Resuspendované buňky byly posléze homogenizovány v homogenizéru teflon/sklo při 600 otáčkách 8-krát tahem pístu. K homogenátu byla ihned přidána 1/5 objemu 1,5 M sacharosy a po důkladném promíchání na vortexu byl homogenát centrifugován 10 min při 600 g. Po centrifugaci byl supernatant obsahující mitochondrie uschován na ledu, sediment byl resuspendován v původním objemu SEKTP (250 mM sacharosa, 40 mM KCl, 20 mM Tris-HCl, 2 mM EGTA, pH 7,6, PIC (1:500)) a rehomogenizován při 800 rpm 5-krát tahem pístu. Homogenát byl následně centrifugován 10 min při 600 g a vzniklý supernatant byl spojen se supernatantem z minulé centrifugace. Po 10-ti minutové centrifugaci spojených supernatantů při 10 000 g byl pelet resuspendován v 500  $\mu$ l SEKTP a naposled centrifugován 10 min při 10 000 g. Pelet obsahující mitochondrie byl poté opět resuspendován v 500  $\mu$ l SEKTP, pro stanovení koncentrace proteinů byl odebrán 1 a 2  $\mu$ l mitochondrií do 1 ml destilované vody. Mitochondrie byly uchovány při -70 °C pro další analýzu.

#### **4.3 Stanovení koncentrace proteinů podle Bradfordové [67]**

Nejprve byly připraveny standardní roztoky pro kalibrační křivku podle tabulky 3 naředěním standardního roztoku BSA o koncentraci 0,2 mg BSA/ml H<sub>2</sub>O. Vzorky byly stanovovány v dubletech, vždy 1  $\mu$ l a 2  $\mu$ l vzorku doplněné do 1 ml destilovanou vodou. Nejprve byly vzorky 20 s sonikovány (microtip, intenzita 20%) a posléze bylo přidáno ke každému vzorku a ke kalibračním vzorkům BSA standardu 250  $\mu$ l Bradfordova roztoku (Bio-Rad protein assay, katalogové číslo 500-0006). Roztoky byly promíchány na vortexu a po dvou minutách byla proměřena jejich absorbance při vlnové délce 595 nm na spektrofotometru Eppendorf Bio Photometr v kyvetě s délkou optické dráhy 1 cm.

V <sub>BSA</sub> (μl)	V <sub>H<sub>2</sub>O</sub> (ml)
0	1,00
20	0,98
40	0,96
60	0,94
80	0,92
100	0,90

**Tabulka 3 Příprava kalibračních roztoků pro stanovení koncentrace proteinů ve vzorku podle Bradfordové**

#### 4.4 Separační elektroforetické metody

Různé typy elektroforetických separací mitochondriálních proteinů na polyakrylamidovém gelu ve spojení s imunochemickou detekcí technikou Western-blotu jsou účinnými postupy pro analýzu změn proteinového obsahu nebo složení podjednotek mitochondriálních proteinů. Tyto proteiny mohou být separovány při nativních nebo denaturujících podmínkách nebo jejich kombinací [68].

PAGE (polyakrylamidová gelová elektroforéza) využívá polyakrylamidový gel jako elektroforetické médium. Směs akrylamidu a bisakrylamidu polymerizuje pomocí volných radikálů poskytovaných peroxosíranem amonným (AP), který způsobuje štěpení vazeb O-O. K urychlení polymerizace se používá volná zásada TEMED, která katalyzuje tvorbu volných radikálů peroxosíranu amonného [69].

Modrá nativní polyakrylamidová gelová elektroforéza (BN-PAGE) se používá pro separaci multiproteinových komplexů při nedenaturujících podmínkách. Při analýze proteinů dýchacího řetězce, od 10 kDa do 10 MDa, jsou intaktní multipodjednotkové komplexy separovány bez ztráty enzymatické aktivity. Tato metoda využívá aniontového barviva Coomassie blue G-250, které se váže na povrch všech membránových proteinů a posouvá jejich izoelektrický bod (pI) k negativnějším hodnotám. Proteinové komplexy tak migrují k anodě při elektroforéze při pH 7,5 bez ohledu na jejich pI a separují se podle své velikosti. Nejlepší separace je dosaženo v gelu s polyakrylamidovým gradientem se snižující se velikostí pórů. Dochází tak ke snížení migrační rychlosti proteinů na základě hmotnosti proteinů [70]. Proteiny se díky svým negativně nabitým povrchům vzájemně odpuzují, čímž je minimalizována jejich agregace. Po navázání Coomassie blue ztratí membránové proteiny také svůj povrchový hydrofobní charakter a tím se stanou rozpustnými ve vodě. Pro analýzu mitochondriálních komplexů se solubilizují mitochondrie pomocí neiontových detergentů,

jako digitonin, lauroyl maltosid (LM) nebo Triton X-100, které mají rozdílnou schopnost zachovat slabé, nekovalentní interakce mezi komplexy [71].

SDS elektroforéza (SDS-PAGE) probíhá při denaturačních podmínkách. Separují se všechny nekovalentně vázané polypeptidy podle své molekulové hmotnosti. Jedním z nejužívanějších systémů je Tricin-SDS, kdy se dobře separují proteiny i o nižší molekulové hmotnosti [72]. SDS je anionogenní tenzid, který denaturuje terciární strukturu proteinů rozrušením vodíkových vazeb a rozvine jejich molekuly do lineárních řetězců. Disulfidické můstky tvořené z postranních sulfhydrylových zbytků cysteinů jsou dále rozštěpeny redukčním thiolovým činidlem 2-merkaptoethanolem. Rozvinuté aminokyselinové řetězce pak navázáním SDS změny svou prostorovou konformaci a v komplexu s SDS tvoří globulární částice. Náboj bílkovin je úplně překryt zápornými dodecylsulfátovými anionty, takže se při elektroforéze uplatňuje jen tvar a velikost molekul. Obecně platí, že na 1 g proteinu se váže 1,4 g SDS. Pohyblivost molekul je zde nepřímo úměrná jejich relativní molekulové hmotnosti [73].

Kombinací nativní elektroforézy v prvním rozměru a SDS elektroforézy ve druhém rozměru (BN-PAGE/SDS-PAGE) vznikají 2D polypeptidové mapy, které poskytují komplexní informace o složení individuálních komplexů a jejich množství v analyzovaném vzorku [68]. Na základě této metody bylo odhaleno, že komplexy mitochondriálního respiračního řetězce jsou spojovány do superkomplexů nebo respirasomů, strukturních a funkčních jednotek respirace. Tato metoda byla úspěšně aplikována pro analýzu změn v komplexech OXPHOS u mitochondriálních encefalomyopatií, pro analýzu deficiencie cytochrom *c* oxidasy v klinických studiích a změn v mitochondriálních proteinech u Parkinsonovy choroby a u Alzheimerovy choroby [74].

Další, velmi užitečná metoda, pro analýzu složení superkomplexů je dvourozměrná elektroforéza využívající BN-PAGE v prvním i ve druhém rozměru, přičemž se liší detergenty používanými v prvním a ve druhém rozměru. Velmi jemný detergent digitonin v prvním rozměru umožňuje zachovat i nejslabší interakce mezi OXPHOS komplexy. Ty se naopak rozruší silnějším detergentem, například LM, ve druhém rozměru. Superkomplexy pak disociují na jednotlivé intaktní komplexy popřípadě na specifické subkomplexy [46].

#### 4.4.1 Nativní elektroforéza (BN-PAGE)

##### 4.4.1.1 Příprava vzorků

Mitochondrie byly po centrifugaci resuspendovány v MB2 pufru (1,5 M  $\epsilon$ -aminokapronová kyselina, 150 mM Bis-tris, 0,5 mM EDTA, pH 7,0) a následně solubilizovány neiontovými detergenty digitoninem a LM. K příslušnému množství mitochondrií resuspendovaných v MB2 pufru byl přidán 3% roztok digitoninu do požadované koncentrace 4 nebo 8 mg digitoninu/mg proteinu a 10% roztok LM do požadované koncentrace 1 nebo 4 mg LM/mg proteinu. Objem vzorků s MB2 pufrém a detergentem byl připraven tak, aby konečná koncentrace proteinu pro jaterní, srdeční, svalové, mozkové mitochondrie byla 2 mg/ml a pro mitochondrie z fibroblastů 1,5 mg/ml. Vzorky byly 15 min inkubovány při 0°C za občasného promíchání (vortex). Membránové proteiny uvolněné do solubilní fáze byly poté odděleny od zbytků membrán centrifugací 20 min při 20 000 g. K supernatantu byla následně přidána 1/20 objemu 5% SBG.

##### 4.4.1.2 Pracovní postup

Elektroforéza byla prováděna v MiniProtean II vertikální elektroforetické aparatuře, gely byly připraveny podle tabulky 4.

	Zaostřovací 4% gel		Separáčn1 5% gel	Separáčn1 12% gel
	2,50 ml	5,00 ml	5,00 ml	5,00 ml
3×GB	0,82 ml	1,65 ml	1,65 ml	1,20 ml
AB	0,20 ml	0,40 ml	0,50 ml	1,65 ml
H <sub>2</sub> O	1,45 ml	2,87 ml	2,82 ml	0,80 ml
Glycerol	-	-	-	1,30 ml
AP	30,00 $\mu$ l	60,00 $\mu$ l	30,00 $\mu$ l	7,00 $\mu$ l
TEMED	3,00 $\mu$ l	6,00 $\mu$ l	3,00 $\mu$ l	2,00 $\mu$ l

Tabulka 4 Příprava gelů pro BN-PAGE

Separáčn1 gel s gradientem akrylamidu 5-12 % byl připraven a aplikován pomocí rotační peristaltické pumpy a mísiče gradientů mezi skla podvrstvením pod cca 1 cm destilované vody do výšky asi 2 cm od horního okraje skel. Po zpolymerování gelu a odsátí vody byla mezi skla nalita vrstva 4% zaostřujícího gelu, do níž byl zasunut hřebínek pro vytvoření jamek pro vzorky. Po zpolymerování gelu byly do jamek, vyplněných modrým katodovým pufrém, nanášeny podvrstvením vzorky obsahující požadované množství proteinu, nebo standard („HMW Calibration Kit for Native Electrophoresis“) pro určení molekulových

hmotností separovaných proteinů. Elektroforéza nejprve probíhala při 45 V, a jakmile vzorky domigrovaly do separačního gelu, napětí bylo zvýšeno na 90 V. Gely se separovanými proteiny byly dále použity pro Western-blot (část 4.5) nebo k barvení (část 4.7) pro detekci separovaných proteinů.

#### 4.4.2 2D elektroforéza BN-PAGE/SDS-PAGE, pracovní postup

Nedenaturující nativní elektroforéza v prvním rozměru byla provedena stejným způsobem, jaký je popsán výše, množství nanášeného proteinu bylo 20 µg. Po ukončení separace byl gel nařezán na jednotlivé proužky a uskladněn při -20°C. Před provedením SDS elektroforézy ve druhém rozměru byly proužky gelu 1 hodinu inkubovány v roztoku obsahujícím 1% SDS a 1% merkaptoethanol. Tento krok zajistil úplnou denaturaci proteinových komplexů nezbytnou pro následující separaci jejich podjednotek. Přebytek merkaptoethanolu byl z proužků odstraněn promytím v destilované vodě. Jednotlivé proužky byly následně horizontálně umístěny mezi skla MiniProtean II vertikální elektroforetické aparatury asi ve vzdálenosti 5 mm od horního okraje skel. Separační 10% gel byl nanesen mezi skla do výšky 0,5 cm od proužku gelu a převrstven destilovanou vodou. Po jeho zpolymerování a odsání destilované vody byl nanesen 4% stacking gel až po okraj skel a do levého horního rohu byl zasunut úzký plastový proužek o šířce 3 mm pro vytvoření jamky pro standard. Gely pro SDS elektroforézu byly připraveny podle tabulky 5. Po zpolymerování gelu a nanesení standardu („PageRuler Prestained Ladder“) do jamky probíhala nejprve separace při 45 V, a jakmile proteiny dosáhly separačního gelu, napětí bylo zvýšeno na 90 V. Po ukončení separace byl gel použit pro Western-blot (část 4.5).

	Zaostřovací 4% gel	Separační 10% gel
	5,00 ml	10,00 ml
AB	0,40 ml	2,00 ml
3×GB	1,20 ml	3,30 ml
Glycerol	-	1,00 ml
H <sub>2</sub> O	3,36 ml	3,64 ml
AP	40,00 µl	50,00µl
TEMED	4,00 µl	6,00 µl

Tabulka 5 Příprava gelů pro SDS-PAGE



#### **4.4.3 2D nativní elektroforéza (BN-PAGE/BN-PAGE), pracovní postup**

Elektroforéza byla v prvním rozměru provedena stejným postupem, jako u BN-PAGE/SDS-PAGE, pouze množství nanášeného proteinu bylo 25  $\mu\text{g}$ . Ve druhém rozměru byla použita také BN-PAGE, ale s detergentem LM. Při našich experimentech se ukázal být účinnější postup, kdy proteiny separované v gelu byly ještě před separací ve druhém rozměru inkubovány 1h v 0,02% roztoku LM a LM už nebyl přidáván do katodového pufru. Proužky gelu byly posléze horizontálně umístěny mezi skla a po zpolymerování gradientového (5-12%) gelu a 4% zaostřovacího gelu byl do jamky ve stacking gelu nanesen standard. Na 2D proteinové mapě byly komplexy ve volné formě po solubilizaci digitoninem lokalizovány na diagonále, komplexy solubilizované LM ze superkomplexů migrovaly pod diagonálu.

#### **4.5 Western-blot a imunodetekce na PVDF membráně**

Western-blot v kombinaci s imunodetekcí proteinů navázaných na PVDF membránu představuje velmi citlivou a specifickou metodu pro detekci a kvantifikaci proteinů. Po elektroforéze jsou proteiny přeneseny polosuchým elektrotransferem z gelu na PVDF membránu, na jejímž povrchu jsou naadsorbované molekuly analyzovaných proteinů volně přístupné pro protilátky. Před samotnou specifickou detekcí proteinů polyklonálními nebo monoklonálními protilátkami musí být zablokována volná vazebná místa na membráně. V našem postupu jsme prováděli blokování roztokem sušeného mléka rozpuštěného v PBS. Polosuchý elektrotransfer probíhá mezi dvěma horizontálními grafitovými elektrodami. Na navlhčenou anodu se naskládají v pufrech namočené filtrační papíry, membrána a gel dle postupu popsaném níže a překryjí se katodou. Po spuštění elektrického proudu migrují záporně nabitě proteiny v elektrickém poli k anodě a váží se na PVDF membránu [73]. Následuje imunodetekce proteinů zakotvených na membráně pomocí primárních protilátek, vizualizace komplexů protilátka-protein je uskutečněna pomocí sekundárních protilátek konjugovaných s peroxidasou nebo s fluorescenční značkou.

##### **4.5.1 Elektrotransfer na PVDF membránu**

Ihned po elektroforéze byl gel ekvilibrován 15 min v pufru III. PVDF membrána (Immobilon-P od Millipore) o velikosti 7×10 cm byla smočena 15 s ve 100% methanolu, poté 2 min v ultračisté vodě a ekvilibrována 5 min v pufru III. Na grafitovou anodu navlhčenou pufrem I bylo postupně navrstveno 6 filtračních papírů (Whatmann 3 MM o velikosti 7×10 cm) smočených 30 s v pufru I, 3 filtrační papíry smočené 30 s v pufru II, PVDF membrána

ekvilibrována v pufru II, gel ekvilibrováný v pufru III a 6 filtračních papírů smočených 30 s v pufru III. Vzduchové bubliny mezi vrstvami, které by bránily elektrotransferu proteinů z gelu na PVDF membránu, byly opatrně vytlačeny použitím skleněné zkumavky jako válečku. Následně byla na horní vrstvu filtračních papírů přiložena grafitová katoda navlhčená pufrům III. Elektrotransfer na PVDF membránu probíhal 1 hodinu při 120 mA (0,8 mA/cm<sup>2</sup> membrány). PVDF membrána byla poté usušena na filtračním papíře.

#### 4.5.2 Imunodetekce na PVDF membráně [75]

Suchá membrána byla 2 min ekvilibrována ve 100% methanolu a dalších 5 min v PBS (0,15 M NaCl, 0,02 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,4). Poté byla membrána blokována 1 hodinu v 10% roztoku mléka v PBS. Zbytky mléka byly z membrány odstraněny 2-krát oplachem membrány v PBST (0,3% Tween 20 v PBS). Následně byla membrána 2 hodiny inkubována s koktejlem primárních protilátek rozpuštěných v PBST (Tabulka 6). Po opláchnutí membrány 3-krát 10 min v PBST byla membrána další hodinu inkubována se sekundární fluorescenčně značenou protilátkou Alexa Fluor 680 goat-anti-mouse IgG (Molecular Probes). Následoval 3-krát 10min oplach membrány v PBST a po 10 min oplachu membrány v PBS byla provedena detekce fluorescenčně značených proteinů na PVDF membráně. Pro detekci byl použit fluorescenční scanner Odyssey obsahující diodový laser, který snímá emisi fluorescenčního záření v IR oblasti [76]. Měření bylo prováděno při excitaci 680 nm a emisi 700 nm.

Protilátka proti podjednotce (komplex)	Velikost antigenu (kDa)	Katalogové číslo protilátky	Výrobce	Ředění protilátky v PBST
NDUFB6 (I)	17	MS 108	MitoSciences	1 : 2000
NDUFS6 (I)	30	MS 112	MitoSciences	1 : 2000
Core1 (III)	49	A-21362	Molecular Probes	1 : 2000
COX I (IV)	57	MS 404	MitoSciences	1 : 1000

Tabulka 6 Použité primární protilátky (monoklonální, myší) proti podjednotkám komplexů dýchacího řetězce

#### **4.6 Kvantifikace respiračních komplexů ve volné formě a v superkomplexech**

Kvantifikace množství antigenu byla provedena v programu Aida Image Analyzer 3.21. Pro kvantifikaci byly použity výsledky z analýz mitochondriálních komplexů pomocí 2D BN-PAGE/SDS-PAGE elektroforézy. Detekce fluorescenčního signálu Alexa Fluor 680 pomocí scanneru Odyssey vykazuje prakticky lineární nárůst fluorescence vzhledem k množství značeného proteinu, a to v rozmezí několika řádů [76]. Signál detekovaných podjednotek jednotlivých komplexů je tak úměrný množství těchto komplexů. Grafické vyhodnocení kvantifikace bylo provedeno v programu Microsoft Excel.

#### **4.7 Barvení gelů Coomassie blue R-250 barvivem**

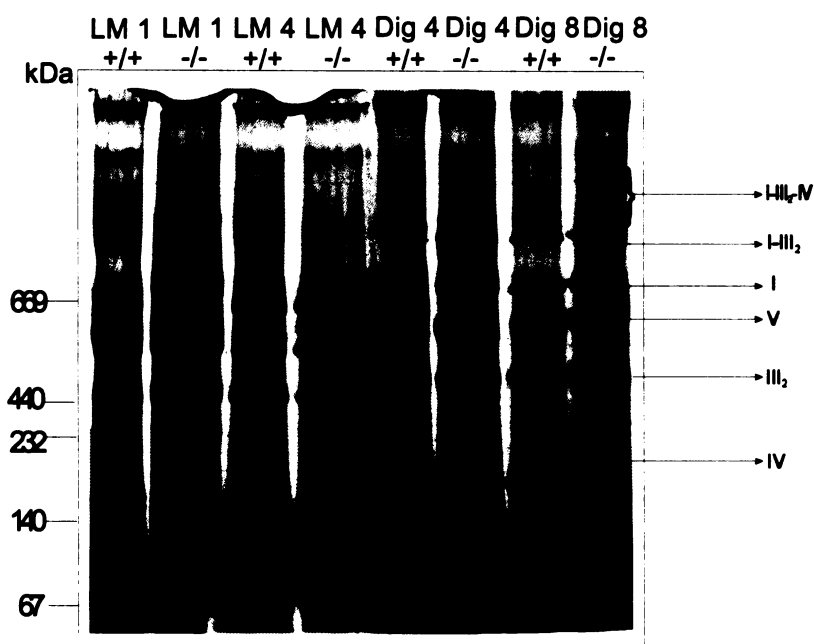
Separované proteiny pomocí BN-PAGE byly také detekovány obarvením Coomassie blue R-250 barvou. V této studii bylo barvení Coomassie využito pro kontrolu účinnosti solubilizace mitochondrií různými koncentracemi digitoninu a LM (výsledky, část 5.1). Ihned po elektroforéze byl gel 40 minut barven v barvicím roztoku (0,06 M Coomassie blue R-250 barva, 45% methanol, 9% kyselina octová) a po uplynutí této doby byl odbarven ve fixovacím roztoku (25% methanol, 8% kyselina octová), který byl několikrát vyměněn pro rychlejší odbarvení gelu.

**Přípravy a složení použitých roztoků pro jednotlivé metody jsou uvedeny v protokolech v příloze k této diplomové práci.**

## 5. Výsledky

### 5.1 Solubilizace respiračních komplexů lauroyl maltosidem a digitoninem

Účelem těchto pokusů bylo zjistit optimální koncentraci digitoninu pro solubilizaci proteinů ze vzorku svalových mitochondrií (Obr. 17). Po separaci proteinů pomocí BN-PAGE a po obarvení gelu Coomassie blue R-250 bylo patrné, že při použití LM o koncentraci 1 a 4 mg/mg proteinu byly přítomné respirační komplexy do molekulové hmotnosti (Mh.) cca 670 kDa, odpovídající jejich monomerním, popřípadě dimerním formám. Při použití digitoninu byly přítomné i větší formy odpovídající superkomplexům. Solubilizace komplexů digitoninem o koncentraci 8 mg digitoninu/mg proteinu vedla k lepší separaci a zaostření detekovaných proteinových proužků v gelu. Obdobný profil byl získán u svalů z kontrolních myši (+/+) i u svalů z COX-defektních myši (-/-).



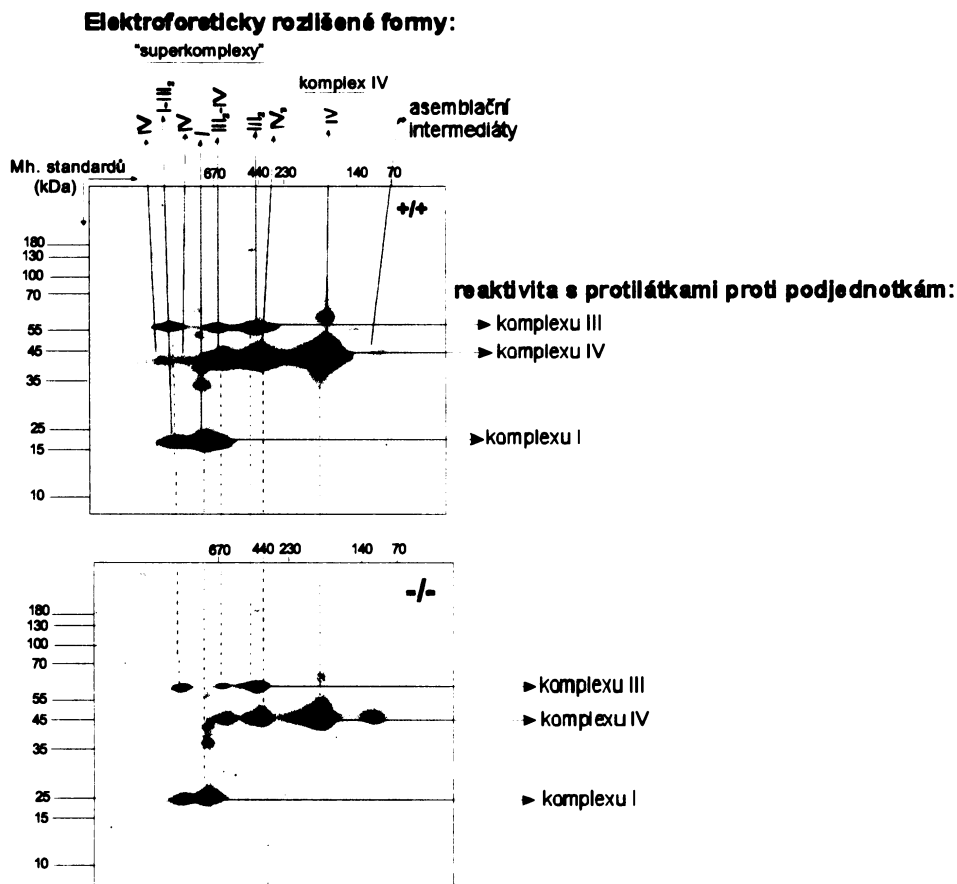
**Obr. 17 Nativní elektroforéza mitochondrií z myší svalové tkáně**

Byly analyzovány vzorky svalových mitochondrií z kontrolních (+/+) a COX-defektních (-/-) myši (~ 25 $\mu$ g proteinu), solubilizované různým množstvím digitoninu (4, 8 mg dig/mg proteinu) a pro srovnání i vzorek mitochondrií solubilizované lauroyl maltosidem (o koncentraci 1, 4 mg LM/mg proteinu). Separované proteinové komplexy odpovídají podle Mh. superkomplexům (I-III<sub>2</sub>-IV<sub>x</sub>, I-III<sub>2</sub>, III<sub>2</sub>-IV), komplex I (I), komplex V (V), komplex III (III<sub>2</sub>) a komplex IV (IV). Velikosti použitých standardů jsou uvedeny v kDa na levé straně obrázku.

## 5.2 Analýza složení superkomplexů v myších tkáních pomocí 2D BN-PAGE/SDS-PAGE elektroforézy

Pro studii byly použity mitochondrie z různých tkání COX-defektních myší (-/-) a kontrolních myší (+/+). Jednalo se o srdce, stehenní sval, játra, mozek a kultivované fibroblasty. Proteinové komplexy z mitochondrií solubilizovaných digitoninem byly po separaci v prvním rozměru nativní elektroforézou analyzovány ve druhém rozměru SDS elektroforézou, kdy došlo k jejich rozpadu na jednotlivé podjednotky. Separované proteiny byly následně přeneseny z gelu na PVDF membránu elektroblotem a detekovány koktejlem monoklonálních protilátek, který obsahoval protilátku proti NDUF6 podjednotce komplexu I, Core 1 podjednotce komplexu III a COX I podjednotce komplexu IV. Z výsledků byla patrná podobnost tří skupin tkání (i) srdce a sval, (ii) játra a mozek a (iii) fibroblasty, které se liší intenzitou mitochondriálního metabolismu, mitochondriálním obsahem, množstvím respiračních komplexů a jejich enzymovou aktivitou [77].

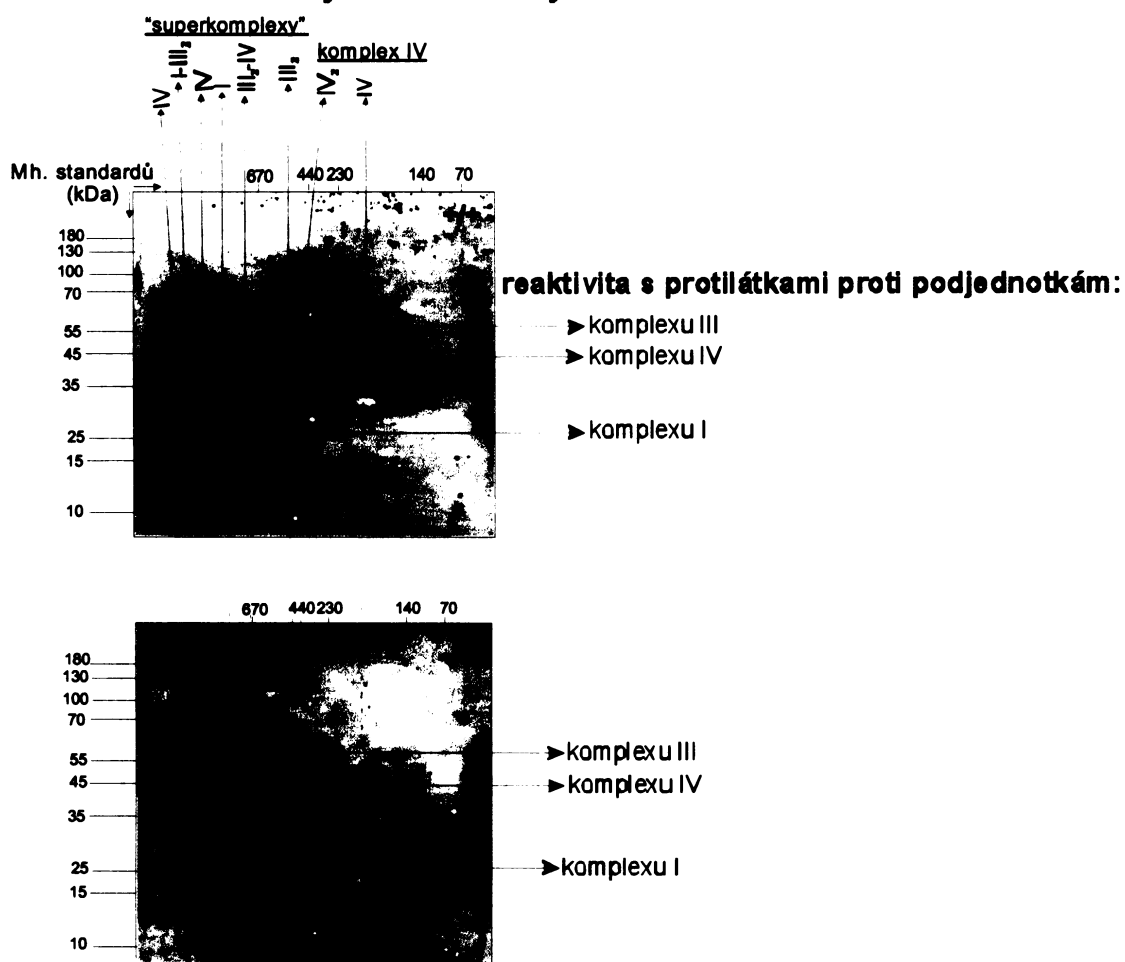
V srdečních (obr.18) a svalových mitochondriích byly detekovány superkomplexy I-III<sub>2</sub> a III<sub>2</sub>-IV, chyběl však superkomplex I-III<sub>2</sub>-IV. Množství monomeru COX bylo u COX-defektních myší sníženo, ale superkomplex I-III<sub>2</sub> a částečně i superkomplex III<sub>2</sub>-IV zůstaly zachovány. V obou případech byly také detekovány asemblační intermediáty COX, a to v nepatrném množství u kontroly a ve větší míře u COX-defektních myší. U jaterních (obr.19) a mozkových mitochondriích byly výsledky podobné, COX se taktéž nacházela ve formě monomeru, dimeru a v superkomplexu III<sub>2</sub>-IV, opět zde byl přítomný superkomplex I-III<sub>2</sub> a žádný I-III<sub>2</sub>-IV superkomplex. Nebyly zde však pozorovány žádné asemblační intermediáty COX a celkové množství komplexů se zdálo být menší, hlavně oproti srdečním mitochondriím. Mitochondrie z fibroblastů (obr. 20) se od ostatních odlišovaly nejvíce. U kontroly i COX-defektních myší byly detekovány superkomplexy I-III<sub>2</sub> a I-III<sub>2</sub>-IV a v případě kontroly ještě superkomplex III<sub>2</sub>-IV. Mitochondrie z fibroblastů od COX-defektních myší vykazovaly největší defekt COX, akumulaci asemblačních intermediátů COX, absenci dimeru COX a III<sub>2</sub>-IV superkomplexu.



### Obr. 18 2D elektroforéza BN-PAGE/SDS-PAGE myších srdečních mitochondrií

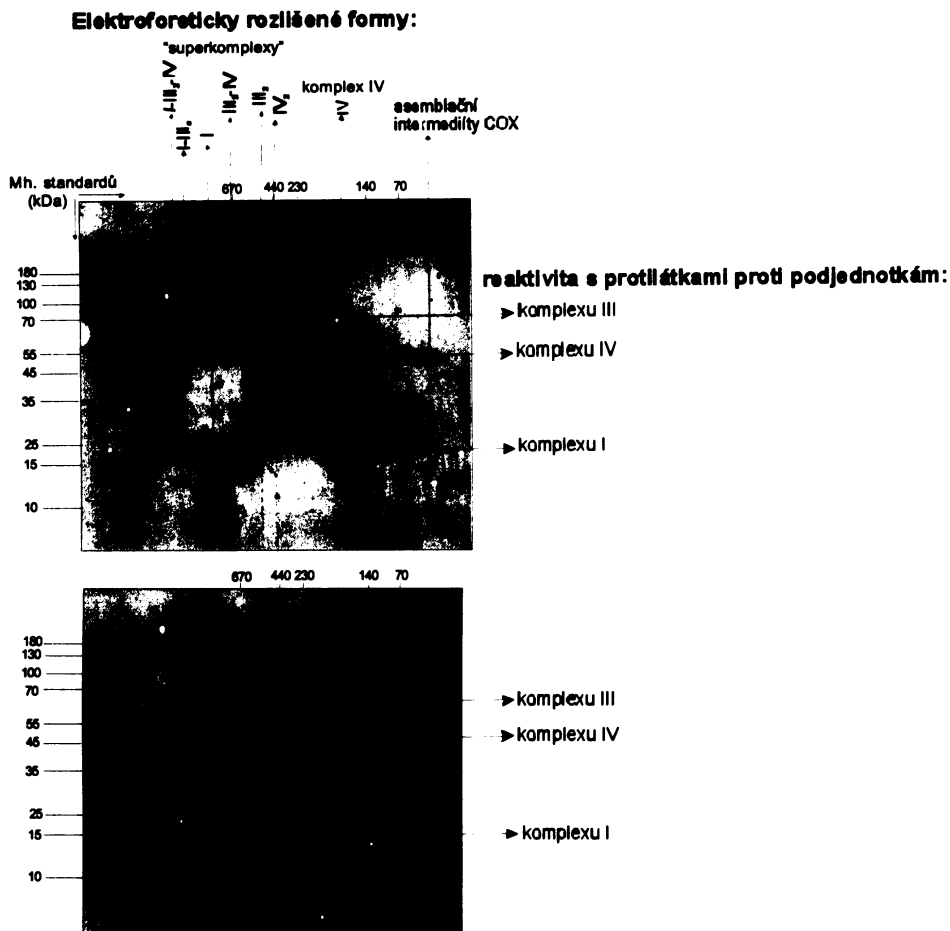
Byly analyzovány digitoninem (8 mg dig/mg proteinu) solubilizované vzorky srdečních mitochondrií kontroly (+/+) a COX-defektních myší (-/-). Po detekci na PVDF membráně směsí protilátek proti komplexu I, III a IV byly identifikovány superkomplexy I-III<sub>2</sub> a III<sub>2</sub>-IV, komplex IV ve vyšších proteinových komplexech, komplex I (I), dimer komplexu III (III<sub>2</sub>), dimer komplexu IV (IV<sub>2</sub>), komplex IV (IV), a asembliční intermediáty. Velikosti použitých standardů o molekulové hmotnosti (Mh.) v kDa jsou v prvním i ve druhém rozměru uvedeny v kDa po stranách obrázku.

### Elektroforeticky rozlišené formy:



**Obr. 19 2D elektroforéza BN-PAGE/SDS-PAGE myších jaterních mitochondrií**

Digitoninem (8 mg dig/mg proteinu) solubilizované vzorky kontroly (+/+) a COX-defektních myší (-/-) byly analyzovány jako srdeční mitochondrie (obr. 18). Identifikovány byly superkomplexy I-III<sub>2</sub> a III<sub>2</sub>-IV, komplex IV ve vyšších proteinových komplexech, komplex I (I), dimer komplexu III (III<sub>2</sub>), dimer komplexu IV (IV<sub>2</sub>), komplex IV (IV). Asemblační intermediáty COX detekovány nebyly.



**Obr. 20 2D elektroforéza BN-PAGE/SDS-PAGE mitochondrií z myších fibroblastů**

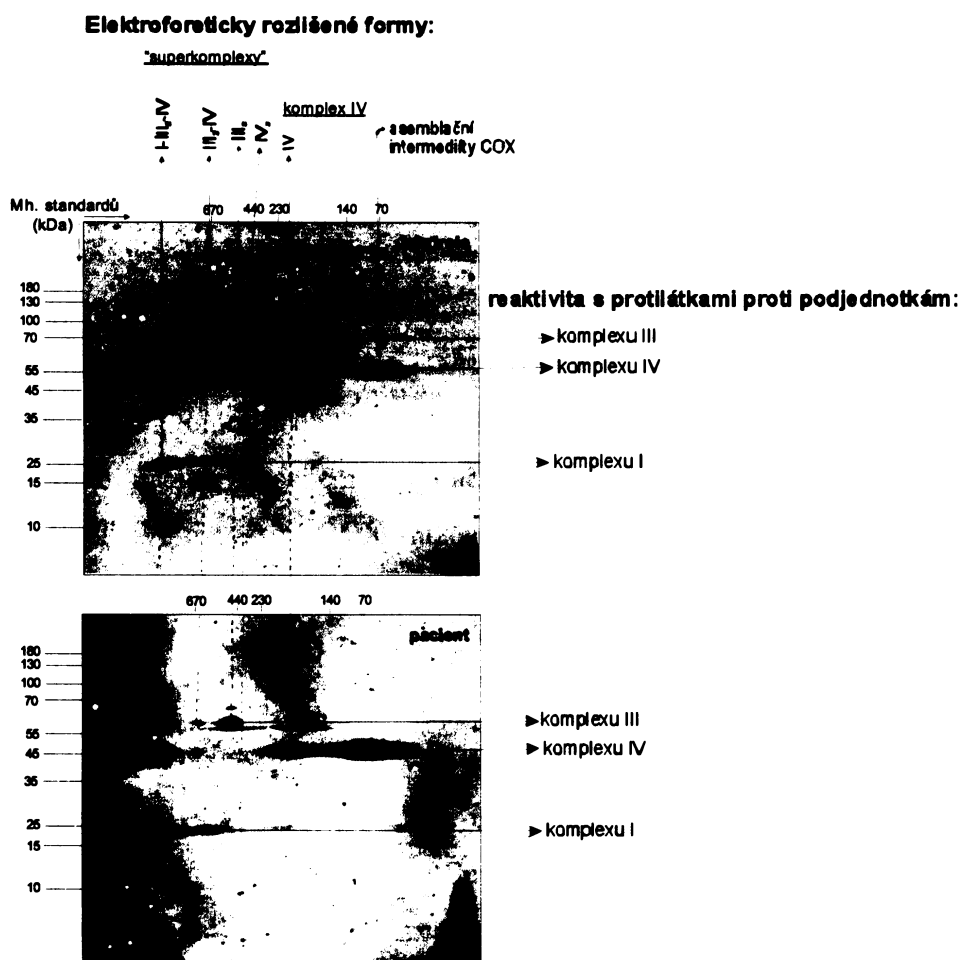
Digitoninem (8 mg dig/mg proteinu) solubilizované vzorky fibroblastů z kontroly (+/+) a COX-defektních myší (-/-) byly analyzovány stejně, jako srdeční mitochondrie (obr. 18). Byly identifikovány superkomplexy I-III<sub>2</sub>-IV, I-III<sub>2</sub> a III<sub>2</sub>-IV, komplex I (I), dimer komplexu III (III<sub>2</sub>), dimer komplexu IV (IV<sub>2</sub>), komplex IV (IV) a asembliční intermediáty COX.

### 5.3 Analýza složení superkomplexů v lidských fibroblastech pomocí 2D BN-PAGE/SDS-PAGE elektroforézy

Pro analýzu byly použity fibroblasty pacienta s mutací *SURF1* genu způsobující deficit COX s klinickými projevy Leigh syndromu a kontrolní fibroblasty. Experimentální postup a detekce proteinů na PVDF membráně byly provedeny stejným způsobem, jako u myších tkání. Výsledky analýzy mitochondrií z lidských fibroblastů (obr.21) byly v mnoha



znacích velmi podobné myším fibroblastům. Detekovány zde byly, v případě kontroly i pacienta, superkomplexy I-III<sub>2</sub>-IV a III<sub>2</sub>-IV, množství COX v mitochondriích pacienta bylo výrazně sníženo oproti kontrole, naopak množství assemblyních intermediátů COX bylo vysoké, chyběl dimer COX a superkomplex III<sub>2</sub>-IV vykazoval také velmi nízký signál. Veškerý komplex I byl přítomen v superkomplexu I-III<sub>2</sub>-IV. Superkomplex I-III<sub>2</sub> nebyl detekován pravděpodobně proto, že tvoří „jádro“ většího a stabilnějšího I-III<sub>2</sub>-IV superkomplexu.



**Obr. 21 2D elektroforéza BN-PAGE/SDS-PAGE mitochondrií z lidských fibroblastů**

Digitoninem (8 mg dig/mg proteinu) solubilizované vzorky od kontroly a od pacienta byly analyzovány jako mitochondrie z myších tkání (obr. 18-20). Identifikovány byly superkomplexy I-III<sub>2</sub>-IV a III<sub>2</sub>-IV, dimer komplexu III (III<sub>2</sub>), dimer komplexu IV (IV<sub>2</sub>), komplex IV (IV) a assemblyní intermediáty COX.

## 5.4 Kvantitativní analýza jednotlivých forem komplexů dýchacího řetězce

Přítomnost různých forem komplexů dýchacího řetězce ve vnitřní mitochondriální membráně (monomery, homooligomery a heterooligomery) může ovlivňovat jejich katalytickou aktivitu, stabilitu, průběh biochemických reakcí a tvorbu ATP podle potřeb dané buňky nebo tkáně. Množství respiračních komplexů a jejich forem jsou odlišné v různých tkáních. Naším cílem bylo zjistit, v jakých formách se jednotlivé komplexy v mitochondriích z různých tkání nacházejí, a které z nich a v jakém množství se spojují do superkomplexů. Zabývali jsme se rozdíly ve složení a výskytu superkomplexů v mitochondriích z různých tkání kontrolních myší a COX-defektních myší a dále v mitochondriích z lidských fibroblastů od pacienta s mutací *SURF1* genu a od kontroly.

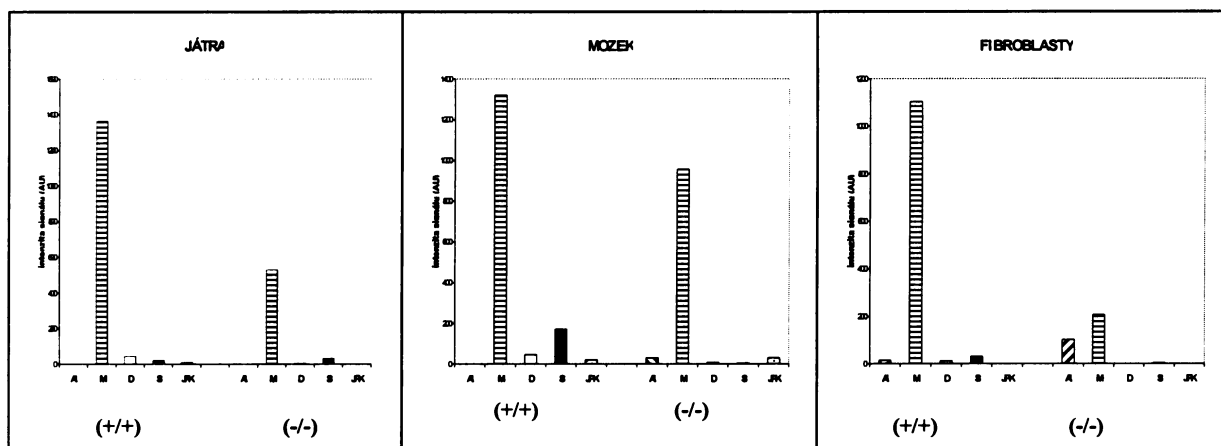
### 5.4.1 Formy komplexu IV v myších tkáních a lidských fibroblastech

Ve všech studovaných myších tkáních, jak z kontrolních (+/+), tak z COX-defektních myší (-/-), se COX nacházela hlavně ve formě monomeru. Tkáně lze rozdělit podle distribuce jednotlivých forem COX do dvou skupin.

V kontrolních fibroblastech, mozkové a jaterní tkáni se COX vyskytovala asi v 90 % jako monomer (obr. 22). Přítomnost dimerů nebo superkomplexů byla minimální, což by mohlo souviset s celkově nižším obsahem respiračních komplexů v mitochondriích. Ve všech případech bylo celkové množství COX sníženo u COX-defektních myší. Největší změny ve výskytu forem COX vykazovaly (-/-) fibroblasty, kde se masivně hromadily asemblační intermediáty COX (33 % oproti 1,3 % u (+/+)).

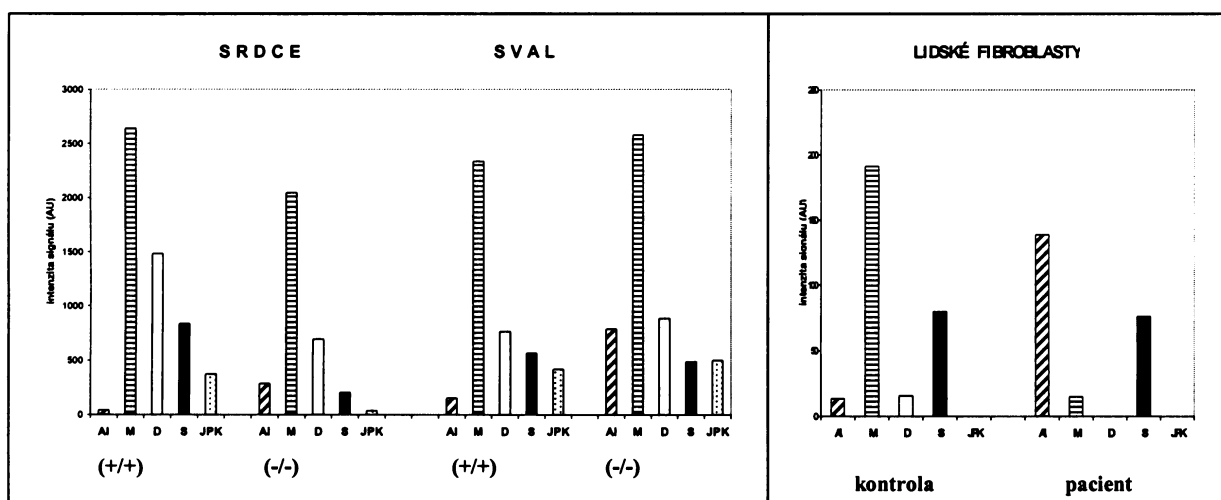
V mitochondriích srdeční tkáně představovalo zhruba 49 % signálu pro (+/+) a 62 % signálu pro (-/-) COX ve formě monomeru a ve svalové tkáni asi 55 % pro (+/+) a 49 % pro (-/-) (obr. 23). V obou tkáních převažovala tvorba dimeru COX nad vazbou COX do superkomplexů. U COX-defektních myší v důsledku absence *Surf1p* docházelo k hromadění většího množství asemblačních intermediátů COX (9 % z celkového signálu oproti 0,8 % u kontrol). Jejich přítomnost i u kontroly naznačuje, že asemblační intermediáty COX nebo volné COX podjednotky jsou přítomny v určitém nadbytku. Celkové množství COX u (-/-) bylo sníženo v srdci, ale ne ve svalu.

V mitochondriích z kontrolních lidských fibroblastů (obr. 24) se COX vyskytovala ze 64 % ve formě monomeru a ze 27 % v superkomplexech. Deficit COX se u pacienta projevil velmi nízkou hladinou COX holoenzymu (6,4 %), téměř stejným množstvím COX superkomplexů, jako u zdravého jedince, a vysokým množstvím asemblačních intermediátů (60 %).



**Obr. 22 Distribuce COX v jaterních, mozkových a fibroblastových myších mitochondriích**

Formy COX u kontroly (+/+): monomer (M) >>> superkomplexy (S) > dimer (D), COX v jiných proteinových komplexech (JPK) se vyskytoval v mozkových a jaterních mitochondriích. Formy COX u COX-defektních myší (-/-): M >>> S, dimer COX se vyskytoval minimálně (mozek, játra) nebo vůbec (fibroblasty), vyšší procento asemblačních intermediátů (AI) se vyskytovalo u mitochondrií z mozku a fibroblastů. Relativní distribuce kalkulovaná ze signálu pro COX I podjednotku komplexu IV.



**Obr. 23 Distribuce COX v srdeční a ve svalové tkáni myši.**

Formy COX u kontroly (+/+): M > D > S > JPK > AI. Formy COX u COX-defektních myší (-/-): M > D > AI > S > JPK. Distribuce kalkulovaná ze signálu pro COX I.

**Obr. 24 Distribuce COX v mitochondriích z lidských fibroblastů.**

Formy COX u kontroly: M > S > D > AI. Formy COX u pacienta: AI > S >> M, COX dimer úplně chybí. Distribuce kalkulovaná ze signálu pro COX I.

#### 5.4.1.1 COX superkomplexy v myších tkáních a lidských fibroblastech

Kvantitativní analýza ukázala rozdíly nejen v celkovém množství superkomplexů, ale i v množství jednotlivých forem superkomplexů. Analyzované myší tkáně lze podle výskytu COX v superkomplexech seřadit následovně:

srdce > sval > mozek > fibroblasty > játra

Ve všech tkáních byl detekován superkomplex III<sub>2</sub>-IV, ve fibroblastech pak malé množství superkomplexu I-III<sub>2</sub>-IV. Z hlediska funkce superkomplexů se předpokládá, že čím více se váže COX do superkomplexů, tím je účinnější (rychlejší) elektronový transport a s tím spojený vznik elektrochemického gradientu využívaného k syntéze ATP. Toto je důležité hlavně pro tkáně s vysokou energetickou spotřebou, jako srdce a sval, kde je hlavním zdrojem ATP tvořené oxidační fosforylací. V mitochondriích z tkání COX-defektních myší bylo ve všech případech přítomno alespoň minimální množství COX v superkomplexech.

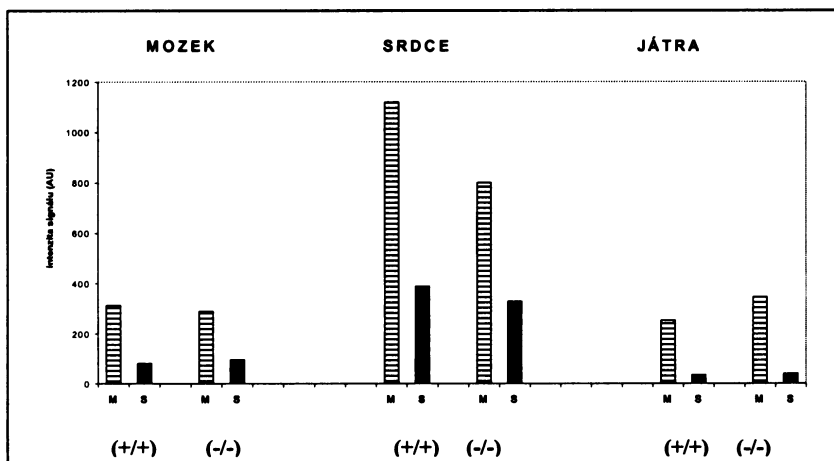
V mitochondriích z lidských fibroblastů se COX vyskytovala u kontroly ve velkém množství v superkomplexech I-III<sub>2</sub>-IV a III<sub>2</sub>-IV. V mitochondriích pacienta se COX vázala přednostně do superkomplexu I-III<sub>2</sub>-IV místo tvorby dimeru, který nebyl vůbec detekován. Zachováním co největšího množství superkomplexů v mitochondriích s defektem COX tak může, v daném případě, umožnit co největší efektivitu respirace. Je tedy možné, že při nedostatku COX stoupá afinita vazebného místa COX pro I-III<sub>2</sub>.

#### 5.4.2 Formy komplexu I v myších tkáních a lidských fibroblastech

Komplex I se v mitochondriích z myších tkání vyskytoval jako monomer a v superkomplexu I-III<sub>2</sub>. U mitochondrií z mozku, srdce a jater (obr. 25), jak z kontroly, tak z COX-defektních myší, převažoval ve formě monomeru a do superkomplexu s komplexem III se nejméně vázal v játrech. Naopak tomu bylo v případě mitochondrií ze svalu a fibroblastů (obr. 26), kdy se větší množství komplexu I vázalo do I-III<sub>2</sub> superkomplexu. Ve svalových mitochondriích z COX-defektních myší převažoval opět komplex I jako monomer.

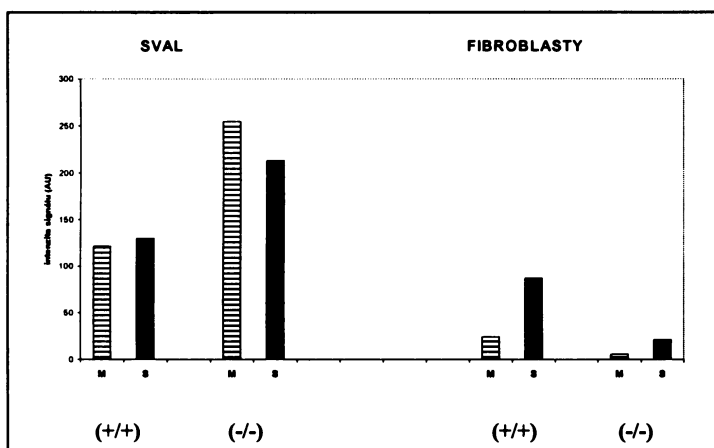
Z výsledků se dá usoudit, že množství monomeru i superkomplexu I-III<sub>2</sub> bylo u kontroly a COX-defektních myší přibližně stejné, takže deficit COX neměl vliv na stabilitu a tvorbu tohoto superkomplexu.

Veškeré množství komplexu I v mitochondriích z lidských fibroblastů bylo přítomno v I-III<sub>2</sub>-IV superkomplexu (obr. 27).



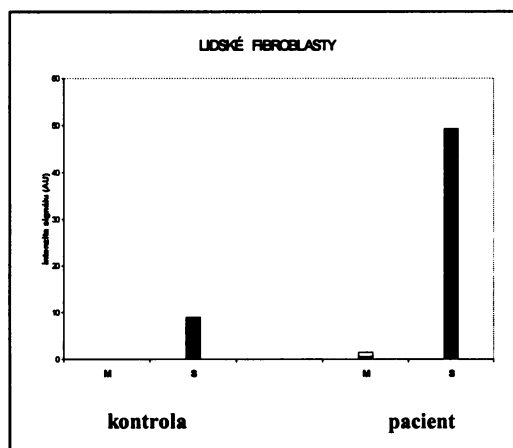
**Obr. 25** Formy komplexu I v myších mozkových, srdečních a jaterních mitochondriích.

Výskyt komplexu I ve formě monomeru (M) a v superkomplexech (S) v mitochondriích z kontroly (+/+) a z COX-defektních myší (-/-). Relativní distribuce kalkulovaná ze signálu pro NDUFB6 podjednotku komplexu I.



**Obr. 26** Formy komplexu I v myších mitochondriích ze svalů a z fibroblastů.

Výskyt komplexu I (M, S) v mitochondriích z kontroly (+/+) a z COX-defektních myší (-/-). Distribuce kalkulovaná ze signálu pro NDUFB6.



**Obr. 27** Formy komplexu I v lidských fibroblastech.

Výskyt komplexu I (M, S) ve fibroblastech od kontroly a od pacienta. Distribuce kalkulovaná ze signálu pro NDUFB6.

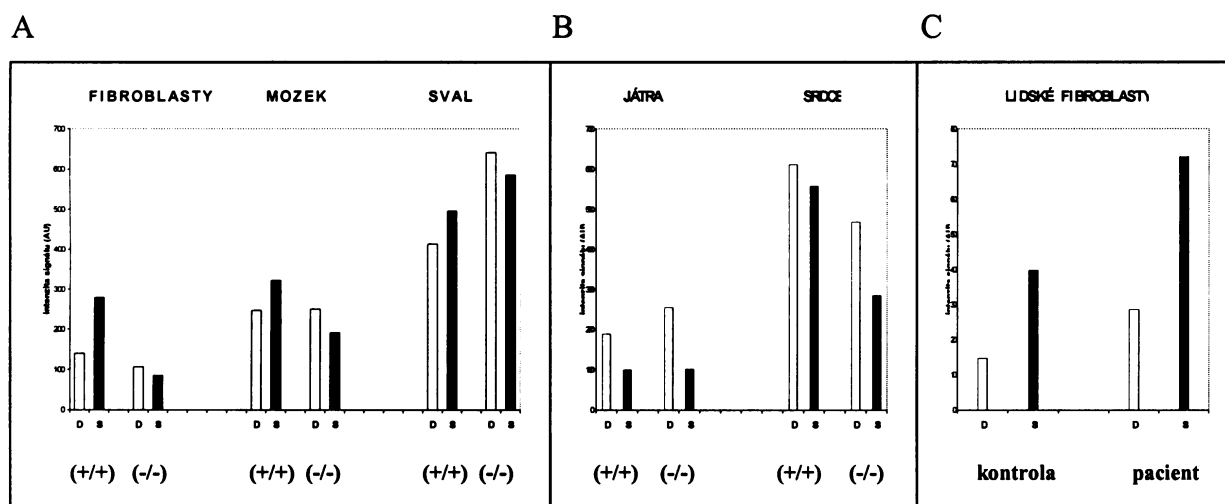
### 5.4.3 Formy komplexu III v myších tkáních a lidských fibroblastech

Podle výskytu forem komplexu III mohly být studované myší tkáně rozděleny opět do dvou skupin. V mitochondriích z fibroblastů, mozku a svalů (obr. 28-A) se komplex III vázal více do superkomplexů, a to superkomplexů I-III<sub>2</sub>, III<sub>2</sub>-IV, a v případě fibroblastů navíc do

superkomplexu I-III<sub>2</sub>-IV. U mitochondrií z COX-defektních myší se však komplex III vyskytoval ve větší míře jako dimer, což může být vysvětleno tím, že v důsledku COX deficitu byla omezena tvorba superkomplexu III<sub>2</sub>-IV a komplex III tvořil superkomplex hlavně s komplexem I a v případě fibroblastů superkomplex I-III<sub>2</sub>-IV.

V srdečních a jaterních mitochondriích (obr. 28-B) se komplex III u kontroly vyskytoval spíše jako dimer. U COX-defektních myší se ve srovnání s kontrolou vyskytoval ve formě dimeru mnohem více, než v superkomplexech, z důvodu deficitu COX.

V mitochondriích z lidských fibroblastů (obr. 28-C) se komplex III vyskytoval téměř ze 73 % v superkomplexech, a to u kontroly v III<sub>2</sub>-IV a I-III<sub>2</sub>-IV a u pacienta v I-III<sub>2</sub>-IV. Ve fibroblastech pacienta chyběl III<sub>2</sub>-IV superkomplex, protože se COX pravděpodobně vážala do většího a stabilnějšího I-III<sub>2</sub>-IV superkomplexu.

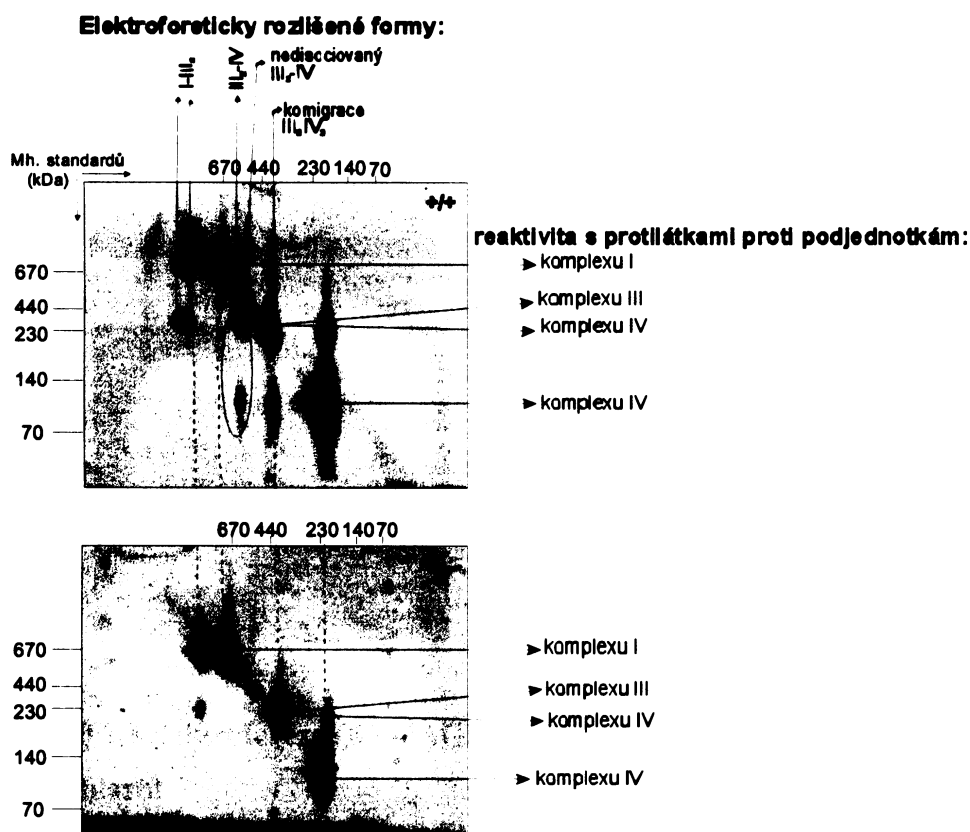


**Obr. 28 A:** Formy komplexu III v myších fibroblastech, mozku a svalu. Výskyt komplexu III ve formě dimeru (D) a v superkomplexech (S) u kontroly (+/+) a COX-defektních myší (-/-), **B:** Formy komplexu III (M, D) v myších jaterních a srdečních mitochondriích, **C:** Formy komplexu III (M, D) v mitochondriích z lidských fibroblastů od kontroly a od pacienta. Relativní distribuce kalkulovaná ze signálu pro Core 1 podjednotku komplexu III.

## 5.5 Identifikace jednotlivých OXPHOS komplexů v superkomplexech pomocí 2D BN-PAGE/BN-PAGE elektroforézy

Pomocí dvourozměrné BN-PAGE/SDS-PAGE elektroforézy byla v superkomplexech analyzovaných myších i lidských mitochondrií odhalena přítomnost podjednotek komplexů I, III a IV. Pro analýzu složení superkomplexů byla dále použita 2D BN-PAGE/BN-PAGE elektroforéza, která byla vyvinuta právě pro tento účel [46]. V přítomnosti LM

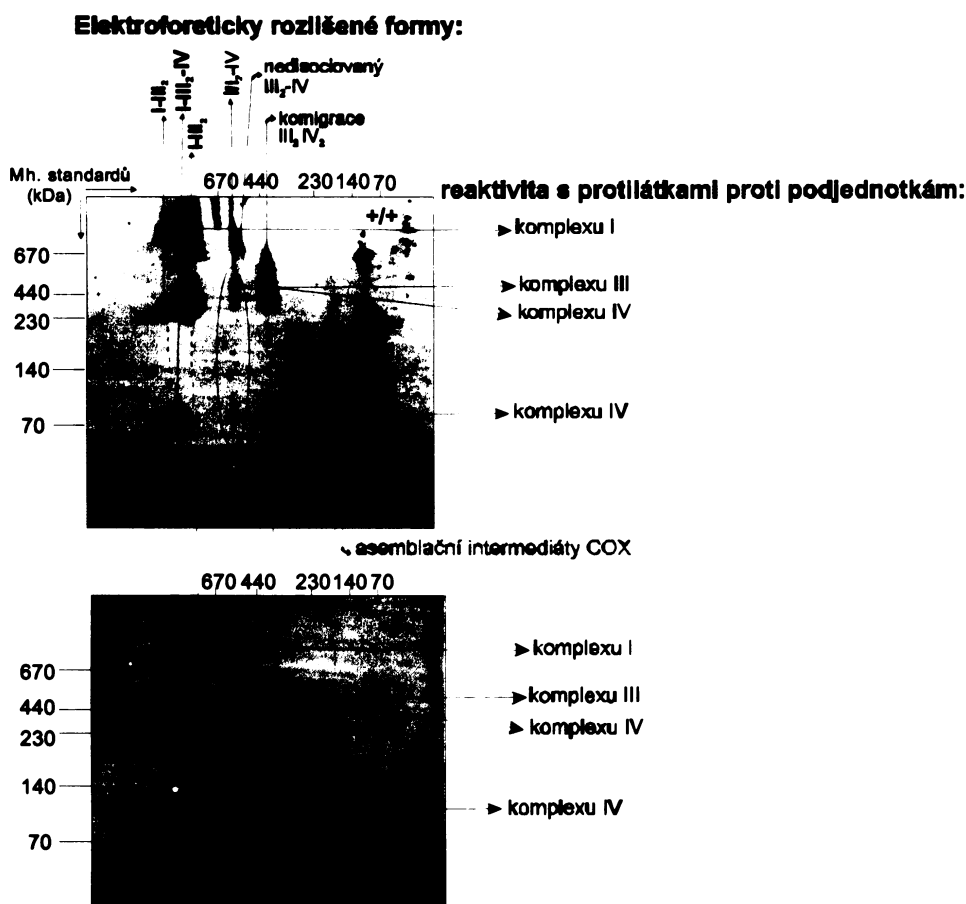
elektroforéza, která byla vyvinuta právě pro tento účel [46]. V přítomnosti LM superkomplexy disociovaly na jednotlivé respirační komplexy, a po jejich separaci ve druhém rozměru byly proteinové komplexy z gelu přeneseny Western blotem na PVDF membránu a detekovány stejným koktejlem protilátek, jako při 2D BN-PAGE/SDS-PAGE. V mitochondriích z myších tkání byla odhalena přítomnost superkomplexu I-III<sub>2</sub> a III<sub>2</sub>-IV a ve fibroblastech navíc superkomplex I-III<sub>2</sub>-IV (obr. 29, 30). V mitochondriích z lidských fibroblastů se nacházely superkomplexy III<sub>2</sub>-IV a I-III<sub>2</sub>-IV (obr. 31). Na základě podobnosti získaných výsledků pro mitochondrie z myšního srdce, svalu, jater a mozku jsou v této práci porovnány výsledky z analýzy srdečních mitochondrií, které vlastně představují i výsledky z ostatních tří zmíněných myších tkání, a mitochondrií z myších fibroblastů, které se od ostatních lišily.



**Obr. 29 2D elektroforéza BN-PAGE/BN-PAGE komplexů myších srdečních mitochondrií**

Byla provedena analýza proteinových komplexů z mitochondrií, z kontrolních (+/+) a z COX-defektních (-/-) myši, solubilizovaných digitoninem (8 mg dig/mg proteinu) v prvním rozměru a ve druhém rozměru v prostředí LM. Komplexy na PVDF membráně byly detekovány pomocí směsi protilátek a fluorescenčního scanneru Odyssey. Detekovány byly superkomplexy I-III<sub>2</sub> a III<sub>2</sub>-IV,

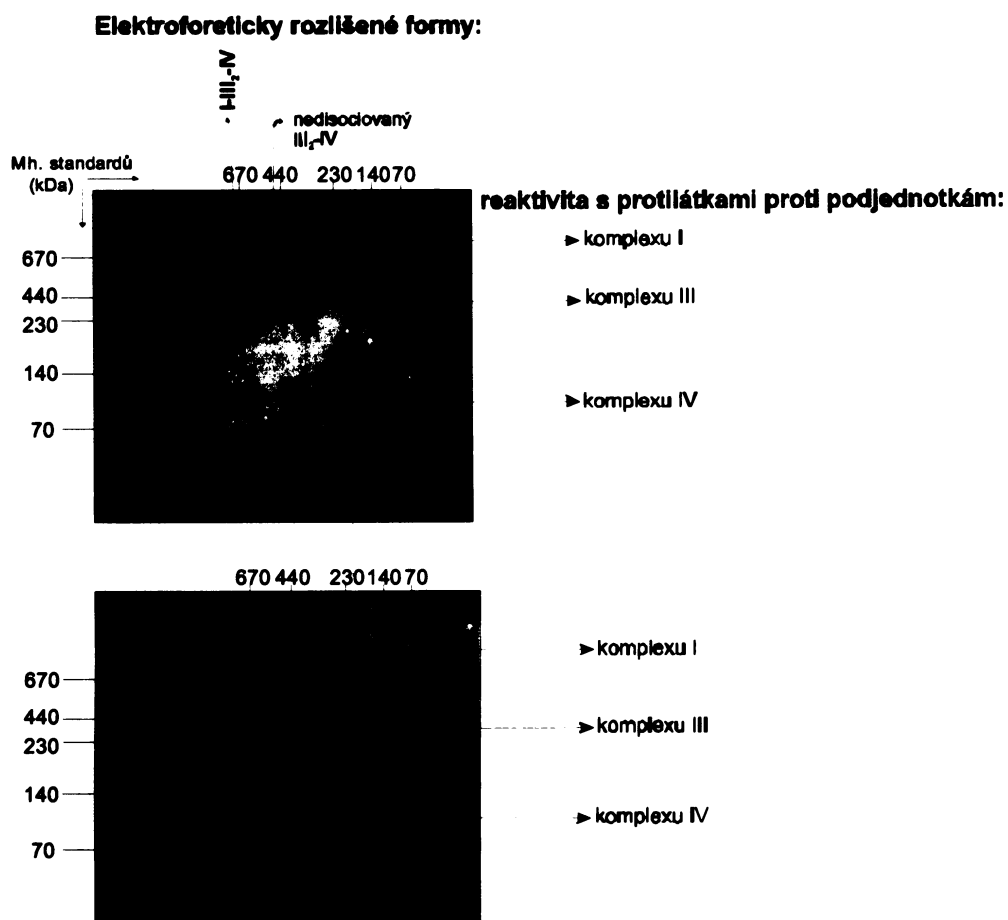
monomer komplexu I, nedisociovaný superkomplex III<sub>2</sub>-IV, komigrace dimerů komplexu III a IV, dimer komplexu III a monomer komplexu IV. U (-/-) byl detekován superkomplex I-III<sub>2</sub>, slabý signál nedisociovaného superkomplexu III<sub>2</sub>-IV a viditelný defekt COX. Podobné výsledky byly získány pro svalové, jaterní a mozkové mitochondrie s menšími rozdíly v intenzitách detekovaných komplexů a superkomplexů. Pozice standardů pro první a druhý rozměr o molekulové hmotnosti (Mh.) v kDa jsou uvedeny po stranách obrázků.



**Obr. 30 2D elektroforéza (BN-PAGE/BN-PAGE) komplexů myších mitochondrií z fibroblastů**

Analýza digitoninem (8 mg dig/mg proteinu) solubilizovaných mitochondrií z fibroblastů kontrolních (+/+) a COX-defektních (-/-) myší byla provedena stejným způsobem, jako pro ostatní tkáň. Detekovány byly superkomplexy I-III<sub>2</sub>-IV, I-III<sub>2</sub> a III<sub>2</sub>-IV, monomer komplexu I, nedisociovaný superkomplex III<sub>2</sub>-IV, komigrace dimerů komplexu III a IV, dimer komplexu III, monomer komplexu IV a asemblační intermediáty COX. U (-/-) byl detekován superkomplex I-III<sub>2</sub>-IV, I-III<sub>2</sub> a žádný superkomplex III<sub>2</sub>-IV a akumulace asemblačních intermediátů COX.





**Obr. 31 2D elektroforéza (BN-PAGE/BN-PAGE) komplexů lidských mitochondrií z fibroblastů**

Digitoninem (8 mg dig/mg proteinu) solubilizované mitochondrie z fibroblastů od kontroly a pacienta byly analyzovány a detekovány stejným způsobem, jako mitochondrie z myších tkání. Identifikovány byly superkomplexy I-III<sub>2</sub>-IV a nedisociovaný III<sub>2</sub>-IV, dimer komplexu III a monomer komplexu IV. Veškeré množství komplexu I bylo přítomno v I-III<sub>2</sub>-IV superkomplexu. U pacienta byl detekován superkomplex I-III<sub>2</sub>-IV, superkomplex I-III<sub>2</sub> a monomer COX chyběly.

## 6. Diskuze

Proteinové komplexy mitochondriálního dýchacího řetězce tvoří supramolekulární útvary, neboli superkomplexy, které jsou složeny z komplexu I (NADH-CoQ oxidoreduktasy), komplexu III (cytochrom *bc<sub>1</sub>* komplexu) a komplexu IV (cytochrom *c* oxidasy). Pomocí elektroforetických metod jsme charakterizovali složení savčích superkomplexů v mitochondriích z myších tkání a v mitochondriích z lidských fibroblastů a porovnali jsme výskyt jednotlivých typů superkomplexů z tkáňově-specifického hlediska. Analyzovali jsme také, jakou roli má cytochrom *c* oxidasa při asemblaci superkomplexů a jak ovlivňuje snížené množství COX u COX-defektních myší a u pacientů s mutací *SURF1* genu asemblaci a složení superkomplexů.

Mitochondrie byly solubilizovány nízkou koncentrací jemného detergentu digitoninu (8 mg dig/mg proteinu), v jehož přítomnosti se zachovaly jemné protein-protein interakce. Použitím silnějšího detergentu lauroyl maltosidu docházelo k narušení interakcí mezi komplexy a k rozpadu superkomplexů. Digitoninem solubilizované membránové komplexy a superkomplexy jsme separovali pomocí modré nativní elektroforézy (BN-PAGE). Složení jednotlivých superkomplexů jsme následně určili pomocí dvourozměrných elektroforéz, a to 2D BN-PAGE/SDS-PAGE a 2D BN-PAGE/BN-PAGE.

Použitím 2D BN-PAGE/BN-PAGE jsme zjistili přítomnost superkomplexů I-III<sub>2</sub> a III<sub>2</sub>-IV v mitochondriích z myšího srdce, mozku, svalů a jater a ve fibroblastech navíc I-III<sub>2</sub>-IV superkomplex, který je ve většině studií zmiňován jako hlavní superkomplex v savčích mitochondriích z hovězího srdce [41]. V mitochondriích z lidských fibroblastů jsme našli III<sub>2</sub>-IV a I-III<sub>2</sub>-IV superkomplexy. Ve srovnání s myšími fibroblasty, kde se I-III<sub>2</sub> superkomplex ukázal v majoritním množství, se veškeré množství I-III<sub>2</sub> vyskytovalo v I-III<sub>2</sub>-IV superkomplexu, což znamená, že I-III<sub>2</sub> superkomplex je stavebním základem pro větší a stabilnější I-III<sub>2</sub>-IV<sub>1</sub> superkomplex [41]. Ve všech tkáních z COX-defektních myší a ve fibroblastech od pacienta jsme našli snížené množství COX i COX superkomplexů s různou intenzitou. Detekované signály však byly mnohdy velmi slabé, některé superkomplexy nebyly lauroyl maltosidem úplně solubilizované, takže se tato metoda jevila jako méně citlivá. 2D BN-PAGE/BN-PAGE byla poprvé představena v práci od Schaggera a Pfeifferové v roce 2000 [46]. Analýzou digitoninem solubilizovaných mitochondrií z hovězího srdce a solubilizací superkomplexů LM, přítomným v katodovém pufru ve druhém rozměru, byly touto metodou identifikovány superkomplexy I-III<sub>2</sub> a I-III<sub>2</sub>-IV<sub>1-3</sub>. Použitím silnějšího detergentu Tritonu X-100 místo LM byla navíc detekována asociace komplexů

I-IV, která byla potvrzena analýzou superkomplexu I-III<sub>2</sub>-IV<sub>1</sub> z hovězího srdce v práci od Schaferové a kol. [41]. Při našich experimentech jsme LM nepřidávali do katodového pufru, ale nechávali jsme před druhým rozměrem proužek gelu se separovanými komplexy a superkomplexy inkubovat v roztoku LM, protože se ukázalo, že tak dochází k lepší disociaci superkomplexů. Nicméně I-III<sub>2</sub>-IV<sub>1</sub> superkomplex jsme detekovali v menším množství jen ve fibroblastech, což může poukazovat na nestabilitu tohoto superkomplexu, nebo je jeho asemblace dočasná a jeho ustálený stav se nachází pod detekčním limitem naší metody. Důvodem rozdílů v našich výsledcích mohou být také odlišné podmínky při izolaci mitochondrií. V průběhu izolačního postupu může docházet k narušení fyziologického stavu mitochondrií, takže různé interakce mezi jednotlivými komplexy, které jsme schopni detekovat, zdaleka nemusí odpovídat skutečnosti.

Pomocí 2D BN-PAGE/SDS-PAGE jsme získali detailnější informace o složení superkomplexů a o formách COX. Detekované fluorescenční signály podjednotek jednotlivých komplexů jsme dále použili pro kvantitativní analýzu jednotlivých forem komplexů dýchacího řetězce. Kromě již výše zmíněného superkomplexu III<sub>2</sub>-IV (a I-III<sub>2</sub>-IV ve fibroblastech) se COX v kontrolních myších tkáních ještě vyskytovala ve formě dimeru, v asociaci s jinými proteiny a v mitochondriích ze srdce, svalu a fibroblastů byly detekovány asemblační intermediáty COX. Ve všech myších tkáních i v lidských fibroblastech se však COX vyskytovala převážně jako monomer a množství COX superkomplexů záviselo pravděpodobně na energetické potřebě tkáně. Komplex I se v myších tkáních vyskytoval převážně jako monomer, výjimkou byly fibroblasty, kde se komplex I vázal více do superkomplexů. V lidských fibroblastech byl komplex I přítomen jen v superkomplexech, což potvrzuje jeho stabilizaci vazbou s komplexem III [44]. Komplex III se vyskytoval v myších játrech a srdci spíše ve formě dimeru a v mozku, svalu a fibroblastech, jak myších, tak lidských, naopak více v superkomplexech.

Odlišné formy COX jsme pozorovali ve tkáních z COX-defektních myší a ve fibroblastech od pacienta s mutací *SURF1* genu. *SURF1* gen kóduje Surf1 protein, který se podílí na asemblaci cytochrom *c* oxidasy ve fázi S2 intermediátu, složeného z COX I, COX IV a COX Va podjednotek [52]. Pokud dojde k defektu *SURF1* genu, asemblace COX je neúplná, což způsobí její sníženou aktivitu a nedostatečnou funkci projevující se u lidí jako Leighův syndrom. Mutace přímo vedou ke tkáňově specifickému poklesu hladiny COX holoenzymu a redukcii aktivity COX, doprovázené poklesem hladiny COX podjednotek a akumulací specifických COX subkomplexů. COX subkomplexy (asemblační intermediáty) byly detekovány ve svalu, v srdci a v největší míře ve fibroblastech pacientů, zatímco v játrech a

mozkové tkáni přítomny nebyly [78]. Tyto změny jsme pozorovali i v našich experimentech, takže z výsledků naší práce lze usoudit, že deficit COX se projevuje v lidských i myších tkáních podobně. Ve tkáních z COX-defektních myší bylo nalezeno snížené množství COX holoenzymu, nejvýrazněji v mitochondriích z fibroblastů, a ve většině tkání, kromě jaterní, jsme pozorovali akumulaci asemblačních intermediátů COX, s největší intenzitou ve fibroblastech. Snížené množství nebo úplná absence superkomplexu III<sub>2</sub>-IV (v případě fibroblastů snížené množství superkomplexu I-III<sub>2</sub>-IV) potvrdilo, že deficit COX ovlivnil výskyt COX superkomplexů. Na asemblaci I-III<sub>2</sub> superkomplexu však vliv neměl, jelikož množství I-III<sub>2</sub> v mitochondriích z kontrolních tkání i z tkání COX-defektních myší bylo přibližně stejné. Ve fibroblastech od pacienta se *SURF1* mutací se COX vázala převážně do superkomplexu I-III<sub>2</sub>-IV, množství monomeru bylo minimální a bylo zde nalezeno velké množství asemblačních intermediátů COX. Fibroblasty, jak z COX-defektních myší, tak od pacienta, se ukázaly být nejcitlivější na deficit COX díky největšímu poklesu hladiny COX holoenzymu a hromadění asemblačních intermediátů. Jak ale ukazují naše výsledky, asemblační intermediáty COX jsou přítomny i ve většině zdravých tkáních. Představují fáze asemblace COX, které probíhají pomaleji z důvodu inkorporace větších a složitějších částí (hemy, Cu<sub>A</sub>, Cu<sub>B</sub>).

Tvorba superkomplexů velmi závisí na množství jednotlivých komplexů v mitochondriích a také na energetické potřebě dané tkáně [77]. Jak potvrzují naše výsledky, mitochondrie srdeční a svalové tkáně se vyznačují největším obsahem respiračních komplexů a právě zde se superkomplexy tvořily nejvíce. Mitochondrie z jaterní, mozkové tkáně a z fibroblastů obsahovaly naopak méně respiračních komplexů a ty se do superkomplexů spojovaly málo. Množství superkomplexů a jejich složení je tedy tkáňově specifické a v každé tkáni existuje jiná rovnováha mezi monomerními a oligomerními formami respiračních komplexů. Každý komplex je nejprve složen z podjednotek do své monomerní formy, ve které může setrvat, nebo může dále vstupovat do složitějších funkčních celků. Asociace respiračních komplexů do superkomplexů může být považována za dynamický proces, kdy pro každou tkáň je výhodnější jiný stav.

## 7. Závěr

Na základě výsledků naší práce jsme zjistili, že v mitochondriích z myší srdeční, jaterní, mozkové a svalové tkáně jsou přítomny v různém množství superkomplexy I-III<sub>2</sub> a III<sub>2</sub>-IV. V myších kultivovaných fibroblastech byly nalezeny superkomplexy I-III<sub>2</sub>, III<sub>2</sub>-IV a navíc I-III<sub>2</sub>-IV superkomplex, který se v ostatních myších tkáních nevyskytoval. To může být vysvětleno tím, že jeho formování je významné pro momentální potřeby dané tkáně, nebo je tento superkomplex v ostatních tkáních nestabilní. Naše studie jasně prokázala tkáňovou specifickou assemblaci a složení superkomplexů.

Jednotlivé formy COX a jejich distribuce byly dále ovlivněny selektivním defektem biogeneze tohoto enzymu. U COX-defektních myší jsme ve všech tkáních pozorovali snížené množství COX holoenzymu, což mělo současně vliv na množství III<sub>2</sub>-IV superkomplexu a I-III<sub>2</sub>-IV superkomplexu v případě fibroblastů. Deficit COX však neovlivnil složení a množství I-III<sub>2</sub> superkomplexu, které bylo ve tkáních z kontrolních a z COX-defektních myší srovnatelné.

Analýza mitochondrií z fibroblastů také ukázala mezidruhové rozdíly v množství COX-superkomplexů, které bylo podstatně vyšší v lidských fibroblastech, a to jak u kontroly, tak u COX-defektních fibroblastů. Rozdílné bylo také zastoupení superkomplexů, protože v lidských fibroblastech výrazně převažoval velký I-III<sub>2</sub>-IV superkomplex, zatímco v myších fibroblastech převažoval svým množstvím I-III<sub>2</sub> superkomplex nad COX-superkomplexy.

## 8. Seznam literatury

1. Nicholls, D. G.; Ferguson, S. J.: *Bioenergetics* 3. vydání London, Academic Press 2002.
2. Frey, T. G.; Renken, C. W.; Perkins, G. A.: Insight into mitochondrial structure and function from electron tomography. *Biochim. Biophys. Acta* **1555**:1-3, 196-203. (2002).
3. Gray, M. W.; Burger, G.; Lang, B. F.: Mitochondrial evolution. *Science* **283**:5407, 1476-1481 (1999).
4. Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P.: *Molecular Biology of the Cell*. 4. vydání New York, Garland Science 2002.
5. Mitchell, P.: Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* **191**, 144-148 (1961).
6. Chance, B.; Williams, G. R.: A method for the localization of sites for oxidative phosphorylation. *Nature* **176**:4475, 250-254 (1955).
7. Heaton, G. M.; Nicholis, D. G.: Hamster brown-adipose-tissue mitochondria. The role of fatty acids in the control of the proton conductance of the inner membrane. *Eur. J. Biochem.* **67**:2, 511-517 (1976).
8. Klingenberg, M.; Winkler, E.; Echtay, K.: Uncoupling protein, H<sup>+</sup> transport and regulation. *Biochem. Soc. Trans.* **29**:Pt 6, 806-811. (2001).
9. Houstek, J.; Cannon, B.; Lindberg, O.: Glycerol-3-phosphate shuttle and its function in intermediary metabolism of hamster brown adipose tissue. *Eur. J. Biochem.* **54**, 11-18 (1975).
10. Liang, X.; Le, W.; Zhang, D.; Schulz, H.: Impact of the intramitochondrial enzyme organization on fatty acid oxidation. *Biochem. Soc. Trans.* **29**:Pt 2, 279-282. (2001).
11. Lehninger, A. L.; Nelson, D.; Cox, M. M.: *Lehninger Principles of Biochemistry*. Hard Cover vydání W. H. Freeman & Co. 2000.
12. Voet, D.; Voet, J. G.: *Biochemistry*. 3. vydání New York, John Wiley & Sons, Inc. 2004.
13. Ohnishi, T.: Iron-sulfur clusters/semiquinones in complex I. *Biochim. Biophys. Acta* **1364**:2, 186-206 (1998).
14. de Jong, A. M. P.; Albracht, S. P. J.: Ubisemiquinones as Obligatory Intermediates in the Electron Transfer from NADH to ubiquinone. *Eur. J. Biochem.* **222**, 975-982 (1994).
15. van Belzen, R.; Kotlyar, A. B.; Moon, N.; Dunham, W. R.; Albracht, S. P.: The iron-sulfur clusters 2 and ubisemiquinone radicals of NADH:ubiquinone oxidoreductase are involved in energy coupling in submitochondrial particles. *Biochemistry* **36**:4, 886-893 (1997).
16. Grigorieff, N.: Three-dimensional structure of bovine NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) at 2.2 Å in ice. *J. Mol. Biol.* **277**:5, 1033-1046 (1998).
17. Capaldi, R. A.; Sweetland, J.; Merli, A.: Polypeptides in the Succinate-Coenzyme Q Reductase Segment of the Respiratory Chain. *Biochemistry* **16**, 5707-5710 (1977).
18. Ishii, N.; Fujii, M.; Hartman, P. S.; Tsuda, M.; Yasuda, K.; Senoo-Matsuda, N.; Yanase, S.; Ayusawa, D.; Suzuki, K.: A mutation in succinate dehydrogenase cytochrome b causes oxidative stress and ageing in nematodes. *Nature* **394**:6694, 694-697 (1998).
19. Lemire, B. D.; Oyedotun, K. S.: The *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial succinate:ubiquinone oxidoreductase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1553**:1-2, 102-116 (2002).

20. Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E.: The Protein Data Bank. *Nucl. Acids. Res.* **28**:1, 235-242 (2000).
21. Deng, K.; Shenoy, S. K.; Tso, S.-C.; Yu, L.; Yu, C.-A.: Reconstitution of Mitochondrial Processing Peptidase from the Core Proteins (Subunits I and II) of Bovine Heart Mitochondrial Cytochrome bc<sub>1</sub> Complex. *J. Biol. Chem.* **276**:9, 6499-6505 (2001).
22. Xia, D.; Yu, C. A.; Kim, H.; Xia, J. Z.; Kachurin, A. M.; Zhang, L.; Yu, L.; Deisenhofer, J.: Crystal structure of the cytochrome bc<sub>1</sub> complex from bovine heart mitochondria. *Science* **277**:5322, 60-66 (1997).
23. Abramson, J.; Svensson-Ek, M.; Byrne, B.; Iwata, S.: Structure of cytochrome c oxidase: a comparison of the bacterial and mitochondrial enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* **1544**:1-2, 1-9. (2001).
24. Capaldi, R. A.: Structure and assembly of cytochrome c oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* **280**, 252-262 (1990).
25. Robinson, N. C.: Functional binding of cardiolipin to cytochrome c oxidase. *J Bioenerg. Biomembr.* **25**:2, 153-163. (1993).
26. Kadenbach, B.; Huttemann, M.; Arnold, S.; Lee, I.; Bender, E.: Mitochondrial energy metabolism is regulated via nuclear-coded subunits of cytochrome c oxidase. *Free Radic. Biol. Med.* **29**:3-4, 211-221. (2000).
27. Ludwig, B.; Bender, E.; Arnold, S.; Huttemann, M.; Lee, I.; Kadenbach, B.: Cytochrome C oxidase and the regulation of oxidative phosphorylation. *Chembiochem. Europ. J. Chem. Biol.* **2**:6, 392-403. (2001).
28. Houstek, J.; Pickova, A.; Vojtiskova, A.; Mracek, T.; Pecina, P.; Jesina, P.: Mitochondrial diseases and genetic defects of ATP synthase. *Biochim. Biophys. Acta* **1757**:9-10, 1400-1405 (2006).
29. Abrahams, J. P.; Leslie, A. G.; Lutter, R.; Walker, J. E.: Structure at 2.8 Å resolution of F<sub>1</sub>-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* **370**, 621-628 (1994).
30. Collinson, I. R.; Skehel, J. M.; Fearnley, I. M.; Runswick, M. J.; Walker, J. E.: The F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase complex from bovine heart mitochondria: the molar ratio of the subunits in the stalk region linking the F<sub>1</sub> and F<sub>0</sub> domains. *Biochemistry* **35**:38, 12640-12646 (1996).
31. Collinson, I. R.; van Raaij, M. J.; Runswick, M. J.; Fearnley, I. M.; Skehel, J. M.; Orriss, G. L.; Miroux, B.; Walker, J. E.: ATP synthase from bovine heart mitochondria. In vitro assembly of a stalk complex in the presence of F<sub>1</sub>-ATPase and in its absence. *J. Mol. Biol.* **242**, 408-421 (1994).
32. Stock, D.; Leslie, A. G.; Walker, J. E.: Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science* **286**:5445, 1700-1705 (1999).
33. Collinson, I. R.; Runswick, M. J.; Buchanan, S. K.; Fearnley, I. M.; Skehel, J. M.; van Raaij, M. J.; Griffiths, D. E.; Walker, J. E.: F<sub>o</sub> membrane domain of ATP synthase from bovine heart mitochondria: purification, subunit composition, and reconstitution with F<sub>1</sub>-ATPase. *Biochemistry* **33**, 7971-7978 (1994).
34. Pedersen, P. L.: Transport ATPases: structure, motors, mechanism and medicine: a brief overview. *J. Bioenerg. Biomembr.* **37**:6, 349-357 (2005).
35. Vogel, R. O.; Smeitink, J. A.; Nijtmans, L. G.: Human mitochondrial complex I assembly: a dynamic and versatile process. *Biochim. Biophys. Acta* **1767**:10, 1215-1227 (2007).
36. Cruciat, C. M.; Hell, K.; Folsch, H.; Neupert, W.; Stuart, R. A.: Bcs1p, an AAA-family member, is a chaperone for the assembly of the cytochrome bc<sub>1</sub> complex. *Embo J.* **18**:19, 5226-5233 (1999).

37. Kronekova, Z.; Rodel, G.: Organization of assembly factors Cbp3p and Cbp4p and their effect on bc(1) complex assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **47**:4, 203-212 (2005).
38. Herrmann, J. M.; Funes, S.: Biogenesis of cytochrome oxidase-sophisticated assembly lines in the mitochondrial inner membrane. *Gene* **354**, 43-52 (2005).
39. Stiburek, L.; Hansikova, H.; Tesarova, M.; Cerna, L.; Zeman, J.: Biogenesis of eukaryotic cytochrome c oxidase. *Physiol. Res.* **55 Suppl 2**, S27-41 (2006).
40. Boekema, E. J.; Braun, H. P.: Supramolecular structure of the mitochondrial oxidative phosphorylation system. *J. Biol. Chem.* **282**:1, 1-4 (2007).
41. Schafer, E.; Seelert, H.; Reifschneider, N. H.; Krause, F.; Dencher, N. A.; Vonck, J.: Architecture of active mammalian respiratory chain supercomplexes. *J. Biol. Chem.* **281**:22, 15370-15375 (2006).
42. Schagger, H.: Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* **1555**:1-3, 154-159 (2002).
43. Zhang, M.; Mileyskoykaya, E.; Dowhan, W.: Gluing the respiratory chain together. Cardiolipin is required for supercomplex formation in the inner mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.* **277**:46, 43553-43556 (2002).
44. Schagger, H.; de Coo, R.; Bauer, M. F.; Hofmann, S.; Godinot, C.; Brandt, U.: Significance of respirasomes for the assembly/stability of human respiratory chain complex I. *J. Biol. Chem.* **279**:35, 36349-36353 (2004).
45. Chicco, A. J.; Sparagna, G. C.: Role of cardiolipin alterations in mitochondrial dysfunction and disease. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **292**:1, C33-44 (2007).
46. Schagger, H.; Pfeiffer, K.: Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *Embo J.* **19**:8, 1777-1783. (2000).
47. Dudkina, N. V.; Eubel, H.; Keegstra, W.; Boekema, E. J.; Braun, H. P.: Structure of a mitochondrial supercomplex formed by respiratory-chain complexes I and III. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **102**:9, 3225-3229 (2005).
48. Heinemeyer, J.; Braun, H. P.; Boekema, E. J.; Kouril, R.: A structural model of the cytochrome c reductase / oxidase supercomplex from yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* (2007).
49. Schafer, E.; Dencher, N. A.; Vonck, J.; Parcej, D. N.: Three-Dimensional Structure of the Respiratory Chain Supercomplex I(1)III(2)IV(1) from Bovine Heart Mitochondria(.). *Biochemistry* **46**:44, 12579-12585 (2007).
50. DiMauro, S.: Mitochondrial diseases. *Biochim. Biophys. Acta* **1658**:1-2, 80-88 (2004).
51. Shoubridge, E. A.: Nuclear genetic defects of oxidative phosphorylation. *Hum. Mol. Genet.* **10**:20, 2277-2284. (2001).
52. Huxley, C.; Fried, M.: The mouse surfeit locus contains a cluster of six genes associated with four CpG-rich islands in 32 kilobases of genomic DNA. *Mol. Cell. Biol.* **10**:2, 605-614. (1990).
53. Tiranti, V.; Galimberti, C.; Nijtmans, L.; Bovolenta, S.; Perini, M. P.; Zeviani, M.: Characterization of SURF-1 expression and Surf-1p function in normal and disease conditions. *Hum. Mol. Genet.* **8**:13, 2533-2540 (1999).
54. Pecina, P.; Houstkova, H.; Hansikova, H.; Zeman, J.; Houstek, J.: Genetic defects of cytochrome c oxidase assembly. *Physiol. Res.* **53 Suppl 1**, S213-223 (2004).
55. Pequignot, M. O.; Dey, R.; Zeviani, M.; Tiranti, V.; Godinot, C.; Poyau, A.; Sue, C.; Di Mauro, S.; Abitbol, M.; Marsac, C.: Mutations in the SURF1 gene associated with Leigh syndrome and cytochrome c oxidase deficiency. *Hum. Mutat.* **17**:5, 374-381. (2001).
56. Poyau, A.; Buchet, K.; Bouzidi, M. F.; Zobot, M. T.; Echenne, B.; Yao, J.; Shoubridge, E. A.; Godinot, C.: Missense mutations in SURF1 associated with



- deficient cytochrome c oxidase assembly in Leigh syndrome patients. *Hum. Genet.* **106**:2, 194-205. (2000).
57. Zhu, Z.; Yao, J.; Johns, T.; Fu, K.; De Bie, I.; Macmillan, C.; Cuthbert, A. P.; Newbold, R. F.; Wang, J.; Chevrette, M.; Brown, G. K.; Brown, R. M.; Shoubridge, E. A.: SURF1, encoding a factor involved in the biogenesis of cytochrome c oxidase, is mutated in Leigh syndrome. *Nat. Genet.* **20**:4, 337-343 (1998).
  58. Tiranti, V.; Hoernagel, K.; Carozzo, R.; Galimberti, C.; Munaro, M.; Granatiero, M.; Zelante, L.; Gasparini, P.; Marzella, R.; Rocchi, M.; Bayona-Bafaluy, M. P.; Enriquez, J. A.; Uziel, G.; Bertini, E.; Dionisi-Vici, C.; Franco, B.; Meitinger, T.; Zeviani, M.: Mutations of SURF-1 in Leigh disease associated with cytochrome c oxidase deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* **63**:6, 1609-1621 (1998).
  59. Tiranti, V.; Jaksch, M.; Hofmann, S.; Galimberti, C.; Hoernagel, K.; Lulli, L.; Freisinger, P.; Bindoff, L.; Gerbitz, K. D.; Comi, G. P.; Uziel, G.; Zeviani, M.; Meitinger, T.: Loss-of-function mutations of SURF-1 are specifically associated with Leigh syndrome with cytochrome c oxidase deficiency [see comments]. *Ann. Neurol.* **46**:2, 161-166 (1999).
  60. Williams, S. L.; Taanman, J. W.; Hansikova, H.; Houst'kova, H.; Chowdhury, S.; Zeman, J.; Houstek, J.: A Novel Mutation in SURF1 Causes Skipping of Exon 8 in a Patient with Cytochrome c Oxidase-Deficient Leigh Syndrome and Hypertrichosis. *Mol. Genet. Metab.* **73**:4, 340-343. (2001).
  61. Ogawa, Y.; Naito, E.; Ito, M.; Yokota, I.; Saijo, T.; Shinahara, K.; Kuroda, Y.: Three novel SURF-1 mutations in Japanese patients with Leigh syndrome. *Pediatr. Neurol.* **26**:3, 196-200. (2002).
  62. Capkova, M.; Hansikova, H.; Godinot, C.; Houst'kova, H.; Houstek, J.; Zeman, J.: [A new missense mutation of 574C>T in the SURF1 gene--biochemical and molecular genetic study in seven children with Leigh syndrome]. *Cas. Lek. Cesk.* **141**:20, 636-641. (2002).
  63. Pecina, P.; Capkova, M.; Chowdhury, S. K.; Drahota, Z.; Dubot, A.; Vojtiskova, A.; Hansikova, H.; Houst'kova, H.; Zeman, J.; Godinot, C.; Houstek, J.: Functional alteration of cytochrome c oxidase by SURF1 mutations in Leigh syndrome. *Biochim. Biophys. Acta* **1639**:1, 53-63 (2003).
  64. Rahman, S.; Blok, R. B.; Dahl, H. H.; Danks, D. M.; Kirby, D. M.; Chow, C. W.; Christodoulou, J.; Thorburn, D. R.: Leigh syndrome: clinical features and biochemical and DNA abnormalities. *Ann. Neurol.* **39**:3, 343-351. (1996).
  65. Dell'agnello, C.; Leo, S.; Agostino, A.; Szabadkai, G.; Tiveron, C.; Zulian, A.; Prella, A.; Roubertoux, P.; Rizzuto, R.; Zeviani, M.: Increased longevity and refractoriness to Ca<sup>2+</sup>-dependent neurodegeneration in Surf1 knockout mice. *Hum. Mol. Genet.* **16**:4, 431-444 (2007).
  66. Bentlage, H. A.; Wendel, U.; Schagger, H.; ter Laak, H. J.; Janssen, A. J.; Trijbels, J. M.: Lethal infantile mitochondrial disease with isolated complex I deficiency in fibroblasts but with combined complex I and IV deficiencies in muscle. *Neurology* **47**:1, 243-248 (1996).
  67. Bradford, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254 (1976).
  68. Klement, P.; Nijtmans, L. G.; Van den Bogert, C.; Houstek, J.: Analysis of oxidative phosphorylation complexes in cultured human fibroblasts and amniocytes by blue-native-electrophoresis using mitoplasts isolated with the help of digitonin. *Anal. Biochem.* **231**:1, 218-224 (1995).

69. Průša, R., *Základy analytických metod v klinické molekulární biologii*, , str. 31 (1997): *Základy analytických metod v klinické molekulární biologii*. vydání skriptum PŘF UK Praha 1997.
70. Schagger, H.: Blue-native gels to isolate protein complexes from mitochondria. *Methods Cell Biol.* **65**, 231-244. (2001).
71. Wittig, I.; Braun, H. P.; Schagger, H.: Blue native PAGE. *Nat. Protoc.* **1**:1, 418-428 (2006).
72. Schagger, H.; von Jagow, G.: Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**, 368-379 (1987).
73. Westermeier, R.: *Electrophoresis in Practice*. Fourth Edition vydání Weinheim, 2005.
74. Brouillard, F.; Bensalem, N.; Hinzpeter, A.; Tondelier, D.; Trudel, S.; Gruber, A. D.; Ollero, M.; Edelman, A.: Blue native/SDS-PAGE analysis reveals reduced expression of the mCICA3 protein in cystic fibrosis knock-out mice. *Mol. Cell Proteomics* **4**:11, 1762-1775 (2005).
75. Capaldi, R. A.; Aggeler, R.; Wilkens, S.: Conformational changes in the gamma and epsilon subunits are integral to the functioning of the Escherichia coli H(+)-pumping ATPase (ECF1F0). *Biochem. Soc. Trans.* **23**, 767-770 (1995).
76. Schutz-Geschwender, A., et al: Quantitative, Two-Color Western Blot Detection With Infrared Fluorescence. *LI-COR Biosciences*, 1-7 (2004).
77. Benard, G.; Faustin, B.; Passerieux, E.; Galinier, A.; Rocher, C.; Bellance, N.; Delage, J. P.; Casteilla, L.; Letellier, T.; Rossignol, R.: Physiological diversity of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **291**:6, C1172-1182 (2006).
78. Stiburek, L.; Vesela, K.; Hansikova, H.; Pecina, P.; Tesarova, M.; Cerna, L.; Houstek, J.; Zeman, J.: Tissue-specific cytochrome c oxidase assembly defects due to mutations in SCO2 and SURF1. *Biochem. J.* (2005).

## Příloha

### 3. Seznam použitých přístrojů a chemikálií

#### 3.1 Použité přístroje

Analytické váhy MM-120	AND, Japonsko
Aparatura na Western-blot	OMNIBIO, Česká Republika
Automatické pipety (P 2, P 20, P 200, P 1000)	Gilson, USA
Centrifuga laboratorní	SIGMA, Německo
Centrifuga Centaur 2 MSE	Sanyo, USA
Fluorescenční scanner Odyssey	LI-COR, USA
Homogenizér RZR 2041	Heidolph Instruments GmbH, Německo
Lednice	Zanussi, Itálie
Magnetická míchačka	H+P Labortechnik AG, Německo
Míchačka SSL4	Stuart scientific, UK
Mrazicí box	SANYO, Japonsko
pH-metr HI 902 s elektrodou HI 1230	HANNA instruments, UK
Předvážky	AND, Japonsko
Pumpa na nalévání gradientových gelů	Cole-Parmer Instruments, USA
Sada na elektroforézu MiniProtean II	Bio-Rad, Německo
Scanner CanoScan 9950F	Canon, Japonsko
Skleněný homogenizátor s teflonovým pístem	KONTES GLASS Co., USA
Sonikátor BANDELIN	Sonoplus, Francie
Spektrofotometr BioPhotomet	Eppendorf, Německo
Termostat B15	Heraeus instruments, Německo
Vortex MS2 Minishaker	IKA Works, INC., UK
Zdroje napětí pro elektroforézu	Bio-Rad, USA

### 3.2 Použité chemikálie

- Akrylamid SERVA, Německo
- Alexa fluor 680 *antimouse* Molecular Probes, USA
- $\epsilon$ -Aminokapronová kyselina 99 %, SIGMA, Německo
- Bisakrylamid SERVA, Německo
- Bis-Tris 98 %, SIGMA, Německo
- BSA Bioveta, Česká Republika
- Bradfordovo činidlo Bio-Rad, USA
- Coomassie Brilliant Blue R-250 SIGMA, USA
- DMEM médium PAA, UK
- Digitonin FLUKA, Švýcarsko
- Ethanol 99,8 %, Lachema, Česká Republika
- Fetální hovězí sérum SIGMA, Německo
- Geneticin (G 418 disulfátová sůl) SIGMA, Německo
- Glycerol 99 %, SIGMA, Německo
- Glycin 99 %, REANAL, Maďarsko
- HEPES  $\geq 99,5$  %, SIGMA, Německo
- HCl 35 %, Lach-Ner, Česká Republika
- Inhibitory proteas (PIC) SIGMA, Německo
- KCl 99,5 %, Lachema, Česká Republika
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  99 %, Lachema, Česká Republika
- EDTA 99 %, SIGMA, Německo
- EGTA  $\geq 97$  %, SIGMA, Německo
- Kyselina octová 99 %, Lach-Ner, sr.o., Česká Republika
- Merkaptoethanol (monothioetylglykol) SERVA, Německo
- Methanol 99,8 %, Penta, Česká Republika
- NaCl Lach-Ner, Česká Republika
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  98 %, Lach-Ner, Česká Republika
- NaOH Lach-Ner, Česká Republika
- N,N'-metylen-bisakrylamid SERVA, Německo
- Laktino sušené mléko (1,3 % tuku) Promil, Slovenská Republika
- LM (dodecyl- $\beta$ -D-maltosid) 99 %, FLUKA, Švýcarsko
- Penicilin/streptomycin GIBCO, USA
- Peroxosíran amonný Bio-Rad, USA

- Protilátky proti podjednotkám komplexů:
  - NDUFB6, NDUFS3, COX I MitoSciences, USA
  - Core 1 Molecular Probes, USA
- Sacharosa 99,5 %, SIGMA, Německo
- Serva Blue G barvivo SERVA, Německo
- Sodná sůl dodecylsulfátu (SDS) 99 %, SERVA, Německo
- Standard molekulové hmotnosti „PageRuler Prestained Ladder“  
Fermentas, Litva
- Standard molekulové hmotnosti „HMW Calibration Kit for Native Electrophoresis“  
Amersham, UK
- TEMED SERVA, Německo
- Tricin 99 %, SIGMA, Německo
- Tris 99 %, SIGMA, Německo
- Tris-HCl 99 %, SIGMA, Německo
- Trypsin SIGMA, Německo
- Tween 20 SIGMA, Německo

## Přípravy a složení použitých roztoků pro jednotlivé metody

### 4.2 Izolace mitochondrií z myších tkání

- **Použitá média :**

**K médium** - 150 ml 1 M KCl, 100 ml 0,5M Tris-HCl, 4 ml 0,5 M EDTA, doplnit do 1000 ml H<sub>2</sub>O, pH 7,4

**KP médium** - K médium + 1:500 PIC

**STE médium** - 85,5 g sacharosy, 20 ml 0,5 M Tris-HCl, 20 ml 0,1 M EDTA, doplnit do 1000 ml H<sub>2</sub>O, pH 7,2

**STEA médium** - STE s 0,5 mg/ml BSA (0,5 g/1000 ml)

**STEAP médium** - STEA + 1:500 PIC

### 4.2.4 Izolace mitochondrií z fibroblastů

#### 4.2.4.1 Roztoky pro sklízení buněk (fibroblastů)

**PBS 10x** – 24 g NaCl, 1,2 g KCl, 8,4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12 H<sub>2</sub>O, 0,6 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 ml deionizované vody, pH 7,2-7,3/1M NaOH

**PBS 1x** – 300 ml PBS 10x doplnit do 3 l deionizovanou vodou, přefiltrovat přes řídký papírový filtr (prvních 200 ml vylít), sterilizace 20 min v autoklávu na 121 °C

**Trypsin 2%** – 20 g/l v PBS 1x, přečištění filtrací přes 0,22μm filtr

**EDTA 2%** – 20 g/l v PBS 1x, přečištění filtrací přes 0,22μm filtr

**TE** – 5 ml 2% trypsinu + 2 ml 2% EDTA + 43 ml PBS 1x, přečištění filtrací přes 0,22μm filtr, po filtraci přidat 150 ml PBS 1x

#### 4.2.4.2 Roztoky pro izolaci mitochondrií

**SEKT** – 250 mM sacharosa, 40 mM KCl, 20 mM Tris-HCl, 2 mM EGTA, pH 7,6

**10 mM Tris pufr (s přidavkem PIC (1:500))**

**SEKTP** – SEKT s přidavkem PIC (1:500)

**1,5 mM sacharosa**

#### 4.4.1.1 Příprava vzorků pro BN-PAGE

- **Použité roztoky:**

**Standard molekulové hmotnosti („HMW Calibration Kit for Native Electrophoresis“)** – 250 μg směsi proteinů, v jedné vialce, o složení: Thyroglobulin (669 kDa), Ferritin (440 kDa), Katalasa (232 kDa), Laktát dehydrogenasa (140 kDa), BSA (67 kDa)

(Příprava: 10µg standardu, 200 µl MB2, 15 µl 10% LM, 14 µl SBG)

**MB2** – (Mitochondriální pufr) 1,5 M  $\epsilon$ -aminokapronová kyselina, 150 mM Bis-Tris, 0,5 mM EDTA, pH 7,0

(Příprava: 0,5 ml 3×GB, 0,5 ml 2 M  $\epsilon$ -aminokapronové kyseliny, 4 µl 0,5 M EDTA)

**SBG** – (Vzorkový pufr) 0,75 M  $\epsilon$ -aminokapronová kyselina, 5% SBG

(Příprava: 3,75 ml 2 M  $\epsilon$ -aminokapronové kyseliny, 0,5 g SBG, 10 ml H<sub>2</sub>O)

**3% Dig** – práškový digitonin rozpuštěný v destilované vodě, 95°C

**10% LM** - práškový LM rozpuštěný v destilované vodě

#### 4.4.1.2 Pracovní postup BN-PAGE

- **Použité roztoky:**

**3×GB** – (3× Gelový pufr) 1,5 M  $\epsilon$ -aminokapronová kyselina, 150 mM Bis-Tris, pH 7,0

(Příprava: 10,5 g  $\epsilon$ -aminokapronové kyseliny, 3,14 g Bis-Tris, 100 ml H<sub>2</sub>O)

**Katodový pufr** – 15 mM Bis-Tris, 50 mM Tricin, pH 7,0

(Příprava: 3,14 g Bis-Tris, 8,96 g Tricin, 100 ml H<sub>2</sub>O)

**Modrý katodový pufr** – katodový pufr obsahující 0,02% barviva SBG

(Příprava: 100 ml katodového pufru, 0,02 g SBG)

**Anodový pufr** – 50 mM Bis-Tris, pH 7,0

(Příprava: 20,93 g Bis-Tris, 2000 ml H<sub>2</sub>O)

**AB** – (směs akrylamid/bisakrylamid) 48% akrylamid, 1,5% bisakrylamid

(Příprava: 24,0 g akrylamidu, 0,75 g bisakrylamidu, směs se rozpustí v 50 ml H<sub>2</sub>O při 99,5 °C)

**AP** – 10% peroxosíran amonný (0,1 g/ml)

#### 4.4.2 2D elektroforéza BN-PAGE/SDS-PAGE, pracovní postup

- **Použité roztoky pro SDS elektroforézu (Tricin-SDS-PAGE):**

**3×GB** – (3× Gelový pufr) 3M Tris HCl, 0,3% SDS, pH 8,45

(Příprava: 18,16 g Tris, 10 ml 5M HCl, 0,75 ml 20% SDS, 50 ml H<sub>2</sub>O)

**Katodový pufr** – 100 mM Tris, 100 mM Tricin, 0,1% SDS, pH 8,25

(Příprava: 12,11 g Tris, 17,92 g Tricin, 5 ml 20% SDS nebo 1 g SDS, 1000 ml H<sub>2</sub>O)

**Anodový pufr** – 100 mM Tris-HCl, pH 8,9

(Příprava: 12,11 g Tris, 1000 ml H<sub>2</sub>O)

**AB** – (směs akrylamid/bisakrylamid) 48% akrylamid, 1,5% bisakrylamid

(Příprava: 24,0 g akrylamidu, 0,75 g bisakrylamidu, směs se rozpustí v 50 ml H<sub>2</sub>O při 99,5 °C)

**AP** – 10% peroxosíran amonný (0,1 g/ml)

**Standard molekulové hmotnosti (PageRuler Prestained Ladder)** – 10 rekombinantních proteinů s molekulovou hmotností 10-17 kDa, 0,1-0,2 mg každého proteinu/ml

#### 4.5.1 Elektrotransfer na PVDF membránu

- **Diskontinuální blotovací pufrы:**

**Pufr I** (Anodový pufr I) - 18,1 g Tris, 50 ml methanol, 450 ml H<sub>2</sub>O, pH 10,4

**Pufr II** (Anodový pufr II) - 1,51 g Tris, 50 ml methanol, 450 ml H<sub>2</sub>O, pH 9,0

**Pufr III** (Katodový pufr) - 2,29 g Tris, 0,38 g glycin, 50 ml methanol, 450 ml H<sub>2</sub>O, pH 8,5

#### 4.5.2 Imunodetekce na PVDF membráně

- **Použité roztoky:**

**PBS** – 0,15 M NaCl, 0,02 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,4 / NaOH

**PBST 0,3** (PBS-Tween 0,3%) – 0,3% Tween 20 v PBS (1,5 ml/500 ml)

**10% mléko** (nízkotučné) v PBS – 5 g sušeného mléka + 50 ml PBS

#### 4.7 Barvení gelů Coomassie blue R-250 barvou

**Barvicí roztok** - 440 mg Coomassie blue R-250 barvy, 400 ml methanolu, 400 ml destilované vody, 80 ml kyseliny octové (ledové)

**Fixační roztok** - 250 ml methanolu, 80 ml kyseliny octové (ledové), 650 ml destilované vody