

Abstrakt

F₁F₀-ATP syntáza je klíčovým enzymem buněčného energetického metabolismu. Její případný deficit může být způsoben mutacemi ve dvou strukturních genech *MT-ATP6* a *MT-ATP8* v mitochondriální DNA či v jaderných genech *ATPAF2* a *TMEM70* kódující faktory pro biogenezi enzymu a strukturním genu *ATP5E*. Deficit F₁F₀-ATP syntázy vede k rozvoji velmi závažného fenotypu postihující orgány s vysokými energetickými nároky s nástupem v novorozeneckém věku a nepříznivou prognózou. Mutace v uvedených genech navíc nezpůsobují pouze kvalitativní (mutace ve strukturních podjednotkách enzymu) či kvantitativní (mutace v genech pro faktory biogeneze enzymu) defekty, ale také jejich kombinace. Při studiu molekulární podstaty mitochondriálních onemocnění včetně deficitu F₁F₀-ATP syntázy se využívá široká škála biochemických i molekulárně-genetických metod pro stanovení správné diagnózy, která je nezbytná pro včasné zahájení symptomatické léčby a genetické poradenství v postižených rodinách.

Cílem diplomové práce bylo charakterizovat deficit F₁F₀-ATP syntázy v izolovaných mitochondriích z linií kultivovaných buněk stanovením oligomycin-senzitivní ATP-hydrolytické aktivity F₁F₀-ATP syntázy, enzymových aktivit komplexů dýchacího řetězce a sledováním změn v množství jednotlivých vybraných podjednotek a celého komplexu F₁F₀-ATP syntázy v porovnání s kontrolami. Po optimalizaci metody stanovení oligomycin-senzitivní ATP-hydrolytické aktivity F₁F₀-ATP syntázy byly charakterizovány 3 buněčné linie HEK293 se stabilně sníženou expresí genu *TMEM70* a 16 buněčných linií kožních fibroblastů od pacientů s podezřením na deficit F₁F₀-ATP syntázy. V izolovaných mitochondriích z buněk HEK293 se stabilně sníženou expresí genu *TMEM70* byl nalezen pokles oligomycin-senzitivní ATP-hydrolytické aktivity na 25-86% kontrolních hodnot. Snížená ATP-hydrolytická aktivita byla nalezena také v izolovaných mitochondriích z 10 buněčných linií kožních fibroblastů. U 4 linií fibroblastů s mutací 317-2A>G v genu *TMEM70* výrazně snížená aktivita F₁F₀-ATP syntázy (43% kontroly) korelovala i se sníženým množstvím podjednotek (α , β , d , OSCP) a holoenzymu F₁F₀-ATP syntázy. Navíc enzymové aktivity komplexů dýchacího řetězce dosahovaly >100% kontrolních hodnot a nárůst byl potvrzen i na proteinové úrovni. 6 buněčných linií fibroblastů od pacientů s podezřením na deficit F₁F₀-ATP syntázy vykazovalo nízkou oligomycin-senzitivní ATP-hydrolytickou aktivitu (43-76% kontroly), ale množství vybraných podjednotek a holoenzymu F₁F₀-ATP syntázy bylo srovnatelné s kontrolou. V genech *MT-ATP6* a *MT-ATP8* nebyla nalezena patogenní mutace.

Závěrem lze říci, že optimalizovaná metoda pro spektrofotometrické stanovení oligomycin-senzitivní ATP-hydrolytické aktivity F₁F₀-ATP syntázy v izolovaných

mitochondriích z kultivovaných buněk byla úspěšně použita jak v buněčných modelech deficitu F_1F_0 -ATP syntázy, tak i v liniích kožních fibroblastů od pacientů s podezřením na deficit tohoto enzymu a rozšiřuje tak spektrum metod vhodných pro diagnostiku mitochondriálních onemocnění.