

**Univerzita Karlova v Praze**

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie

Diplomová práce

## **Studium deficitu lidské $F_1F_0$ -ATP syntázy**

Human  $F_1F_0$ -ATP synthase deficiency

Bc. Sabina Suldovská

Praha 2010

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Markéta Tesařová, PhD.

Laboratoř pro studium mitochondriálních poruch

Klinika dětského a dorostového lékařství 1.LF UK a VFN

Ke Karlovu 2, Praha 2

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s použitím citované literatury a pod vedením uvedeného školitele.

Ráda bych poděkovala své školitelce Ing. Markétě Tesařové, PhD. za veškerý čas, cenné rady i trpělivost při odborném vedení diplomové práce. Zároveň děkuji Prof. MUDr. Jiřímu Zemanovi, DrSc. a RNDr. Haně Hansíkové, CSc. za možnost působení v Laboratoři pro studium mitochondriálních poruch a podílení se na experimentální činnosti. V neposlední řadě děkuji celému kolektivu laboratoře za jejich spolupráci a přátelský přístup.

Diplomová práce vznikla s podporou následujících grantových projektů: IGA NS 9759-3/2008, GAUK 37710 a výzkumným záměrem MSM 0021620806.

## Abstrakt

F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-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 F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-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 F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-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 F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP syntázy v izolovaných mitochondriích z linií kultivovaných buněk stanovením oligomycin-senzitivní ATP-hydrolytické aktivity F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP syntázy, enzymových aktivit komplexů dýchacího řetězce a sledováním změn v množství jednotlivých vybraných podjednotek a celého komplexu F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP syntázy v porovnání s kontrolami. Po optimalizaci metody stanovení oligomycin-senzitivní ATP-hydrolytické aktivity F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-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 F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-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 F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP syntázy (43% kontroly) korelovala i se sníženým množstvím podjednotek ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $d$ , OSCP) a holoenzymu F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-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 F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP syntázy vykazovalo nízkou oligomycin-senzitivní ATP-hydrolytickou aktivitu (43-76% kontroly), ale množství vybraných podjednotek a holoenzymu F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-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 F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-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.

Klíčová slova: biogeneze, BN-PAGE,  $F_1F_0$ -ATP syntáza, enzymové aktivity komplexů dýchacího řetězce, mitochondrie, mitochondriální onemocnění, mutace, oligomycin-senzitivní ATP-hydrolytická aktivita  $F_1F_0$ -ATP syntázy, OXPHOS, SDS-PAGE

## Abstract

F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase is a key enzyme in energy metabolism of the cell. Its deficit is caused usually by mutations in two structural genes *MT-ATP6* and *MT-ATP8* encoded by the mitochondrial DNA or in nuclear genes *ATPAF2* and *TMEM70* encoding the biogenesis factors and structural gene *ATP5E*. Deficiency of the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase leads to progressive and serious phenotype affecting organs with high energy demands. The first symptoms usually occurs in neonatal age and prognosis of the disease is fatal. Mutations in these genes result in both qualitative and quantitative defects of the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase. The study of molecular bases of mitochondrial disorders including F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase deficiency uses large number of biochemical and molecular-genetic methods to determine a proper diagnosis which is essential for the symptomatic therapy and genetic counselling in affected families.

The aim of the diploma thesis was to characterise the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase deficiency in isolated mitochondria from the lines of cultured cells by the determination oligomycin-sensitive ATP-hydrolytic activity of the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase, enzymatic activities of the respiratory chain complexes and to analyse changes in the steady-state levels of the representative subunits and whole complex of the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase in comparison with controls. 3 cell lines HEK293 with stably down-regulated expression of the *TMEM70* gene and 16 cell lines of the skin fibroblasts from patients with the suspicion of the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase deficiency were characterised by the optimized method for the measurement of the oligomycin-sensitive ATP-hydrolytic activity. In isolated mitochondria from HEK293 cells with stably down-regulated *TMEM70* gene, the decrease in the oligomycin-sensitive ATP-hydrolytic activity among 25-86% of control values was found. Decreased ATP-hydrolytic activity was found in isolated mitochondria from 10 cell lines of the skin fibroblasts as well. Markedly decreased activity of the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase (43% of the control) in 4 fibroblasts lines with mutation 317-2A>G in *TMEM70* gene correlated with decreased abundance of the subunits ( $\alpha$ ,  $\beta$ , *d*, OSCP) and holoenzyme F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase. Furthermore enzymatic activities of the respiratory chain complexes reached up >100% of control values and the increase was in concordance with increased steady-state levels of corresponding subunits. In 6 fibroblasts lines from patients with suspicion of the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase deficiency, decreased oligomycin-sensitive ATP-hydrolytic activity (43-76% of the controls) was observed but no changes in the abundance of the representative subunits and holoenzyme F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase were found out. In *MT-ATP6* and *MT-ATP8* genes, no pathogenic mutations were detected.

In conclusion, the optimized method to determinate oligomycin-sensitive ATP-hydrolytic activity of the  $F_1F_0$ -ATPsynthase in isolated mitochondria from cultivated cells was applied with success in the cell models as in lines of the skin fibroblasts from patient with suspicion of the  $F_1F_0$ -ATPsynthase deficiency. It could spread the spectrum of proper methods for diagnostics of the mitochondrial disorders.

Key words: biogenesis, BN-PAGE,  $F_1F_0$ -ATPsynthase, enzymatic activities of the respiratory chain complex, mitochondria, mitochondrial disorders, mutations, oligomycin-sensitive ATP-hydrolytic activity of the  $F_1F_0$ -ATPsynthase, OXPHOS, SDS-PAGE

## Obsah

1	Úvod .....	12
2	Cíle .....	13
3	<b>Literární přehled</b> .....	14
3.1	Stavba a funkce mitochondrií .....	14
3.2	Struktura lidské mitochondriální DNA .....	15
3.3	Komplexy systému OXPHOS .....	16
3.4	Struktura F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATP syntázy .....	17
3.4.1	Stavba a funkce podjednotek F <sub>1</sub> – domény .....	18
3.4.1.1	α/β – domény .....	18
3.4.1.2	Centrální stopka .....	19
3.4.1.3	Inhibiční faktor 1 (IF1) .....	20
3.4.1.4	Katalytický mechanismus F <sub>1</sub> -domény .....	21
3.4.2	Stavba a funkce podjednotek F <sub>0</sub> -domény .....	21
3.4.2.1	Postranní stopka .....	22
3.4.2.2	Podjednotka A6 (a-podjednotka) .....	22
3.4.2.3	c-oligomer .....	23
3.4.2.4	Faktor B .....	23
3.4.2.5	Mechanismus rotace F <sub>0</sub> -sektoru F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATP syntázy .....	24
3.5	Biogeneze F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATP syntázy .....	25
3.5.1	Organizace F <sub>1</sub> domény .....	26
3.5.1.1	Funkce chaperonových proteinů Atp11p (Atpaf1) a Atp12p (Atpaf2) .....	26
3.5.2	Sestavení kompletní F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATP syntázy .....	28
3.5.3	Oligomerní uspořádání F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATP syntázy .....	29
3.6	Defekty mitochondriální F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATP syntázy .....	31
3.6.1	Mutace ve strukturních genech F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATP syntázy .....	31
3.6.1.1	Gen <i>ATP5E</i> .....	32
3.6.1.2	Gen <i>MT-ATP6</i> .....	32
3.6.1.3	Gen <i>MT-ATP8</i> .....	34
3.6.2	Mutace v genech pro faktory biogeneze F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATP syntázy .....	35
3.6.2.1	Gen <i>ATPAF2 (ATP12)</i> .....	35
3.6.2.2	Gen <i>TMEM70</i> .....	35
3.6.3	Mutace v genech pro mitochondriální přenašeče (AA1, PiC) .....	36
3.6.3.1	AA1 přenašeč .....	36
3.6.3.2	Pi přenašeč .....	36
3.6.4	Možnosti mitochondriální diagnostiky .....	37
3.6.4.1	Příklady standardně používaných biochemických a molekulárně – genetických analýz .....	37
3.6.4.2	Problémy v diagnostice způsobené mutacemi v mtDNA .....	39
4	<b>Materiál a metody</b> .....	40
4.1	Materiál .....	40
4.2	Používané přístroje .....	41
4.3	Použité chemikálie .....	42
4.4	Roztoky .....	44
4.5	Metody .....	46
4.5.1	Stanovení koncentrace proteinů .....	46
4.5.1.1	Bradfordovo, resp. Lowryho stanovení .....	46
4.5.2	Izolace mitochondriální frakce z kultivovaných buněk diferenciální centrifugací .....	46
4.5.3	Příprava vzorků na SDS-elektroforézu .....	46
4.5.4	SDS elektroforéza .....	47



4.5.5	Příprava vzorku na nativní elektroforézu (BN- PAGE).....	47
4.5.5.1	Sklízení fibroblastů.....	47
4.5.5.2	Digitonizace a solubilizace fibroblastů .....	47
4.5.6	Nativní elektroforéza (BN-PAGE) .....	48
4.5.7	Semi – dry western blot .....	48
4.5.8	Enzymologická měření .....	49
4.5.8.1	Stanovení specifické aktivity NADH:CoQ oxidoreduktázy (komplex I)..	50
4.5.8.2	Stanovení specifické aktivity sukcinát:CoQ oxidoreduktázy (komplex II)	50
4.5.8.3	Stanovení specifické aktivity CoQH <sub>2</sub> :cytochrom c oxidoreduktáza (komplex III).....	51
4.5.8.4	Stanovení specifické aktivity NADH:cytochrom c oxidoreduktázy (komplex I - III).....	51
4.5.8.5	Stanovení specifické aktivity sukcinát:cytochrom c oxidoreduktázy (komplex II – III) .....	51
4.5.8.6	Stanovení specifické aktivity cytochrom c oxidázy (komplex IV) .....	52
4.5.8.7	Stanovení specifické oligomycin-senzitivní ATP-hydrolytické aktivity F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATP-syntázy (komplex V).....	52
4.5.8.8	Stanovení specifické aktivity citrátsyntázy .....	52
4.5.9	Sekvenování genů <i>MT-ATP6</i> , <i>MT-ATP8</i> .....	53
5	<b>Výsledky</b> .....	55
5.1	Optimalizace stanovení oligomycin–senzitivní ATP-hydrolytické aktivity F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATP-syntázy v izolovaných mitochondriích z kultivovaných buněk .....	55
5.2	Charakterizace fenotypu buněčných linií HEK293 se stabilně sníženou expresí genu <i>TMEM70</i> .....	58
5.2.1	Stanovení oligomycin-senzitivní ATP-hydrolytické aktivity F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATP-syntázy.....	58
5.2.2	Stanovení rovnovážného množství vybraných podjednotek F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATP-syntázy.....	60
5.3	Biochemická analýza buněčných linií kultivovaných kožních fibroblastů od pacientů s podezřením na deficit F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATP-syntázy .....	61
5.3.1	Spektrofotometrická stanovení enzymových aktivit komplexů OXPHOS.....	61
5.3.2	Stanovení rovnovážného množství komplexů OXPHOS a jejich vybraných podjednotek v liniích kožních fibroblastů se sníženou oligomycin-senzitivní ATP-hydrolytickou aktivitou .....	67
5.4	Sekvenování mitochondriálních genů <i>MT-ATP6</i> , <i>MT-ATP8</i> .....	72
6	<b>Diskuze</b> .....	73
6.1	Optimalizace stanovení oligomycin-senzitivní ATP-hydrolytické aktivity F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATP-syntázy v izolovaných mitochondriích z kultivovaných buněk .....	73
6.2	Buněčné linie HEK293 se stabilně sníženou expresí genu <i>TMEM70</i> .....	74
6.2.1	Charakterizace buněčných linií stanovením oligomycin-senzitivní ATP-hydrolytické aktivity F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATP-syntázy, enzymových aktivit komplexů dýchacího řetězce a CS .....	74
6.2.2	Charakterizace buněčných linií na proteinové úrovni .....	74
6.3	Buněčné linie kožních fibroblastů od pacientů s deficitem F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATP-syntázy.....	75
6.3.1	Charakterizace buněčných linií stanovením oligomycin-senzitivní ATP-hydrolytické aktivity F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATP-syntázy, enzymových aktivit komplexů dýchacího řetězce a CS .....	75
6.3.2	Charakterizace buněčných linií na proteinové úrovni .....	77
7	<b>Shrnutí</b> .....	79
8	<b>Seznam použité literatury</b> .....	81
9	<b>Přílohy</b> .....	88

## Seznam zkratek:

3x GB	3x Gel Buffer
AA1/ANT	adeninnukleotidový přenašeč
adPEO	autosomálně dominantní progresivní oftalmoplegie
ADP	adenosin-5'-difosfát
AGE	agarózová gelová elektroforéza
APS	amoniumpersulfát
Atpaf1	asemblační faktor 1
Atpaf2	asemblační faktor 2
ATP	adenosin-5'-trifosfát
bis-ANS	4, 4'-bis-(1-anilinonaftalen-8-sulfonát)
BN-PAGE	modrá nativní polyakrylamidová elektroforéza
BSA	hovězí sérový albumin
BSN	bilaterální striatální neuropatie
CCCP	karbonyl kyanid fenyldiazon
CoQ	koenzym Q (ubichinon)
COX	cytochrom-c-oxidáza
CS	citrátsyntáza
Da	dalton
DBH <sub>2</sub>	durochinol
DCPIP	dichloro - fenol-indol - fenol
DTNB	5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoat)
F <sub>1</sub>	faktor 1
F <sub>0</sub>	faktor oligomycin
FADH <sub>2</sub>	flavinadeninukleotid redukovaný
HC stav	„hemi-closed“ konformační stav
IF1	inhibiční faktor 1
LDH	laktátdehydrogenáza
L stav	„loose“ konformační stav
MILS	Leighův syndrom
<i>MT-ATP6</i>	mitochondriální gen pro podjednotku <i>a</i>
<i>MT-ATP8</i>	mitochondriální gen pro podjednotku A6L
<i>MT-COX3</i>	mitochondriální gen pro podjednotku Cox3
mtDNA	mitochondriální DNA

<i>MT-RNR1</i>	mitochondriální gen pro ribosomální RNA
NAD <sup>+</sup>	nikotinamidadenindinukleotid oxidovaný
NADH <sub>2</sub>	nikotinamidadenindinukleotid redukovaný
NARP	neuropatie, ataxie, retinální pigmentóza
O stav	„open“ konformační stav
OSCP	oligomycin-sensitivity conferring protein
OXPPOS	oxidativní fosforylace
PCR	polymerázová řetězová reakce
PEP	fosfoenolpyruvát
PiC	fosfátový přenašeč
PK	pyruvátkináza
PVDF membrána	polyvinilidín-fluoridová membrána
ROS	volné kyslíkové intermediáty
<i>SDHA</i>	jaderný gen pro 70 kDa podjednotku komplexu II
<i>SDHB</i>	jaderný gen pro 30 kDa podjednotku komplexu II
SDS	dodecylsulfátsodný
SDS-PAGE	SDS-polyakrylamidová elektroforéza
shRNA	vlásečková RNA („small hairpin“)
TEMED	N, N, N', N', tetramethylethylendiamin
<i>TMEM70</i>	jaderný gen pro Tmem70p
TMH	transmembránový helix

# 1 Úvod

F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP syntáza patří do F-třídy tzv. ATPázových pump (Pedersen 2005). Jedná se o multiproteinový komplex, který se spolu s komplexy dýchacího řetězce ve vnitřní mitochondriální membráně účastní procesu oxidativní fosforylace. Její hlavní funkcí je fosforylace ADP za vzniku ATP, který je stěžejním substrátem pro průběh energicky závislých dějů v biologických systémech. Hnací silou pro katalýzu fosforylační reakce je komplexem V zpracovávaný protonový gradient vznikající v intermembránovém prostoru mitochondrií jako vedlejší produkt oxido-redukčních dějů dýchacího řetězce.

Její fyziologické oligomerní uspořádání přispívá k formaci vnitřní mitochondriální membrány (Minauro-Sanmiguel *et al.* 2005). Dimery F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP syntázy zakřivují membránu a indukují tvorbu krist, které významně zvětšují povrch membrány a tím i zvyšují účinnost oxidativní fosforylace. U kvasinek ovlivňuje správné sestavení ATP syntázy biogenezi a aktivitu komplexu IV (cytochrom-c-oxidázy) (Saddar *et al.* 2008). Mimo jiné se F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP syntáza také podílí na regulaci Ca<sup>2+</sup> metabolismu (Hubbard a McHugh 1996).

Poruchy mitochondriálního energetického metabolismu tvoří heterogenní skupinu dědičných onemocnění, které se manifestují vícečetným postižením hlavně energeticky náročných orgánů, tzn. CNS, srdce, kosterních svalů, jater. Mitochondriální onemocnění se vyskytují s incidencí 1:4000 (Schaefer *et al.* 2004). Nástup prvních klinických příznaků může být od prvních hodin života po dospělost. Jelikož neexistuje přímá souvislost mezi genotypem a fenotypovým projevem a jsou doprovázeny větším počtem nesouvisejících klinických příznaků, je jejich diagnostika obtížná. V Laboratoři pro studium mitochondriálních poruch Kliniky dětského a dorostového lékařství I.LF UK a VFN v Praze, která se zabývá diagnostikou mitochondriálních onemocnění, byl u více než 25 českých a slovenských rodin na molekulárně-genetické úrovni potvrzen deficit F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP syntázy, a u dalších více než 20 pacientů bylo vysloveno podezření na poruchu tohoto komplexu. Izolovaný deficit F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP syntázy představuje méně častou, ale velmi závažnou podskupinu mitochondriálních onemocnění s nástupem v časném novorozeneckém věku s velmi vážnou prognózou.

## 2 Cíle

Cílem diplomové práce bylo charakterizovat funkci a změny v rovnovážném množství  $F_1F_0$ -ATP syntázy jak v buněčných modelech deficitu tohoto komplexu, tak i v liniích kožních fibroblastů od pacientů s podezřením na deficit  $F_1F_0$ -ATP syntázy.

Specifickým cílem diplomové práce bylo:

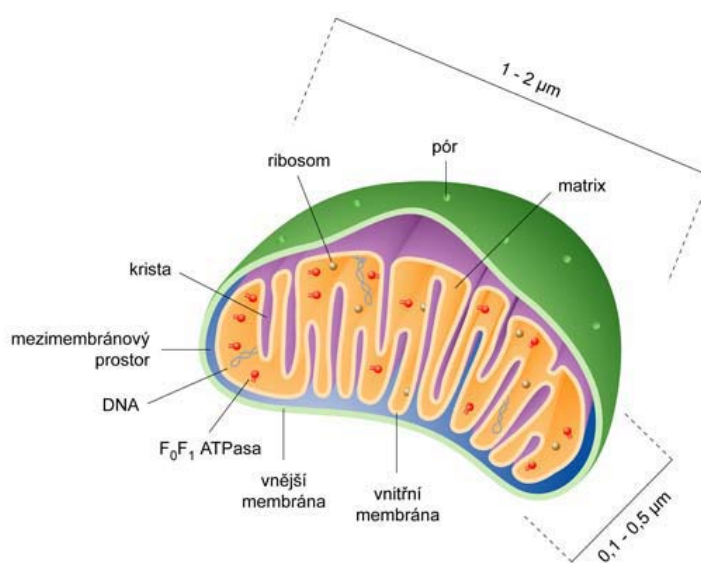
- 1) optimalizovat metodu pro stanovení ATP-hydrolytické aktivity  $F_1F_0$ -ATP syntázy v izolovaných mitochondriích z kultivovaných buněk
- 2) stanovit ATP-hydrolytickou aktivitu a rovnovážné množství  $F_1F_0$ -ATP syntázy v buňkách HEK293 se stabilně down-regulovanou expresí genu *TMEM70*
- 3) v buněčných liniích kožních fibroblastů od pacientů s podezřením na deficit  $F_1F_0$ -ATP syntázy:
  - a) stanovit oligomycin-senzitivní ATP-hydrolytickou aktivitu  $F_1F_0$ -ATP syntázy a enzymové aktivity komplexů dýchacího řetězce
  - b) stanovit rovnovážné množství komplexu  $F_1F_0$ -ATP syntázy a vybraných podjednotek komplexů OXPHOS
- 4) u pacientů se sníženou ATP-hydrolytickou aktivitou provést sekvenční analýzu mitochondriálně kódovaných genů *MT-ATP6* a *MT-ATP8*

## 3 Literární přehled

### 3.1 Stavba a funkce mitochondrií

Mitochondrie jsou buněčné organely, které byly objeveny v druhé polovině 19. století a jejich funkce byla pro vědce tajemstvím až do konce 20. století. Dnes se ví, že jsou nezbytnou součástí eukaryotické buňky a to nejen pro tvorbu energie ve formě ATP. Jsou ústřední organelou pro metabolismus aminokyselin, organických kyselin, mastných kyselin, porfyrinů, dusíkatých bazí a místem syntézy kreatinfosfátu, acetyl-CoA a prekurzorů glukoneogeneze. Přesto je schopnost produkce ATP jejich klíčovou funkcí, která ovlivňuje osud všech tkání. Neméně důležitou roli mají v procesu stárnutí a v průběhu buněčné apoptózy.

Mitochondrie mají většinou oválný tvar, s odlišnostmi v závislosti na druhu tkáně. Shlukují se do rozsáhlých dynamických retikulárních sítí. Jejich vnitřní prostředí – matrix oddělují od cytosolu dvě membrány, mezi kterými je intermembránový prostor. Vnější hladká membrána obsahuje porin, což je protein tvořící kanály, kterými mohou volně pronikat molekuly do 10 kDa (obr. 3.1). Membránovou selektivitu zajišťuje vnitřní zvrásněná membrána tvořící tzv. krysty, které značně zvětšují její povrch. Obsahuje lipid kardiolipin (difosfatidylglycerol), který zvyšuje nepropustnost pro protony. Ovlivňuje tak udržování protonového gradientu. Vnitřní membrána je velmi bohatá na proteiny, které tvoří 76% její celkové hmotnosti. Kotví v sobě řadu proteinů různých funkcí, ale její významnou součástí jsou zejména proteinové komplexy systému oxidativní fosforylace a mnohé transportéry regulující průchod nejen malých metabolitů, např. ATP, ADP, fosfátu a iontů, ale i bílkovin, které jsou z cytosolu směřovány do mitochondrií.



Obr. 3.1 Stavba mitochondrie ([http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_es-002/ebook.html?p=mitochondrie](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=mitochondrie))

### 3.2 Struktura lidské mitochondriální DNA

Mitochondriální DNA (mtDNA) byla poprvé objevena v roce 1963 (Nas a Nas 1963) a kompletně osekvenována až v roce 1981 (Anderson *et al.* 1981). Každá mitochondrie obsahuje 2 – 10 kopií tohoto extranukleárního genomu. Každá buňka obsahuje v závislosti na energetickém metabolismu i vyšší počet mitochondrií, počet kopií mtDNA proto v jedné buňce kolísá mezi 1,000 – 10,000 (Lightowlers *et al.* 1997).

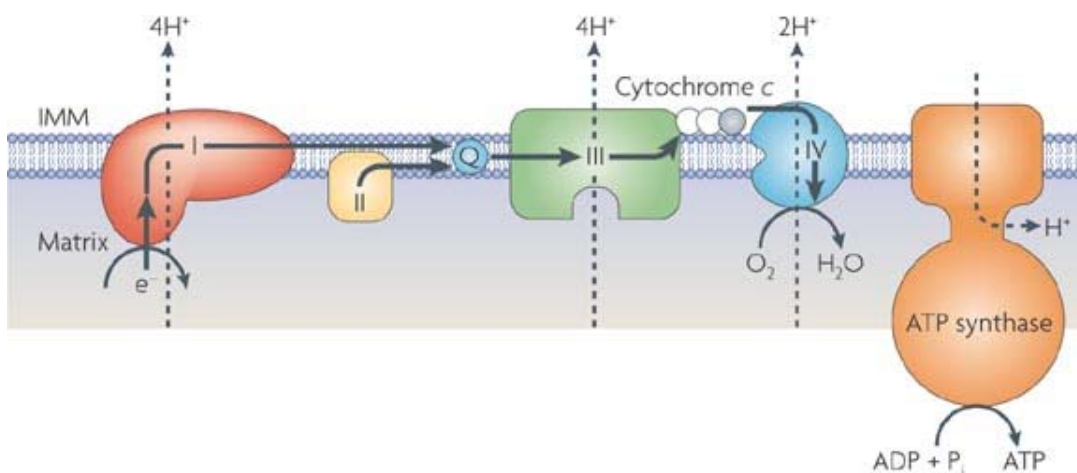
Jedná se o kruhovitou 16,569 bp velkou molekulu DNA, která je v matrix organizována do nukleoproteinových částic - nukleoidů (Chen a Butow 2005). Tato struktura je považována za segregaci jednotku během replikace (Garrido *et al.* 2003). mtDNA tvoří lehký a těžký řetězec, které se od sebe odlišují poměrem v zastoupení C-G párů. Těžký řetězec obsahuje více purinové báze guaninu a nachází se na něm také více genů oproti lehkému řetězci, který je bohatý na pyrimidinovou bázi cytosin. V mtDNA chybí introny, některé geny se i překrývají. Tato úsporná organizace způsobuje, že je genom výhradně z kódujících sekvencí. Výjimkou jsou D-smyčka a kontrolní region, které jsou důležité pro regulaci replikace i transkripce (Lightowlers *et al.* 1997). mtDNA kóduje 37 genů, 2 geny pro velkou (16S) a malou (12S) rRNA, 22 genů pro tRNA a 13 genů pro polypeptidy podjednotek systému OXPHOS (Clayton 1992). Téměř 95% proteinů, které jsou potřebné pro fungování mitochondrií, je kódováno jadernými geny. Mutace v jaderných genech pro podjednotky systému OXPHOS, pro faktory účastnící se biogeneze a regulace genové exprese mtDNA a mutace v samotné mtDNA vedou k mitochondriálním onemocněním.

U dědičnosti mtDNA se neuplatňuje klasický mendelovský typ, ale do dalších generací je předávána uniparentálně, výhradně po maternální linii. U myší byla pozorována přítomnost otcovské mtDNA v mitochondriích potomka, ale tato mtDNA není přenášena na další generace. Skutečnost, že je mitochondriální genom polyploidní, navozuje v případě existence mutace homoplasmii nebo heteroplasmii. Homoplasmie je stav, kdy jsou všechny přítomné mtDNA identické, normální či mutované. O heteroplasmii se jedná tehdy, kdy je populace mtDNA tvořena ze směsi normálních i mutovaných forem. Jelikož jsou mutace mtDNA recesivního charakteru, množství dané mutace musí překročit prahovou hodnotu, která vede k progresi klinických příznaků mitochondriálního onemocnění spojeného s biochemickými defekty.

### 3.3 Komplexy systému OXPHOS

Během běžného denního režimu je dospělým člověkem spotřebováno 40 kg ATP. Při množství nukleotidů 0,1 mol je potřeba, aby každá molekula ADP v těle byla fosforylována 1000x (Capaldi a Aggeler 2002). To je zajištěno systémem OXPHOS tvořeného proteinovými komplexy vnitřní mitochondriální membrány.

Během oxidace pyruvátu a mastných kyselin na vodu a oxid uhličitý vznikají redukované formy koenzymů NADH a FADH<sub>2</sub>, které dále předávají své elektrony komplexům dýchacího řetězce. Elektrony z NADH se dostávají přes komplex I (NADH:ubichinon-oxidoreduktáza) spolu s elektrony z FADH<sub>2</sub> přes komplex II (sukcinát:ubichinon reduktáza) na mobilní přenašeč koenzym Q (CoQ, ubichinon), který se tím redukuje na ubichinol (CoQH<sub>2</sub>). Ubichinol přenáší elektrony dále na komplex III (ubichinol:ferrocytochrom-c-oxidoreduktáza), ze kterého po jednom elektronu přecházejí na další přenašeč cytochrom c. Ten komunikuje s posledním komplexem dýchacího řetězce – komplexem IV (ferrocytochrom-c-O<sub>2</sub>-oxidoreduktáza), který elektrony předává na jejich konečný akceptor – O<sub>2</sub> (obr. 3.2). Díky existenci této kaskády nesplývají elektrony rovnou s molekulou kyslíku za jednorázového uvolnění energie ve formě tepla, ale při jejich pohybu z komplexu na komplex dochází k postupnému uvolňování energie využitelné k přenosu protonů z matrix do intermembránového prostoru, kde se hromadí ve formě protonového gradientu. Ten je odtud odčerpáván F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP syntázou, kterou je využíván k syntéze ATP.



Obr. 3.2 Schéma znázorňující komplexy OXPHOS ve vnitřní mitochondriální membráně (<http://www.scienceblogs.de/lindaunobel>).

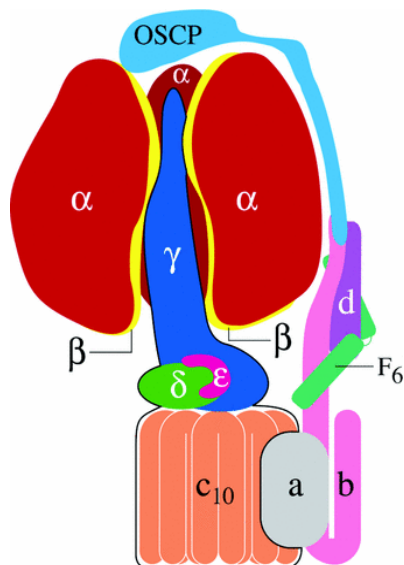


Komplexy oxidativní fosforylace jsou ve vnitřní mitochondriální membráně uspořádány do supramolekulárních struktur. Neplatí představa tzv. „tekutého modelu“, kde monomerní komplexy volně difundovaly v membráně a elektronový transport byl náhodným procesem. Koncepce dýchacího řetězce je různá, ale ústí ve vysoce strukturovaný superkomplex - „respirazóm“. Kdy je většina komplexu I v superkomplexu s dimerním komplexem III (I+III<sub>2</sub>). Komplex III bývá spojován s jedním či dvěma komplexy IV (III<sub>2</sub>+IV<sub>1,2</sub>). Nebo spolu interagují všechny tři komplexy I+III<sub>2</sub>+IV (Dudkina *et al.* 2008). Taková strategie uspořádání je výhodná pro účinnější průběh reakcí. Komplexy nejsou od sebe vzdáleny, může tak probíhat rychlý přenos substrátů a lze omezit únik nebezpečných reaktivních intermediátů, které by mohly reagovat s kyslíkem za vzniku volných kyslíkových radikálů (Fersht 1999). Oligomerní uspořádání je typické i pro komplex V (viz. kapitola 3.5.3).

### **3.4 Struktura F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP syntázy**

F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP syntáza (ATPáza, ATP syntáza, komplex V) má transmembránovou doménu F<sub>0</sub>, která je spojena s volnou matrixovou globulární doménou F<sub>1</sub> centrální stopkou dlouhou 90 Å. Globulární F<sub>1</sub> část vykazuje syntetickou katalytickou aktivitu. Po oddělení od F<sub>0</sub> domény si zachovává strukturní celistvost a ATP-hydrolytickou katalytickou aktivitu. F<sub>1</sub> – ATPáza je však chladově labilní.

Monomerní F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP syntáza o molekulové hmotnosti dosahující 600 kDa je tvořena z 16 pevně vázaných podjednotek v poměrovém zastoupení pro extramembránovou část F<sub>1</sub> α<sub>3</sub> : β<sub>3</sub> : γ : δ : ε : IF1 a pro membránově vázanou F<sub>0</sub> část a : b : c<sub>10</sub> : d : e : f : g : F6 : A6 : OSCP (obr. 3.3). Podjednotky faktor B, MLQ, DAPIT tvoří holoenzym ATP syntázy (Wittig a Schagger 2008).



Obr. 3.3 Model  $F_1F_0$ -ATP syntázy a znázorněné umístění jejich podjednotek (Gledhill a Walker 2006).

### 3.4.1 Stavba a funkce podjednotek F<sub>1</sub> – domény

Ve vodě rozpustná globulární F<sub>1</sub> – podjednotka má v průměru 100 Å a molekulovou hmotnost 371 kDa (Walker *et al.* 1985). Je složena z  $\alpha$ 3/ $\beta$ 3 podjednotek tvořící katalytická místa a z  $\gamma$ / $\delta$ / $\epsilon$  podjednotek tvořící helikální centrální stopku.

#### 3.4.1.1 $\alpha$ / $\beta$ – domény

Střídající se podjednotky  $\alpha$  a  $\beta$  obklopují přibližně čtvrtinu helikální  $\gamma$ -podjednotky. Katalytická místa enzymu jsou na rozhraních  $\alpha$ / $\beta$  podjednotek. Větší část tvoří  $\beta$ -podjednotky. Vytvářením různých interakcí s podjednotkou  $\gamma$  se mění katalytická specifita aktivních míst. F<sub>1</sub>-část ATP syntázy je tedy asymetrická a každá  $\beta$ -podjednotka spolu se sousední  $\alpha$ -podjednotkou zaujímají v daný moment jinou konformaci. Výchozí strukturu F<sub>1</sub> části ATP syntázy stanovil v roce 1994 Abrahams *et al.* Krystalizačními studii prokázali existenci tří možných konformačních stavů: O (z angl. open;  $\beta_E$ ) bez navázaného nukleotidu, L (z angl. loose;  $\beta_{DP}$ ) s navázaným ADP a anorganickým fosfátem, T (z angl. tight;  $\beta_{TP}$ ) s navázaným ATP. Bianchet *et al.* 1998, Menz *et al.* 2001 z krystalografických studií krysí  $F_1F_0$ -ATP syntázy zjistili existenci další možné konformace  $\beta$ -podjednotek - HC (z angl. hemi-closed;  $\beta_{HC}$ ) a tím získali plně obsazená katalytická místa.

Důvodem, proč jsou katalyticky aktivní  $\beta$ -podjednotky, je přítomnost důležitého aminokyselinového zbytku Glu 188 v nukleotid vazebné doméně. Aktivuje molekulu vody,

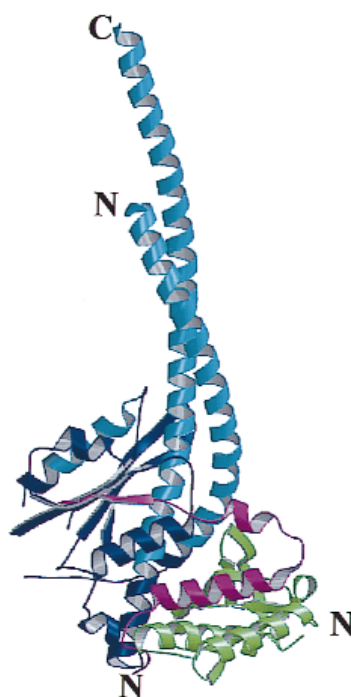
která iniciuje nukleofilní atak na terminální fosfát ATP. Ke stabilizaci vzniklého záporného náboje přispívá guanidiniová skupina Arg 373 podjednotky  $\alpha$ , také  $\beta$ -Lys 162 a  $\beta$ -Arg 189 (Kagawa *et al.* 2004). Podjednotky  $\alpha$  mají namísto Glu 188 Gln 208 odvracejícího se od  $\gamma$ -fosfátu (Abrahams *et al.* 1994). Struktura konformací  $\beta_{TP}$  a  $\beta_{DP}$  se zdá být na první pohled shodná, ale není tomu tak.  $\beta_{DP}$  je na rozdíl od  $\beta_{TP}$  právě tou katalyticky aktivní konformací. Nukleotid je na  $\alpha_{DP}/\beta_{DP}$  rozhraní daleko více zanořen (Kagawa *et al.* 2004) a  $\gamma$ -fosfát je tak blíže k interagujícím aminokyselinám účastníci se katalýzy (Bowler *et al.* 2007). Konformace  $\beta_E$  neváže nukleotid, jelikož v její nukleotid-vazebné doméně je přerušena důležitá interakce (Abrahams *et al.* 1994).

### 3.4.1.2 Centrální stopka

Centrální stopka tvořená podjednotkami  $\gamma$ ,  $\delta$  a  $\epsilon$  (obr. 3.4) sehrává v katalytické činnosti  $F_1F_0$ -ATP syntázy stěžejní roli. Její podjednotka  $\gamma$  spojuje hydrofilní matrixovou  $F_1$  doménu s transmembránovou  $F_0$  doménou. Spolu s  $c$ -kruhem  $F_0$  domény tvoří rotor enzymu, který se využíváním energie z protonového gradientu roztáčí a podjednotka  $\gamma$  procházející štěrbinou v hexameru  $\alpha/\beta$  podjednotek mění specifitu jejich katalytických míst. Schopnost rotace  $\gamma$ -podjednotky byla potvrzena zajímavým experimentem, kdy globulární část  $F_1$  domény byla upevněna k podkladu a ke  $\gamma$ -podjednotce bylo přichyceno fluorescenčně značené aktinové vlákno. V přítomnosti hydrolyzovatelného ATP byla mikroskopem pozorována rotace vlákna (Noji *et al.* 1997).

Vysoce konzervovaná  $\gamma$ -podjednotka je svými centrálními úseky polypeptidového řetězce spojena s  $c$ -kruhem a její N'- a C'-koncové  $\alpha$ -helixy vytvářejí antiparalelní „coiled coil“ strukturu interagující s N'-koncovými oblastmi aktivních center  $F_1$  domény. Přičemž C'-koncový helix vyčnívá nad  $F_1$  doménou (Abrahams *et al.* 1994).

Všechny tři podjednotky centrální stopky spolu interagují rozsáhlými oblastmi. Podjednotky  $\delta$  a  $\epsilon$  se váží do Rosmannova zářezu  $\gamma$ -podjednotky a zároveň interagují s  $c$ -kruhem. Také přispívají k přenosu energie z protonového gradientu z  $F_0$  do  $F_1$  části ATP syntázy (Gibbons *et al.* 2000).



**Obr. 3.4 Model centrální stopky.** Modře – podjednotka  $\gamma$  (tmavě modře jsou vyznačeny její dodatečně vykrytalizované oblasti), fialově – podjednotka  $\delta$ , zeleně – podjednotka  $\epsilon$  (Gibbons *et al.* 2000).

### 3.4.1.3 Inhibiční faktor 1 (IF1)

IF1 není strukturální podjednotkou  $F_1F_0$ -ATP syntázy, váže se na ni reverzibilně v závislosti na okolním pH. Za anaerobních podmínek svou vazbou brání konformačním změnám  $F_1$ -domény vedoucím k hydrolyze ATP. Aktivní forma IF1 při  $\text{pH} > 7,0$  tvoří dimery. Při vyšším pH se dimery shlukují v neaktivní tetramery (Cabezón *et al.* 2001). Dimery se formují přes své C'-koncové oblasti utvářejíc antiparalelní „coiled-coil“ interakce (Cabezón *et al.* 2000). N'-koncové segmenty s inhibiční aktivitou rozsáhle interagují s  $F_1$  částí ATP syntázy, hlavně v oblasti katalytických rozhraní  $\alpha_{\text{DP}}/\beta_{\text{DP}}$ . Stěžejními aminokyselinovými zbytky IF1 pro vazbu se záporně nabitým povrchem  $F_1$ -domény jsou při  $\text{pH} 6,5$  protonované histidiny. IF1 pravděpodobně interaguje v menší míře i s  $F_0$  sektorem přes postranní stopku (Cabezón *et al.* 2003). Za fyziologických podmínek se uplatňuje pouze interakce s postranní stopkou, což umožňuje dimerizaci  $F_1F_0$ -ATP syntázy bez inhibice její syntetické aktivity (viz. kap. 3.5.3).

#### 3.4.1.4 Katalytický mechanismus F<sub>1</sub>-domény

První navržený mechanismus, kterým F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP syntáza vykonává syntézu/hydrolyzu ATP, předpokládal tři různé konformace katalyticky aktivních  $\beta$ -podjednotek F<sub>1</sub>-domény, z nichž dvě jsou obsazeny nukleotidy  $\beta_{DP}$  (~ T stav) a  $\beta_{TP}$  (~ L stav) a  $\beta_E$  (~ O stav) konformace je neschopna vazby. Jde o tzv. dvoumístný katalytický mechanismus (Boyer 1993). Namísto dvoumístného katalytického mechanismu je pravděpodobnější mechanismus trojmístný díky existenci  $\beta_{HC}$ -konformace (~ HC stav). Jelikož zachycením ligandu (ADP+Pi/ATP)  $\beta_O$ -podjednotkou se v ní indukuje konformační změna na  $\beta_{HC}$ , která pevněji svírá nukleotid do doby, než se po energeticky-dependentním pootočení  $\gamma$ -podjednotky opět  $\beta$ -podjednotka změní tentokrát na výše afinní konformaci  $\beta_{DP}$ . Ve které dochází ke vzniku fosfoanhydridové vazby při syntéze ATP. Existencí pouze stavu O by bylo těžko představitelné, jakým způsobem by příchozí ligand tuto prodlevu přečkal (shrnuto v Leyva *et al.* 2003).

Specifitu vazebných míst  $\beta$ -podjednotek mění rotující  $\gamma$ -podjednotka, která nevykonává kontinuální 360° obrátku, ale postupné 120° kroky (Yasuda *et al.* 1998). Vysokorychlostním snímáním bylo zjištěno, že v každém 120° kroku lze rozlišit další dva 30° a 90° kroky, mezi nimiž je milisekundová prodleva. Dílčí kroky oddělují dvě dílčí reakce (Yasuda *et al.* 2001). Během 30° pootočení se změní konformace  $\beta$ -podjednotek z O na HC. HC je příhodný pro vázání nukleotidu, poté následuje 90° pootočení  $\gamma$ -podjednotky, který způsobí změnu HC na L stav. Výsledkem zbývajících dvou 120° pootočení je vznik či štěpení fosfoanhydridové vazby a uvolnění ATP, popř. ADP+Pi (shrnuto v Gao *et al.* 2005).

#### 3.4.2 Stavba a funkce podjednotek F<sub>0</sub>-domény

Podjednotka F<sub>0</sub> je transmembránovým motorem ATP syntázy, který přečerpává protony z intermembránového prostoru do matrix. Spolu s centrální stopkou F<sub>1</sub>-domény se roztáčí, což vede ke vzniku cyklických konformačních změn v jejích katalytických místech vedoucí k syntéze ATP. F<sub>0</sub> doména je tvořena 13 podjednotkami. Podjednotky *a*, *b*, *c* jsou vysoce konzervované ale zbývajících 9 podjednotek (*d*, *e*, *f*, *g*, F6, faktor B, A6L, OSCP, DAPIT, MLQ) nemá u výchozího prokaryontního typu F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP syntázy svého analoga. O funkcích nedávno objevených proteolipidů DAPIT a MLQ (Meyer *et al.* 2007) asociovaných s enzymovým komplexem se stále spekuluje.

### 3.4.2.1 Postranní stopka

Postranní stopka je tvořena čtyřmi podjednotkami *b*, *d*, F6, OSCP. Každá je zastoupena po jedné kopii (obr. 3.5). Obdobně jako centrální stopka spojuje F<sub>1</sub> a F<sub>O</sub> doménu ATPsyntázy. První snímky z elektronového mikroskopu ukázaly, že konturuje ATPsyntázu po její pravé straně (Karrasch a Walker 1999).

Na rozdíl od centrální stopky plní funkci statoru. Zabraňuje během syntézy či hydrolyzy ATP otáčení globulární části F<sub>1</sub>-podjednotky a pomáhá sladit činnost *c*-kruhu s nejčastěji dvanáctičetnou osou symetrie s F<sub>1</sub>-částí s trojčetnou osou symetrie (Weber 2007). Jelikož translokace 12 protonů přes F<sub>O</sub> kanál otočí *c*-kruh o 360°, zatímco rotace centrální stopky probíhá ve 120° krocích (Walker a Dickson 2006). V neposlední řadě zachovává integritu mezi *a* a *c*-podjednotkou (Dickson *et al.* 2006).



**Obr. 3.5 Model postranní stopky.** Růžově – podjednotka *b*, oranžově – podjednotka *d*, zeleně – podjednotka F6 (Dickson *et al.* 2006).

### 3.4.2.2 Podjednotka A6 (*a*-podjednotka)

Hydrofóbní *a*-podjednotka je tvořena z pěti helixů (TMH1-5) s pěti transmembránovými průniky, přičemž amino-konec každého helixu míří do intermembránového prostoru a karboxy-konec míří do matrix (Spannagel *et al.* 1998). Helixy 1 a 2 a helixy 3 a 4 jsou spojeny na matrixové straně 1-2 smyčkou, resp. 3-4 smyčkou. Smyčky jsou tvořené hlavně z pozitivně nabitých aminokyselinových zbytků a s velkou

pravděpodobností hrají roli v uvolnění prošlého protonu skrze Fo-kanál (Moore *et al.* 2008). Smyčky spojující TMH na opačné straně membrány jsou krátké a mají nenabitě aminokyselinové složení (Valiyaveetil a Fillingame 1998). Podobné uspořádání má i mitochondriální podjednotka A6L.

V THM4 u *E.coli* je vysoce konzervovaný kladně nabitý aminokyselinový zbytek Arg 210 (homolog u *H.sapiens* Arg 159), který je stěžejní pro protonovou translokaci.

### 3.4.2.3 *c*-oligomer

*c*-kruh je složen v závislosti na druhu organismu z různého počtu protomer (10-14), je v těsném spojení s centrální stopkou.

*c*-podjednotka (podjednotka 9) tvoří dvojitou kruhovitou strukturu ze dvou  $\alpha$ -helixů spojených smyčkou. N'-koncový  $\alpha$ -helix tvoří vnitřní kruh (*c*TMH1) a C'-koncový  $\alpha$ -helix vytváří vnější prohnutý kruh (*c*TMH2), ve kterém je obdobně jako u TMH4 podjednotky *a* důležitý aminokyselinový zbytek pro translokaci protonů. Jde o Asp 61 (homolog u *H.sapiens* Glu 58). *c*-kruh tvoří s *a*-podjednotkou hydrofilní polokanál pro průchod protonů. Pro zachování semipermeability membrány je střed *c*-kruhu pravděpodobně vyplněn fosfolipidy (Stock *et al.* 2000).

U savců byly objeveny tři izoformy podjednotky *c*, které se liší v mitochondriální cílové sekvenci. Aminokyselinová sekvence maturovaných proteinů je shodná. Z „knock-downových“ studií vyplývá, že každá izoforma plní před integrováním do membrány jinou funkci. Jsou tkáňově specifické a nejsou navzájem redundantní (Vives-Bauza *et al.* 2010).

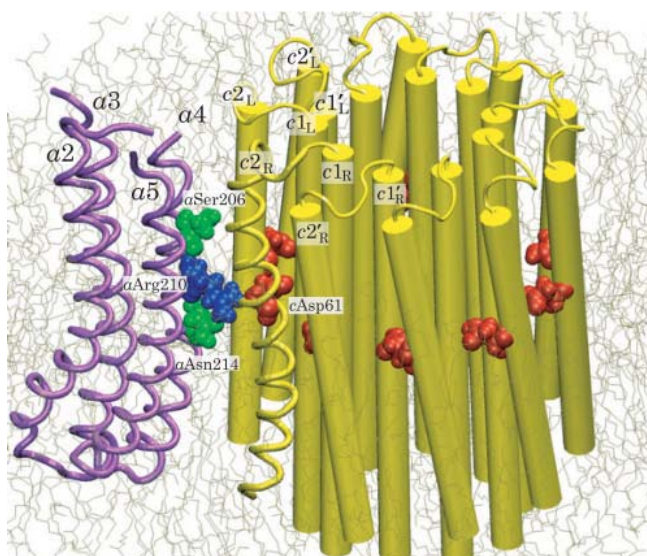
### 3.4.2.4 Faktor B

Faktor B je 22 kDa metalloprotein regulující membránový potenciál (Lee *et al.* 2008). V jeho nepřítomnosti bylo u speciálních submitochondriálních partikulí (vystavené amoniaku a EDTA při pH 8,8) prokázáno zrušení protonového gradientu v intermembránovém prostoru. V Fo sektoru pravděpodobně existuje ještě další možná cesta pro translokaci protonů, která není spřažena s činností sektoru F<sub>1</sub> (Belogradov a Hatefi 2002). Tato latentní cesta je za normálních podmínek blokována N'-terminálním helixem faktoru B a tvoří ji C'-koncové segmenty *e* a *f* podjednotek (Belogradov 2009). Přítomnost faktoru B je důležitým regulátorem pro spřažený stav mitochondrií.

### 3.4.2.5 Mechanismus rotace $F_0$ -sektoru $F_1F_0$ -ATP syntázy

Předpokladem pro průběh syntézy ATP je silný protonový gradient vytvořený sledem oxido-redukčních reakcí dýchacího řetězce v periplasmickém (popř. v mitochondriálním intermembránovém) prostoru. Proton-motivní síla pohání protony do cytoplasmy (popř. mitochondriální matrix) skrze hydrofilní kanál tvořený z polárních aminokyselinových postranních řetězců podjednotek  $a$  a  $c$ . Translokace protonu vyvolává konformační změny na rozhraní podjednotek  $a$  a  $c$ , které souvisí s rotací  $c$ -kruhu. Protože  $c$ -kruh rozsáhle interaguje s centrální stopkou, přenáší se kinetická energie také na ni. Otáčení centrální stopky způsobuje další konformační změny, tentokrát v katalytických místech  $F_1$ -domény.

Pro transport protonů  $F_0$ -sektorem je stěžejních několik polárních aminokyselinových zbytků:  $a$ Ser206,  $a$ Arg210,  $a$ Asn214 a  $c$ Asp61 jinak hydrofóbních podjednotek  $a$  a  $c$  (obr. 3.6). Utvářejí skrze membránu hydrofilní cestu protonu.  $a$ Asn214 je blíže k na  $H^+$  bohaté periplasmě (popř. intermembránovému prostoru).  $a$ Ser206 je poslední zastávkou protonu před uvolněním do cytoplasmy (popř. matrix) (Fillingame *et al.* 2002; Aksimentiev *et al.* 2004). Vzájemná poloha  $a$ Arg210 a  $c$ Asp61 rozhoduje o protonaci/deprotonaci  $c$ Asp61 a o samotném pohybu  $c$ -kruhu.



**Obr. 3.6 Hydrofilní rozhraní  $a/c$ -podjednotek.**  $F_0$ -doména tvořená TMH (2-5)  $a$ -podjednotky (fialově), cylindrickým  $c_{10}$ -oligomerem (žlutě). Znáznorněny kritické polární aminokyselinové zbytky  $a$ Arg210 (modře),  $c$ Asp61 každého  $c$ -protomeru (červeně) a  $a$ Asp214,  $a$ Ser206 (zeleně) tvořící vstup/výstup protonu do/z membránové části  $F_1F_0$ -ATP syntázy (Aksimentiev *et al.* 2004).

$c$ Asp61 je ve vnějším  $C'$ -helikálním transmembránovém segmentu ( $c$ TMH2) a je zanořen v membránové dvouvrstvě. V deprotonované formě má záporný náboj, kvůli kterému



je orientován do hydrofilního kanálu a je přístupný přichozímu protonu z *a*Asn214. V protonované formě je díky neutrálnímu náboji obrácen do hydrofóbního nitra protomeru *c*-kruhu a s navázaným protonem vykoná 360° obrátku. Po návratu do polárního prostředí se protonovaný *c*Asp61 dostává do nové pozice vůči *a*Arg210, jelikož podjednotka *a* indukuje 140° pootočení *c*TMH2. Mezi TMH2 *c*-protomeru a TMH4 *a*-podjednotky vznikají nové interakce přes vodíkové a van der Waalsovy vazby, které stabilizují protovanou konformaci (Rastogi a Girvin 1999). *a*Arg210 orientovaný k protonovanému *c*Asp61 snižuje jeho disociační konstantu pKa. Výsledkem je deprotonace *c*Asp61. Uvolněný proton přes *a*Ser206 pokračuje do cytoplazmy (popř.matrix). Deprotonace má za následek samotnou rotaci *c*-kruhu, jelikož dojde ke 30° pootočení. *c*Asp61 se opět odvrací od *a*Arg210, jeho pKa se zvyšuje a je připraven pro další reprotonaci (Fillingame *et al.* 2002).

### 3.5 Biogeneze $F_1F_0$ -ATP syntázy

Biogeneze vysoce strukturovaného enzymového komplexu  $F_1F_0$ -ATP syntázy je složitým dějem. Všechny strukturní podjednotky, vyjímaje mitochondriálně kódované podjednotky 6 a 8, jsou kódovány geny jadernými. Jejich N'-terminální oblasti obsahují mitochondriální cílovou sekvenci, jejímž prostřednictvím jsou nesbalené translatované proteiny z cytosolu transportovány do mitochondriální matrix. Po vstupu do matrix je cílová sekvence odštěpena proteázou a k jejich maturaci přispívají obecné chaperony (Hsp60, Hsp10) (Hendrick a Hartl 1993). K organizaci podjednotek enzymu do funkčního celku je nezbytná přítomnost konkrétních chaperonů vykazující vyšší specifitu na rozdíl od zmíněných heat shock proteinů.

Pro kvasinkový typ mitochondriální ATP syntázy byly nalezeny chaperony asistující u skládání jak  $F_1$  domény (Atp11p, Atp12p) (Ackerman a Tzagoloff 1990b), tak  $F_0$  domény (Atp10p (Ackerman a Tzagoloff 1990a), Atp22p (Helfenbein *et al.* 2003), Fmc1p (Lefebvre-Legendre *et al.* 2001), Atp23p (Zeng *et al.* 2007)). U savčí ATP syntázy byly popsány pouze konzervované  $F_1$ -specifické chaperonové proteiny Atp11p (lidský homolog Atpaf1p) a Atp12p (lidský homolog Atpaf2p) (Wang *et al.* 2001). U obratlovců se existence podobných proteinů specifických pro  $F_0$  část zatím přímo neprokázala. Možným kandidátem by mohla být metalloproteáza Atp23p s chaperonovou aktivitou. Ta u kvasinek maturuje podjednotku *a* a zároveň napomáhá spolu s Atp10p její asociaci s *c*-oligomerem. Obdobně by mohl Atp23p fungovat také u savců, vyjma uplatnění proteolytické aktivity, jelikož savčí podjednotka *a*

není syntetizována jako prekurzor. Protein Atp23p je u kvasinek kódován jaderným genem ATP23, který je u *Eukaryot* konzervován a má savčí homology (Zeng *et al.* 2007).

V roce 2008 byl popsán protein Tmem70 kódovaný jaderným genem *TMEM70*. Tento 30 kDa protein obsahuje konzervovanou doménu DUF1301 a dva transmembránové úseky. Gen *TMEM70* je typický pro mnohobuněčná *Eukaryota* a rostliny, u kvasinek a hub nalezen nebyl. Jeho poškození vede k výraznému snížení množství komplexu F<sub>1</sub>F<sub>O</sub>-ATP syntázy. To je doprovázeno ztrátou hydrolytické a syntetické aktivity enzymu, zatímco množství jednotlivých podjednotek zůstává nezměněné. Komplementační experimenty s nemutovanou formou genu *TMEM70* u buněčných linií od pacientů s mutací v genu *TMEM70* vedly k nárůstu rovnovážného množství komplexu F<sub>1</sub>F<sub>O</sub>-ATP syntázy, stejně tak i ATP-hydrolytické a syntetické aktivity v buňkách. Proto je Tmem70p označován jako další regulátor v dráze biogeneze ATP syntázy (Čížková *et al.* 2008). Prozatím není jasné, ve kterém kroku maturace proteinového komplexu F<sub>1</sub>F<sub>O</sub>-ATP syntázy působí, ale pravděpodobně to bude na úrovni skládání F<sub>1</sub>-domény či později při asociaci F<sub>1</sub>-domény s některými podjednotkami F<sub>O</sub>-domény (Houštěk *et al.* 2009).

### 3.5.1 Organizace F<sub>1</sub> domény

F<sub>1</sub> doména je tvořena pěti podjednotkami  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  (viz. kap. 3.4.1). Organizace globulární části F<sub>1</sub> domény do hexamerního uspořádání střídajících se podjednotek  $\alpha$  a  $\beta$  je u *Eukaryot* schopných oxidativní fosforylace konzervovaným procesem. Hlavní roli během tohoto děje hrají chaperonové proteiny Atpaf1 a Atpaf2 (Wang *et al.* 2001).

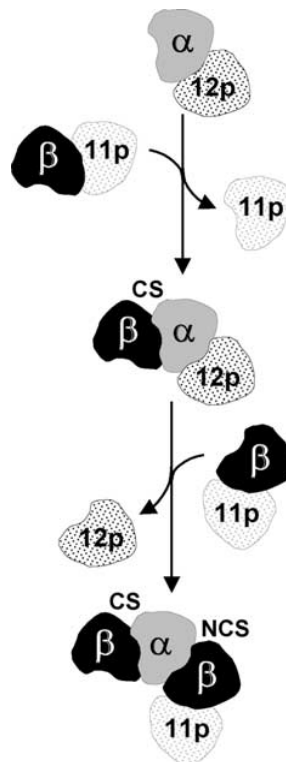
#### 3.5.1.1 Funkce chaperonových proteinů Atp11p (Atpaf1) a Atp12p (Atpaf2)

Atp11p a Atp12p jsou proteinové produkty jaderných genů *ATPAF1* a *ATPAF2*. Jejich N'-konec tedy obsahuje cílovou mitochondriální sekvenci, která je směřuje do matrix. Jsou přítomny u většiny *Eukaryot* a exprimovány v řadě tkání (Pícková *et al.* 2005). Díky tomu se řadí mezi tzv. „housekeeping“ proteiny (Wang *et al.* 2001). Atp12p byl nalezen i u prokaryot, u volně žijících  $\alpha$ -proteobakterií. Tato skutečnost podporuje endosymbiotickou teorii a prokaryotní minulost mitochondrií (Timmis *et al.* 2004).

Vytvoření kvasinkových mutant s deletovanými geny pro Atp11p a Atp12p objasnily funkci těchto proteinů. U deletovaných kmenů se objevil jednotný fenotyp, kdy se v matrix hromadily nerozpustné agregáty  $\alpha$ , resp.  $\beta$ -podjednotek. Atp11p a Atp12p předcházejí těmto neproduktivním spojením vazbou na tyto podjednotky. Atp11p je specifický pro  $\beta$ -

podjednotky (Wang a Ackerman 2000), zatímco Atp12p váže  $\alpha$ -podjednotky (Wang *et al.* 2000). Koncentrace obou proteinů (Atpaf1, Atpaf2) je v matrix nízká, téměř 100x nižší ve srovnání s množstvím  $\alpha$  a  $\beta$  podjednotek. Ale je srovnatelná s množstvím volných podjednotek  $F_1$  domény, tím se zabraňuje hromadění volných forem podjednotek  $\alpha$  a  $\beta$  v matrix. Ty existují buď ve vzájemném oligomerním uspořádání nebo v komplexu s proteiny Atpaf1, Atpaf2 (Hinton *et al.* 2004). Chaperony se jako monomery váží do nukleotid-vazebných domén  $\alpha$  a  $\beta$  podjednotek. Funkční doména Atpaf proteinů je blíže C'-konci, N'-koncová část je důležitá pro jejich stabilitu. Funkční doména je, jak prokázala studie s fluorescenční barvou bis-ANS vázající se specificky na hydrofóbní úseky proteinů, z nepolárních aminokyselin (Sheluhov a Ackerman 2001). Atpaf proteiny zakrývají přes hydrofóbní interakce konkrétní sekvence aminokyselin, kterými by podjednotky  $\alpha$  a  $\beta$  tvořily nesmyslná spojení ( $\alpha/\alpha$  či  $\beta/\beta$ ).

Při skládání globulární části  $F_1$  domény do oligomerního hexameru tvořeného ze střídajících se  $\alpha$  a  $\beta$  podjednotek se mezi nimi utváří tři katalytická a tři nekatalytická místa. Ke vzniku katalytického rozhraní vede výměna Atpaf1 za podjednotku  $\alpha$  v komplexu  $\beta/\text{Atpaf1}$ . Výměnou Atpaf2 za podjednotku  $\beta$  v komplexu  $\alpha/\text{Atpaf2}$  vzniká nekatalytické rozhraní (Ackerman 2002) (obr. 3.7). Tento proces iniciuje  $\gamma$ -podjednotka, jejíž „coiled-coil“ helikální část nořící se posléze do  $F_1$  domény se nápadně podobá C'-koncovému helikálnímu úseku Atpaf2.  $\gamma$ -podjednotka pravděpodobně vytěsňuje Atpaf2 z heterodimeru tvořeného s  $\alpha$ -podjednotkou (Ludlam *et al.* 2009). Každá  $\alpha$ -podjednotka tedy interaguje se dvěma  $\beta$ -podjednotkami. Stejně tak každá  $\beta$ -podjednotka je v kontaktu se dvěma podjednotkami  $\alpha$ .



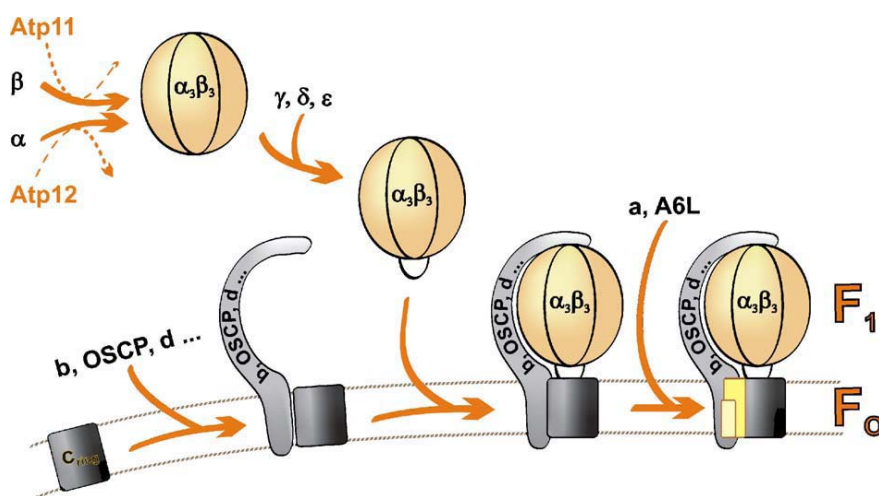
**Obr. 3.7** Tvorba katalytických a nekatalytických míst v globulární části F<sub>1</sub>-domény přičiněním F<sub>1</sub>-specifických chaperónů Atpaf1p a Atpaf2p. CS-katalytické místo, NCS-nekatalytické místo (Ackerman a Tzagoloff 2005).

Asymetrii katalytických a nekatalytických rozhraní vysvětlují různé naměřené hodnoty vazebných energií mezi jednotlivými  $\alpha$  a  $\beta$  podjednotkami a v rámci jejich Atpaf-vazebných míst. Rozdílné aminokyselinové složení těchto oblastí přispívá odlišnou mírou k intenzitě hydrofóbních a elektrostatických interakcí. Větší intenzita hydrofóbních vazeb byla naměřena v Atpaf1-vazebném místě  $\beta$ -podjednotky, které přispívá ke vzniku katalytického místa (Wang a Ackerman 2000). Změřením elektrostatických potenciálů  $\alpha$  a  $\beta$ -podjednotek byl zjištěn celkový kladný náboj  $\alpha$ -podjednotky a záporný náboj  $\beta$ -podjednotky. Tato vzájemná přitažlivost přes elektrostatické interakce hraje pro formaci F<sub>1</sub> domény neméně důležitou roli (Ludlam *et al.* 2009).

### 3.5.2 Sestavení kompletní F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP syntázy

Skládání F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP syntázy probíhá přes tvorbu dvou intermediátů (obr. 3.8). Prvním meziproduktem je F<sub>1</sub> doména sestavená z podjednotek  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ . Druhým meziproduktem (V\*) je komplex tvořený z F<sub>1</sub> části a nekompletní F<sub>0</sub> domény obsahující c-kruh a podjednotky postranní stopky *b*, F6 a OSCP. Na závěr se připojují mitochondriálně kódované podjednotky *a* a A6L. Pokud jsou však geny těchto podjednotek mutovány nebo je mitochondriální

translace inhibována a ke skompletování enzymového komplexu ATPsyntázy podjednotky  $a$  a A6L chybí, hromadí se ve vnitřní mitochondriální membráně nefunkční  $F_1F_0$ -ATPsyntáza ve formě meziprojektu  $V^*$  (Nijtmans *et al.* 1995).

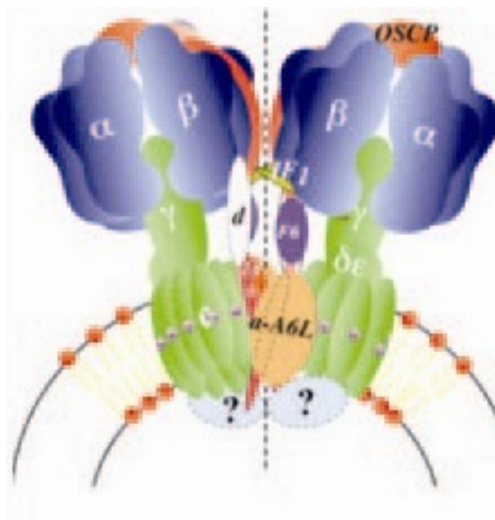


**Obr. 3.8 Model sekvenačního procesu skládání  $F_1F_0$ -ATPsyntázy.** Účast Atpaf1 a Atpaf2 u formace  $F_1$ -domény v raných fázích biogeneze, skompletování  $F_1$ -domény s nedokončenou  $F_0$ -doménou, v závěrečném kroku příchod mitochondriálně kódovaných podjednotek  $a$  a A6L (Houštěk *et al.* 2006)

### 3.5.3 Oligomerní uspořádání $F_1F_0$ -ATPsyntázy

$F_1F_0$ -ATPsyntáza se nevyskytuje jako monomer, ale utváří dimerní a vyšší oligomerní uspořádání ( $V_2$ - $V_6$ ). V roce 1998 Arnold *et al.* charakterizovali pomocí BN-PAGE dimerní uspořádání u kvasinkové  $F_1F_0$ -ATPsyntázy. V roce 2000 Schagger a Pfeiffer potvrdili existenci dimeru také u savčí ATPsyntázy. Monomery tvořící dimer z větší části interagují svými transmembránovými  $F_0$ -doménami, zatímco  $F_1$ -domény jsou od sebe více vzdálené, ale i tak jsou spojené přes IF1. Vzniká struktura kónického tvaru s úhlem  $40^\circ$  (Minauro-Sanmiguel *et al.* 2005), která zakřivuje vnitřní mitochondriální membránu (obr. 3.9). Polymerace těchto dimerů deformuje membránu do tubulárních útvarů - krist. Proto má oligomerní ATPsyntáza ( $V_2$ - $V_6$ ) vliv i na samotnou biogenezi vnitřní mitochondriální membrány. Chybí-li u kvasinek dimer-specifické podjednotky  $e$  a  $g$  a je znemožněno supramolekulární uspořádání  $F_1F_0$ -ATPsyntázy, lze pozorovat namísto zvrásněných krist pouhé koncentrické uspořádání membrány (Paumard *et al.* 2002). U takových mutant nejsou snižené aktivity komplexů systému OXPHOS ani není rozprávena oxidativní fosforylace. Membrána se však stává „tekutější“ a více propustnou. Pozměněným rozmístěním jednotlivých komplexů a dalších přenašečů (ATP/ADP, Pi) vůči sobě je mezi nimi narušena

kooperativita, účinná výměna substrátů vedoucí k redukci elektronového transferu, která ústí ve snížení membránového potenciálu (Bornhrov *et al.* 2006).



**Obr. 3.9 Model dimerního uspořádání F<sub>1</sub>F<sub>o</sub>-ATP syntázy.** Znázorněny známé podjednotky F<sub>1</sub> a F<sub>o</sub>-domén, otazníky poukázáno na možnou existenci zatím neznámých dimer-specifických podjednotek (Minauro-Sanmiguel *et al.* 2005).

Dimerní superkomplexy F<sub>1</sub>F<sub>o</sub>-ATP syntázy jsou katalycky aktivní (Krause *et al.* 2005) a jsou sestaveny do ~ 1 μm dlouhých dvojitéch řad na vrcholcích krist. To odpovídá přibližně 80 dimerů ATP syntázy seřazených za sebou. V kristách se koncentruje i většina komplexů dýchacího řetězce (I-IV). Lze hovořit o „mikrodoménách oxidativní fosforylace“. Naměřením silného elektrického pole a rozdílného pH až o půl jednotky v deformovaných oblastech vnitřní mitochondriální membrány vyplývá, že kristy fungují jako protonové pastě. Poloha dimerů F<sub>1</sub>F<sub>o</sub>-ATP syntázy má pozitivní vliv na produkci ATP (Strauss *et al.* 2008).

Podjednotky, kvůli kterým k dimerizaci dochází v transmembránové oblasti F<sub>o</sub>-domén, jsou známé u kvasinek, ale u savčí ATP syntázy se o nich stále spekuluje. Jelikož savčí homology kvasinkových dimer-specifických podjednotek *e* a *g* spojují u savčího typu enzymu dva dimery v tetramer. Působí u savců na vyšším stupni oligomerizace (Wittig a Schagger 2008). Jejich C'-koncové helikální úseky, které jsou orientovány do intermembránového prostoru, mohou homo- či heterooligomerizovat (*e/e*, *g/g*, resp. *e/g*) (Everard-Gigot *et al.* 2005). Jasnější se zdá být stabilizace dimeru F<sub>1</sub>F<sub>o</sub>-ATP syntázy pomocí IF1 v oblasti F<sub>1</sub>-domén. IF1 působí jako fyziologický regulátor syntézy ATP. Váže se na α/β-podjednotky dvěma různými interakcemi, které mají inhibiční či aktivační efekt na produkci ATP. V obou případech IF1 stále spojuje dvě F<sub>1</sub>-podjednotky ATP syntázy v dimerním uspořádání. V nepřítomnosti protonového gradientu se IF1 svým N'-koncem váže na rozhraní

podjednotek  $\alpha/\beta/\gamma$  a znemožňuje tak rotaci centrální stopky a průběh cyklických změn v katalytických místech  $F_1$ -domény. Po znovuoobnovení protonového gradientu se inhibiční interakce přes N'-konec zruší, probíhá syntéza ATP a IF1 dále stabilizuje dimer přes vazbu s OSCP. K matrixovému rozhraní dimerů ATPsyntáz také přispívají i podjednotky postranní stopky (shrnuto v Garcia-Trejo a Morales-Rios 2008)

K vyššímu supramolekulárnímu uspořádání  $F_1F_0$ -ATPsyntázy pravděpodobně přispívají podjednotky *e, f, g, A6L* (podjednotka 8) a transmembránové helixy podjednotky *a* (Wittig a Schagger 2008). Dalšími kandidáty jsou přenašeče pro fosfát ( $P_iC$ ) a pro výměnu ADP/ATP (ANT), se kterými v kristách vnitřní mitochondriální membrány tvoří specializované superkomplexy ATPsyntazómy (Chen *et al.* 2004).

### **3.6 Defekty mitochondriální $F_1F_0$ -ATPsyntázy**

Mitochondriální onemocnění představují širokou škálu heterogenních poruch. Při kterých mohou být poškozeny nejen komplexy systému oxidativní fosforylace, ale další metabolické dráhy jako je metabolismus pyruvátu, Krebsův cyklus, oxidace mastných kyselin. Ale pouze komplexy dýchacího řetězce spolu s  $F_1F_0$ -ATPsyntázou jsou pod kontrolou dvou genomických DNA, jadernou a mitochondriální. U jaderných mutací se uplatňuje mendelovský typ dědičnosti, zatímco u mutací v mitochondriální DNA (mtDNA) jsou poruchy děděny po maternální linii. Existuje však výjimka jedné popsané mutace v genu *ND2* u komplexu I, která pocházela z otcovské mtDNA (Schwartz a Vissing 2002).

Poruchy  $F_1F_0$ -ATPsyntázy přímo ovlivňují produkci ATP, které musí pokrýt energeticky náročné potřeby buňky. Proto se manifestují hlavně v dětském věku neurodegenerativními či myopatickými změnami organismu, které mohou být i neslučitelné se životem. Kvantitativní defekty způsobené mutacemi v jaderných genech pro biogenetické faktory a kvalitativní defekty zapříčiněné mutacemi ve strukturních genech ATPsyntázy zasahují biogenezi a funkci tohoto enzymu. Typická je pro oba defekty neschopnost plně využívat protonový gradient vedoucí k nárůstu membránového potenciálu a následné tvorbě devastujících volných kyslíkových radikálů (Korshunov *et al.* 1997).

#### **3.6.1 Mutace ve strukturních genech $F_1F_0$ -ATPsyntázy**

Navzdory většině podjednotek  $F_1F_0$ -ATPsyntázy kódovaných jadernými geny, byly mutace vztahující se ke strukturním genům donedávna popisovány pouze v mtDNA.

V letošním roce 2010 se Mayr *et al.* podařilo identifikovat první mutaci v jaderném strukturním genu *ATP5E* kódující podjednotku  $\epsilon$ , která má destabilizační vliv na centrální stopku, potažmo celou  $F_1$ -doménu ATPsyntázy. Mutace v mitochondriálních genech *MT-ATP6* a *MT-ATP8* postihují funkce podjednotky *a* (podjednotka 6), resp. podjednotky A6L (podjednotka 8) a tedy činnost  $F_0$ -domény ATPsyntázy.

### 3.6.1.1 Gen *ATP5E*

Gen *ATP5E* kóduje strukturní podjednotku  $F_1F_0$ -ATPsyntázy - podjednotku  $\epsilon$ , která spolu s podjednotkou  $\delta$  tvoří patu centrální stopky  $F_1$ -domény, která strukturu stabilizuje (Gibbons *et al.* 2000).

Homozygotní missense mutace c.35A>G ve druhém exonu způsobuje záměnu Tyr12 za Cys. Je jedním z konzervovaných aminokyselinových zbytků, přes které podjednotka  $\epsilon$  interaguje s  $\delta$ -podjednotkou. Hydrolytická i syntetická aktivita ATPsyntázy jsou sníženy o 60-70%. Klinickými příznaky je laktátová acidóza, 3-metylglutakonátová acidurie, lehká mentální retardace, postižení periferního nervstva.

Zajímavý úkaz, který doprovází tuto mutaci, je hromadění agregátů *c*-podjednotek, které nejsou sestaveny do *c*-oligomeru. Funkce  $\epsilon$ -podjednotky není zatím jasná.  $\epsilon$ -podjednotka je pravděpodobně důležitá při dokončení a stabilizaci  $F_1$ -domény, která až poté může asociovat s podjednotky  $F_0$ -domény, tzn. i s *c*-podjednotkami (Mayr *et al.* 2010).

### 3.6.1.2 Gen *MT-ATP6*

V genu pro *MT-ATP6* bylo popsáno osm patogenních mutací (Wong 2007). 2 bp mikrodělece a sedm bodových mutací, které se ve většině shodují záměnou nepolárního nenabitého leucinu za nepolární prolin či nabitý arginin. Obě aminokyseliny zasahují konzervovanou strukturu podjednotky *a*. Prolinový zbytek může svým postranním řetězcem narušovat helikální uspořádání a arginin svým kladným nábojem ovlivňuje konzervované interakce v transmembránových helixech podjednotky *a*. Jde spíše o heteroplasmické mutace, které při nižších hodnotách heteroplasmie (80-90%) progredují v NARP syndrom (Neuropatie, Ataxie, Retinální Pigmentóza) či v bilaterální stritální neuropatii (BSN) a při vyšším zastoupení mutované mtDNA blížící se homoplasmii dochází u pacientů k rozvoji vážnější neurologické poruchy - Leighův syndrom (MILS).



### 9205ΔTA

Čtecí rámeček genu *MT-ATP6* se částečně překrývá na 5'-konci s genem *MT-ATP8* a na 3'-konci sousedí s genem *MT-COX3*. Za normálních okolností vznikají bicistronní *ATP8/ATP6* a monocistronní transkripty *COX3*, které jsou dále posttranskripčně upravovány. 2 bp mikrolece v pozici 9205ΔTA narušuje STOP kodón genu *MT-ATP6* a štěpné místo, ve kterém dochází k oddělení mRNA pro *ATP6* a *COX3*. Vznikají tak nesmyslné tricistronní transkripty *ATP8/ATP6/COX3*, které jsou degradovány. Vlivem mutace nedochází k produkci podjednotky *a*.  $F_1F_0$ -ATP syntáza je neschopna syntézy ATP, ale hydrolytická aktivita je zachována. Zasažena je také aktivita cytochrom-c-oxidázy. Pacienti trpí laktátovou acidózou, neurologickým postižením (Ješina *et al.* 2004).

Skupinou Seneca *et al.* byl studován jiný pacient se stejnou homoplasmickou mutací, u kterého provedená biochemická měření korelovala s nezávažnými klinickými příznaky doprovázené laktátovou acidózou (Seneca *et al.* 1996).

Rozdíly mezi nimi byly nalezeny na úrovni sekvence mtDNA. U obou případů byly přítomny různé polymorfismy a oba pacienti patřili do jiné skupiny haplotypů. Změnu fenotypu ve druhém případě mohl způsobit kompenzační mechanismus fungující nejspíše na úrovni posttranskripčních úprav a translace (Ješina *et al.* 2004). Existence podobných mechanismů byla popsána již v několika případech (El Meziane *et al.* 1998; Hao *et al.* 1999).

### 8993T>C/G

Tymin v pozici 8993 je nejčastěji mutovaným nukleotidem genu *MT-ATP6*. V polypeptidu podjednotky *a* je zaměněn konzervovaný Leu 156 za Arg (8993T>G) či za Pro (8993T>C). Jejich fenotypový projev se odvíjí od míry heteroplasmie, která je tkáňově specifická. Pokud je mutovaná mtDNA přítomna v 70-90%, pak pacienti trpí NARP syndromem (Holt *et al.* 1990). Zastoupení mutace s vyšší frekvencí (> 90%) způsobuje u pacientů vážnější neurologické onemocnění Leighův syndrom (MILS) (Tatuch a Robinson 1993). Těžší průběh nemoci způsobuje 8993T>G. Zde je pokles syntézy ATP o 60%, oproti 25% v případě transice 8993T>C. Mutovaná podjednotka *a* neovlivňuje intaktnost samotné  $F_1F_0$ -ATP syntázy, ani dimerní a vyšší oligomerní uspořádání enzymu. Detekované navýšení oligomerizace u cybridů s L156R může být chápáno jako druh kompenzace vůči mutaci, kdy je oligomerní komplex více stabilní a zdánlivě schopný účinnější syntézy ATP (Cortes-Hernandez *et al.* 2007). Mutace v obou případech způsobují funkční zásah do činnosti  $F_0$ -

sektoru, jelikož zasahují vysoce konzervovanou strukturu helixů podjednotky *a* tvořící hydrofilní kanál pro postup protonů skrze vnitřní mitochondriální membránu. Zaměněný Arg 156 svým kladným postranním řetězcem nepřekáží důležitému aminokyselinovému zbytku Arg159 směřovat protony na opačnou stranu membrány, ale interferuje s rotací *c*-kruhu (Schon *et al.* 2001; Sgarbi *et al.* 2006).

#### 9176T>C/G

Mutace 9176T>C a 9176T>G jsou doprovázeny záměnou Leu 217 za Pro, resp. Arg. Mají mnoho společného s výše zmíněnými mutacemi 8993T>C/G. Jelikož jsou zaměňovány stejné aminokyseliny, dochází k obdobnému průběhu blokace otáčení *c*-oligomeru. Hydrolyza i syntéza ATP probíhá na velmi nízké úrovni. Mutace nemá vliv na biogenezi ATPsyntázy (Carrozzo *et al.* 2000). Klinický projev opět závisí na množství mutované formy mtDNA. 9176T>C je doprovázena bilaterální striatální neuropatií či Leighovým syndromem (Campos *et al.* 1997). U 9176T>G byly popsány případy s NARP syndromem a také výskyt vážnějšího Leighova syndromu (Carrozzo *et al.* 2001).

#### 8851T>C

Tato bodová mutace vede k záměně konzervovaného Trp 109 za Arg. Jejím fenotypovým projevem je oboustranná striatální neuropatie (De Meirleir *et al.* 1995).

#### 9185T>C, 9191T>C

Při těchto heteroplasmických mutacích dochází k substituci vysoce konzervovaného Leu za Pro (L220P, resp. L222P) v pátém transmembránovém helixu (TMH5) podjednotky *a*, stěžejním pro protonovou translokaci. Schopnost syntézy ATP je nepoznamenána, zatímco je snížena hydrolytická aktivita. U pacientů s heteroplasmii nad 90% progreduje v Leighův syndrom (Castagna *et al.* 2007).

### **3.6.1.3 Gen *MT-ATP8***

Prozatím byla popsána jediná mutace genu *MT-ATP8*. Jde o homoplasmickou nonsense mutaci 8529G>A, která postihuje konzervovanou C'-koncovou doménu podjednotky 8. Fenotypově se projevuje hypertrofickou kardiomyopatií a neuropatií. Naměřená hydrolytická aktivita není ovlivněna přidáním inhibitoru protonové translokace oligomycinu, což naznačuje, že F<sub>1</sub> s F<sub>0</sub> spolu tvoří intaktní komplex ATPsyntázy. Analyzované imunoblotty potvrzují přítomnost subkomplexů, velmi snížené množství

monomerní  $F_1F_0$ -ATP syntázy a nulové zastoupení dimerního komplexu V (Jonckheere *et al.* 2008). Jelikož podjednotka 8 pravděpodobně ovlivňuje integraci podjednotky  $\alpha$  do  $F_0$ -transmembránové části, pak mutace v genu *MT-ATP8* zasahuje jak do činnosti  $F_0$ -sektoru (protonová translokace, rotace), tak do biogeneze ATP syntázy.

### 3.6.2 Mutace v genech pro faktory biogeneze $F_1F_0$ -ATP syntázy

Jedná se o mutace v jaderných genech  $F_1F_0$ -ATP syntázy, které jsou spojovány s tzv. kvantitativními defekty. Jelikož se jedná o mutace v genech kódující biogenetické faktory Atp12p a Tmem70p, je pro tyto defekty typický snížený obsah funkční složky  $F_1F_0$ -ATP syntázy ve vnitřní mitochondriální membráně. Popsané jaderné mutace společně doprovází výrazně nízká produkce ATP a u pacientů je shodným klinickým nálezem naopak nápadně zvýšená hladina laktátu v tělních tekutinách, která může napomoci v diagnostice defektu.

#### 3.6.2.1 Gen *ATPAF2* (*ATP12*)

Byla popsána homozygotní mutace T>A, která ústí v záměnu Trp 94 za Arg. Neutrální Trp sousedí s vysoce konzervovaným Gln a přítomnost nového kladně nabitého Arg pravděpodobně narušuje aktivitu proteinu Atpaf2. Mutovaný Atpaf2 není schopný vyvazovat příchozí podjednotky  $\alpha$  do matrix, zabraňovat jejich agregaci a asistovat u skládání  $F_1$ -domény v biogenetické dráze  $F_1F_0$ -ATP syntázy. Pacienti mají nízký obsah tohoto enzymu, jehož katalytická aktivita je snížena na 30%. Společným klinickým projevem tohoto defektu je nápadně vysoká hladina laktátu, 3-metylglutakonátová acidurie (De Meirleir *et al.* 2004).

#### 3.6.2.2 Gen *TMEM70*

V genu *TMEM70* byla detekována homozygotní mutace c.317-2A>G, která zapříčiňuje nesprávný průběh sestřihu transkriptu. Vzniklý transkript je záhy degradován. V jednom případě byla popsána heterozygotní varianta mutace c.118\_119insGT způsobující vznik zkráceného polypeptidu. V obou typech mutací je protein Tmem70 nefunkční a chybí u sestavování  $F_1F_0$ -ATP syntázy. Pacienti mají rozpadlý enzymový komplex neschopný syntézy ATP a vykazují vysokou hladinu laktátu a dalších metabolitů (amoniak, 3-metylglutakonátu), vážnou svalovou hypotonii, hypertrofickou kardiomyopatii. U chlapců nemusejí sestoupit

varlata. Zmíněné příznaky progredovaly u mnohých pacientů v takové míře, že působily letálně (Honzík *et al.* 2010).

### 3.6.3 Mutace v genech pro mitochondriální přenašeče (AA1, PiC)

Přenašečové proteiny jak vnější tak vnitřní mitochondriální membrány zodpovídají za komunikaci mitochondrií s cytolem. Všechny mitochondriální přenašeče jsou kódovány jadernými geny a bylo jich popsáno až 50 různých typů. Dva přenašeče přímo souvisí s procesem oxidativní fosforylace, jde o adenin-nukleotidový translokátor (AA1, ANT) a fosfátový přenašeč (PiC). Jejich prostřednictvím se dostávají substráty (ADP, Pi) pro syntézu ATP do matrix, kde se fosforylace ADP odehrává. ATP je antiportem skrze AA1 směřováno do cytosolu. Dále jejich důležitost spočívá v tom, že jsou součástí dnes již prokázaných supramolekulárních struktur ATPsyntázomů a pravděpodobně tak přispívají k oligomernímu uspořádání  $F_1F_0$ -ATPsyntázy.

#### 3.6.3.1 AA1 přenašeč

V genu *SLC25A4* pro AA1 byly na základě výskytu různých bodových mutací (kromě Sengersova syndromu) doprovázených odlišnými klinickými příznaky rozlišeny tři typy onemocnění. U AA1 deficiencie jsou mutovány konzervované transmembránové úseky vedoucí k úplné ztrátě funkce transportovat ADP a ATP (Palmieri *et al.* 2005). Fenotypově se projevuje snadnou unavitelností, hypertrofickou kardiomyopatií, laktátovou acidózou. Sengersův syndrom, jehož manifestací jsou vrozené katarakty, hypertrofická kardiomyopatie, mitochondriální myopatie a laktátová acidóza, prozatím nemá jasnou genetickou příčinu. Pravděpodobně je funkce AA1 zasažena na transkripční či translační úrovni (shrnutí v (Palmieri 2008). Autozomálně dominantní progresivní externí oftalmoplegie (adPEO) doprovází čtyři bodové mutace genu *SLC25A4*. adPEO typicky destabilizuje mtDNA a způsobuje v ní několika kilobázové delece (3 - 8,5 kbp) (Kaukonen *et al.* 2000).

#### 3.6.3.2 Pi přenašeč

Deficiencie fosfátového přenašeče vede k blokaci přenosu Pi. Chybí tak jeden ze substrátů pro syntézu ATP, která nemůže probíhat. Defekt se manifestuje svalovou hypotonií, progresivní kardiomyopatií, laktátovou acidózou (Mayr *et al.* 2007).

### 3.6.4 Možnosti mitochondriální diagnostiky

Poruchy OXPHOS mohou postihnout, kromě tkání s vysokými energetickými nároky, i jakoukoli další tkáň či orgán v těle. Pro širokou genotypovou a fenotypovou heterogenitu představuje diagnostika mitochondriálních onemocnění náročný úkol. Analyzovat podstatu určitého defektu znamená kombinovat širokou škálu biochemických a molekulárně-genetických metod. Všechny níže popsané diagnostické přístupy mohou být prováděny u dospělých i dětských pacientů.

#### 3.6.4.1 Příklady standardně používaných biochemických a molekulárně – genetických analýz

Stanovení zvýšené koncentrace metabolitů - laktátu, ketonových látek, NADH a rostoucího poměru laktát/pyruvát v plasmě či mozkomíšním moku je prvním náznakem poškození mitochondriálního metabolismu (Rustin *et al.* 1994). Stejnou informaci poskytují zvýšené hodnoty redox stavu v plasmě (Vassault *et al.* 1991). Pokud pacient vykazuje u zmíněných stanovení nefyziologické hodnoty a je u něj patrné vícečetné orgánové zasažení, pak je podezření pro mitochondriální poruchu na místě.

V dalším kroku je nezbytně nutné určit na základě kinetických měření o jakou enzymatickou poruchu se jedná a zda je způsobena změnou ve struktuře, složení nebo množství enzymu. Nejlepším materiálem pro diagnostiku mitochondriálních onemocnění je ta tkáň, která je nejvýrazněji postižena nemocí, nejčastěji to bývá kosterní sval. Analýzy se mohou provádět na celých buňkách (např. izolovaných lymfocytech, stačí 10 ml odběr krve, kultivované kožní fibroblasty), izolovaných mitochondriích (např. z bioptické svalové tkáně, z kultivovaných buněk) a na tkáňových homogenátech. U svalových biopsií se odebírá 150 – 200 mg tkáně (*m.deltoideus*, *m. tibialis anterior*). V případě nutné biopsie jaterní či srdeční tkáně je možné odebrat pouze 1 – 20 mg. Veškerá měření se pak provádí na celých homogenátech, izolovat mitochondriální frakci jako u svalové biopsie není možné (Rustin *et al.* 1994). Rizikem studia defektů na kultivovaných buňkách (nejčastěji fibroblastech) je s přibývajícím pasáží vyřazení deficientních buněk. Přídavek uridinu do kultivačního média tomu zabrání. Obnoví se tím činnost enzymu dihydroorotát dehydrogenázy, která figuruje při *de novo* syntéze pyrimidinů (Morais *et al.* 1990).

Pohled na funkci systému OXPHOS jako celku umožňuje měření spotřeby kyslíku pomocí polarografie kyslíkovou (Clarkovou) elektrodou. Měřením spotřeby kyslíku v přítomnosti řady substrátů a inhibitorů pro jednotlivé komplexy OXPHOS je možné

identifikovat i postižený komplex. Při poškození komplexu I se odhalí pozměněná intenzita dýchání použitím substrátů produkujících NADH. Naopak zasažení komplexu II se na dýchání projeví aplikací FADH-generujících substrátů (sukcinát). Pokud jsou poškozené komplexy III či IV, nemohou být oxidovány ani NADH- ani FADH-generující substráty. U komplexu V se prokáže jeho snížená aktivita, když je i po rozpřažení oxidativní fosforylace použitím činidel jako CCCP,  $\text{Ca}^{2+}$  rychlost dýchání stále v normě. Polarografickou analýzou je možné odhalit defektní cytochrom c a dále nejen defekty oxidativní fosforylace, ale také PDH deficiencie, poškození Krebsova cyklu. K analýze se používá vždy čerstvý materiál.

Při přímém stanovení enzymových aktivit komplexů dýchacího řetězce se měří aktivita každého komplexu zvlášť nebo také po skupinách (I+III, II+III). Metoda je založena na použití donorů a akceptorů elektronů účastnících se oxido-redukčních reakcí katalyzovaných jednotlivými komplexy OXPHOS. Jednotlivá měření se provádějí ve 3 opakováních a velký důraz se klade na dodržování stejných pracovních podmínek během měření a dostatečném počtu vhodných kontrolních vzorků. Pro zvýšení výpovědní hodnoty analýzy se stanovují poměry absolutních hodnot aktivit jednotlivých komplexů. Vztahují se k sobě navzájem (nejčastěji ke komplexu II) a také k enzymu, který funguje mimo OXPHOS (nejčastěji k citrátsyntáze). Tento krok se opírá o fakt, že poměry mezi enzymy OXPHOS jsou ustálené a to nejen v jednom typu tkáně.

K určení množství a funkčního stavu jednotlivých komplexů a jejich podjednotek se využívá elektroforetických technik. Konkrétně BN-PAGE byla navržena pro efektní separaci membránových proteinů na základě jejich molekulových hmotností v širokém rozmezí 10 – 10,000 kDa. Jako první byly díky ní separovány právě proteinové komplexy OXPHOS (Schagger a von Jagow 1991). Separované proteiny zůstávají enzymaticky aktivními, což umožňuje další analýzu – měření aktivit komplexů v gelu. Obvykle se k analýze OXPHOS využívá 2-D separace. Nativní elektroforéza se kombinuje s SDS elektroforézou pro následné rozdělení podjednotek komplexů podle jejich molekulových hmotností nebo s isoelektrickou fokusací, kdy dojde k rozdělení podle jejich isoelektrického bodu. Proteiny se standardně vizualizují barvením stříbrem, popřípadě se detekují Western blotem (shrnuto v Reisinger a Eichacker 2006).

Pro objasnění možné mitochondriální patologie se také využívají histologické analýzy postižených tkání. U svalů jsou typickým histologickým symptomem mitopatií tzv. „rozdraná“ červená vlákna (z *angl.* ragged-red fibers). Pomocí histochemického barvení je možné vizualizovat distribuci mitochondrií ve zkoumané tkáni a analyzovat přítomnost či absenci aktivit enzymů, to vše ve stejné oblasti histologického řezu.

Pokud se biochemickými studii existence mitochondriálního defektu potvrdí, charakterizuje se jeho molekulární podstata molekulárně-genetickými analýzami. V případě absence podezření na kandidátní gen, se postupně vylučují mutace jak v mt DNA, tak ve vybraných jaderně kódovaných genech.

#### **3.6.4.2 Problémy v diagnostice způsobené mutacemi v mtDNA**

Vzhledem k maternálnímu typu dědičnosti mutované mitochondriální DNA je vyloučen přenos mutací otcovské mtDNA. Ale i přesto není předem možné určit, jak vážný dopad bude od matky děděná mutace mít. Záleží na mnoha faktorech, které přenos mutace ovlivňují. Většina mutací mtDNA jsou heteroplasmického charakteru. Rozchod mutovaných a nemutovaných forem mtDNA do maturovaných pohlavních buněk během oogeneze, způsob segregace mutace do jednotlivých tkání během vývoje plodu, úroveň heteroplasmie ve prospěch mutované formy v zasažených tkání, typ nejvíce postižené tkáně, genetické pozadí, vliv prostředí, to vše společně moduluje závažnost heteroplasmických i homoplasmických mutací. Homoplasmická mutace je sice přenesena od matky na všechny potomky, ale porucha, kterou mutace způsobuje, se u všech potomků nemusí projevit. V kap. 3.6.1.2 je popsán případ dvou nepříbuzných nositelů 2 bp mikrolece 9205 $\Delta$ TA v genu *MT-ATP6*, kteří se odlišovali ve svých fenotypových projevech při srovnatelné hladině heteroplasmie. Různé, výše zmiňované, genetické pozadí hrálo patrně vliv v přítomnosti a absenci patogenity u prvního, resp. druhého případu. Jiný příklad, kde lze poukázat tentokrát na vliv prostředí, je homoplasmická mutace v genu *MT-RNR1* pro ribosomální RNA, která se manifestuje post-lingvální hluchotou. Porucha může být indukována podáním aminoglykosidů. Vyvarování se aminoglykosidovým antibiotikům je klíčovým environmentálním faktorem ovlivňující progresi onemocnění u nositelů této mutace (Prezant *et al.* 1993). Úkolem genetického poradenství je odpovědět postiženým rodinám dědičnou poruchou, jaké je riziko a pravděpodobnost jejího přenosu. Ale na základě zmíněných okolností je tuto odpověď v případě maternálně děděných mitochondriálních poruch těžké zjistit. Proto je důležité brát každou mutaci individuálně a navrhnout pro ni individuální plán vyšetření.

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Materiál

Pro cíl 1 byla použita buněčná linie HEK293 (CRL-1573) zakoupená od ATCC (Rockville, USA).

Pro cíl 2 byly použity 3 (C, C2, E) buněčné linie HEK293 se stabilně sníženou expresí genu *TMEM70* pomocí shRNA a 1 buněčná linie HEK293 (NS) stabilně exprimující tzv. non-silencing“ shRNA, která byla použita jako kontrola. Buněčné linie byly k dispozici v laboratoři. Vlásoky označené C a E byly navrženy do kódující oblasti genu *TMEM70*. V liniích C a C2 stabilně exprimující vlásoku C byla snížena hladina mRNA genu *TMEM70* na 60%, resp. 70% v porovnání s linií NS. V linii E stabilně exprimující vlásoku byla hladina mRNA *TMEM70* snížena na 45% kontrolní linie NS. Buněčné linie byly k dispozici v laboratoři.

Pro cíl 3 bylo materiálem 20 linií kultivovaných fibroblastů: 4 kontrolní linie fibroblastů od pacientů, u kterých nebylo potvrzeno mitochondriální onemocnění; 4 linie kožních fibroblastů od pacientů s mutací c.317-2A>G v genu *TMEM70*, které byly použity jako pozitivní kontrola; 12 linií kožních fibroblastů od pacientů, u kterých bylo na základě BN-PAGE ve vzorku svalové biopsie vysloveno podezření na deficit F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP syntázy. Všechny buněčné linie byly dostupné v laboratoři.

Pro cíl 4 byla použita DNA ze vzorku svalové biopsie od pacientů (P2, P4, P9, P10), která byla k dispozici v laboratoři.

Práce byla součástí grantových projektů schválených Etickou komisí I.LF UK a VFN.



## 4.2 Používané přístroje

analyzátor imunoblotu	
VersaDoc imaging systém	BioRad, USA
analytické váhy	Scaltec, USA
blotovací aparatura	
TE77xSemiDry Blotter	Hoefler, USA
centrifugy	
Universal 32R	Hettich Zentrifugen, Německo
Biofuge 28RS	Heraeus Sepatech, Německo
elektroforetická aparatura	BioRad, USA
hybridizační pec	Stuart Scientific, VB
mikrocentrifugy	Hettich Zentrifugen, Německo
minicentrifugy	MPW, Med. Instruments, Polsko
PCR box	Holten, Dánsko
PCR cycler	M J Research, USA
pH metr	Hanna Instruments, Itálie
PVDF membrána	Sigma, USA
regulátor teploty	Shimadzu, Japonsko
sekvenátor	
ABI PRISM 3100-Avant analyzátor	Applied Biosystems, USA
spektrofotometr	
ND1000 – NanoDrop	ThermoScientific, USA
UV-2401PC	Shimadzu, Japonsko
sušička na gel	Whatman Biometra, Německo
termoblok	Labnet, USA
třepačky	Heidolph, Německo
váhy	Scaltec, USA
vortex	IKA, Německo

V experimentech bylo využíváno laboratorního skla (Simax), křemičitých a plastových kyvet (Sigma, Německo), pipet (Nichipet, Japonsko) a plastu (Eppendorf, Německo; Gilson, USA).

### 4.3 Použité chemikálie

acetylkoenzym A	Sigma, USA
agaróza	Serva, Německo
antimycin A	Sigma, USA
akrylamid	Sigma, USA
ATP	Sigma, USA
bis-akrylamid	Sigma, USA
bis-tris-HCl	Sigma, USA
Bradfordovo reagens	BioRad, USA
bromfenolová modř	Sigma, USA
BSA	Sigma, USA
<i>m</i> -Cl-CCP	Sigma, USA
cytochrom c	Sigma, USA
DCPIP (2,6-dichlorophenolindophenol)	Sigma, USA
digitonin	Sigma, USA
<i>n</i> -dodecyl- $\beta$ -d-maltosid	Sigma, USA
DTNB	Sigma, USA
EDTA	Sigma, USA
etidium bromid	Sigma, USA
Folinovo reagens	Sigma, USA
fosfoenolpyruvát (PEP)	Sigma, USA
glycin	Sigma, USA
chlorid draselný	Lachema, ČR
chlorid hořečnatý	Sigma, USA
chlorid sodný	Penta, ČR
kit na purifikaci PCR produktů	
Wizard SV Gel and PCR Clean-Up	Promega, USA
koenzym Q <sub>10</sub> (CoQ <sub>10</sub> )	Sigma, USA
koktejl inhibitorů proteáz (PIC)	Roche, Švýcarsko
kyanid draselný (KCN)	Sigma, USA
laktátdehydrogenáza (LDH)	Sigma, USA
laurylmaltosid	Sigma, USA

luminiscenční substrát	
SuperSignal WestFemto Sensitivity Substrate	ThermoScientific, USA
marker molekulových hmotností:	
100 kbp DNA Ladder	Fermentas, Litva
SeeBlue Plus2 Prestained Standard	Invitrogen, USA
Protein Marker Kit	Amersham Biosciences, VB
2-merkptoethanol	Sigma, USA
NADH	Sigma, USA
oligomycin	Sigma, USA
oxalacetát	Sigma, USA
PBS	Sigma, USA
peroxosíran amonný	Sigma, USA
PPPmaster Mix	Top-Bio, ČR
primární monoklonální protilátky proti:	Mitosciences, USA
komplexu I: NDUFA9	
komplexu II: SDHA, SDHB	
komplexu III: Core2	
komplexu IV: Cox 1, 2, 5a	
komplexu V: alfa, beta, <i>d</i> , OSCP	
porinu	
pyruvátkináza (PK)	Sigma, USA
rotenon	Sigma, USA
sacharóza	Penta, ČR
SDS	Sigma, USA
sekundární myší protilátka	Sigma, USA
sekvenční kit	
ABI Big Dye Terminator Cycle Sequencing Detection Kit v3.1	Applied Biosystems, USA
serva blue	BioTech, ČR
sukcinát	Sigma, USA
sušené odtučněné mléko	Laktino, ČR
TEMED	Sigma, USA
tricin	Sigma, USA
trypsin	Sigma, USA
Tris-HCl	Sigma, USA

tween	Sigma, USA
xylen cyanol	Sigma, USA

#### 4.4 Roztoky

Anodový pufr (SDS-PAGE)	100 mM Tris-Cl, pH 8,9
Anodový pufr (BN-PAGE)	50 mM Bis-Tris, pH 7,0
Barvicí roztok	2 g Serva Blue; 75 ml kyseliny octové (99,9%); 500 ml etanolu
DBH <sub>2</sub> (100 µl)	10 mM CoQ <sub>10</sub> ; 80 µl etanolu (96%); 5 µl 0,1 M HCl; 5 µl 1 M HCl
Extrakční pufr	1,75 M aminokaprová kyselina; 75 mM Bis-Tris, pH 7,0; 2mM EDTA
Gelový pufr (SDS-PAGE)	3 M Tris-Cl, pH 8,45; 0,3 % SDS
Gelový pufr (BN-PAGE)	150 mM Bis-Tris, pH 7,0; 1,5 M aminokaprová kyselina
Katodový pufr (SDS-PAGE)	100 mM Tris-Cl, pH 8,9; 100 mM tricín; 0,1 % SDS
Katodový pufr (BN-PAGE) B	15 mM Bis-Tris, pH 7,0; 50 mM tricín
Katodový pufr (BN-PAGE) A	0,02 % Serva Blue G / 100 ml katodového pufu A
KPi pufr	1 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,0, resp. 7,8
Odbarvovací roztok (2l)	1 300 ml H <sub>2</sub> O, 500 ml lihobenzínu, 160 ml kyseliny octové (99,9 %)
RIPA pufr	50 mM Tris-Cl, pH 7,4; 150 mM NaCl; 1 mM PMSF; 1 mM EDTA; 1 % Triton X-100; 1 % sodium deoxycholate; 0,1 % SDS; 1 % PIC (přidat před užitím RIPA pufu)
STE izolační roztok	10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 250 mM sacharóza; 1 mM EDTA; 1 % PIC (přidat před použitím STE roztoku)
Stripovací roztok	62,5 mM Tris-Cl, pH 6,7; 100 mM β-merkaptetanol; 2 % SDS
TBE pufr (1l)	<b>10x</b> (pracovní koncentrace): 108 g Tris-Cl; 55 g kyseliny borité; 40 ml 0,5 M Na <sub>2</sub> EDTA, pH 8,0
TBS pufr	<b>10x</b> (pracovní koncentrace): Tris-Cl; NaCl, pH 7,5
TBS Tween pufr	1x TBS, pH 7,5; 0,1% Tween
Transferový pufr	25mM Tris-Cl; 192mM glycin; 10% metanol; 0,02% SDS

TRIS-Cl pufr	1M Tris-Cl, pH 8,0
Vzorkový pufr (AGE) (100 ml)	<b>10x</b> (pracovní koncentrace): 250 mg bromfenolové modři; 250 mg xylen cyacol; 33 ml 150 mM Tris-HCl, pH 7,6; 60 ml glycerolu; 7 ml H <sub>2</sub> O
Vzorkový pufr (SDS-PAGE)	<b>4x</b> (pracovní koncentrace) : 50 mM Tris-Cl, pH 6,8; 12 % glycerol; 4 % SDS; 2 % $\beta$ -merkaptoetanol; 0,01 % bromfenolová modř
Vzorkový pufr (BN-PAGE)	50 mM Bis-Tris, pH 7,0; 750 mM aminokaprová kyselina; 0,5 mM EDTA, 5% Serva Blue G

## **4.5 Metody**

### **4.5.1 Stanovení koncentrace proteinů**

#### **4.5.1.1 Bradfordovo, resp. Lowryho stanovení**

Spektrofotometrickým měřením nárůstu absorbance při 595nm, resp. 700nm bylo stanoveno množství komplexu barvivo Coomassie (Bradfordovo reagens; BioRad) / protein, resp. množství redukované formy Folinova reagens (Sigma) odpovídající koncentraci proteinu ve vzorku podle standardních protokolů (Lowry *et al.* 1954; Bradford *et al.* 1976).

### **4.5.2 Izolace mitochondriální frakce z kultivovaných buněk diferenciální centrifugací**

Kultivované buňky byly sklizeny trypsinizací a dvakrát promyty v PBS. Sklizené buňky byly resuspendovány v STE roztoku a postupně homogenizovány skleněným homogenizátorem (1ml). Pro separaci jader a nerozbitých buněk byl homogenát centrifugován při 4°C na 600 g po dobu 15 min. Vzniklý supernatant byl v čistých mikrozkuvkách centrifugován při 4°C a 10 000 g dalších 25 min. Vzniklá peleta tvořena mitochondriemi byla resuspendována ve 100 µl STE roztoku a znovu centrifugována (4°C, 10 000 g, 25 min). Supernatant byl odstraněn, pelety byly resuspendovány v 50 µl čerstvého roztoku STE a skladovány při -80°C. Koncentrace mitochondriálního proteinu byla stanovena Lowryho metodou.

### **4.5.3 Příprava vzorků na SDS-elektroforézu**

Izolované mitochondrie z kultivovaných buněk byly centrifugovány při 10 000 g po dobu 10 min (pro odstranění zbytkového množství izolačního STE roztoku). Poté byly resuspendovány v RIPA pufru, během 20 min třikrát zvortexovány a centrifugovány při 4°C na 51 000 g po dobu 20 min. Supernatant byl přepipetován do nových mikrozkuvek. Koncentrace mitochondriálního proteinu byla stanovena spektrofotometricky Bradfordovou metodou při 595 nm. K nanášce o 5 – 20 µg proteinu byl přidán vzorkový pufr s merkaptoetanolem v poměru 3:1. Poté byl vzorek inkubován 20 min při 37°C.

#### 4.5.4 SDS elektroforéza

5 – 20 µg mitochondriálního proteinu bylo děleno prostřednictvím 4% zaostřovacího polyakrylamidového gelu (tab. 4.1) a 12%, popř. 10% separačního polyakrylamidového gelu při (tab. 4.1). Ke kontrole rychlosti separace podle molekulové hmotnosti bylo použito 5 µl markeru molekulové hmotnosti (SeeBlue Plus2, Invitrogen). Použité napětí při separaci proteinů v zaostřovacím gelu bylo 40 V, resp. 100 V v gelu separačním.

**Tab. 4.1 Způsob přípravy gelů na SDS elektroforézu**

Komponenty	zaostřovací gel 4%	separační gel 10%	separační gel 12%
H <sub>2</sub> O	5,27 ml	3,35 ml	2,7 ml
3x GB	3,33 ml	3,33 ml	3,33 ml
Akrylamid (49,5%)	1,3 ml	3,25 ml	3,9 ml
APS (10%)	90 µl	80 µl	50 µl
TEMED	9 µl	8 µl	5 µl
celkem (ml)	10 ml		

#### 4.5.5 Příprava vzorku na nativní elektroforézu (BN- PAGE)

##### 4.5.5.1 Sklizení fibroblastů

Do 50 ml falkonky bylo slito kultivační médium z kultivačních lahvíček a vychlazeno. Přisedlé buňky byly omyty 3 ml PBS. PBS bylo odsáto a poté byly buňky trypsinizovány přidáním 1,5 ml trypsinu po dobu 10 min při 37°C v termostatu. Následně byly k buňkám přidány 3 ml vychlazeného média. Suspenze byla centrifugována 5 min při 2 000 g. Supernatant byl odsát a peleta byla třikrát opakovaně promyta v 10 ml ledového PBS, centrifugována při 2 000 g po dobu 5 min.

##### 4.5.5.2 Digitonizace a solubilizace fibroblastů

(vztaženo na 1-2x 10<sup>6</sup> buněk ~ 0,5 mg proteinu)

Peleta byla resuspendována ve 100 µl PBS a k suspenzi bylo přidáno 100 µl roztoku ledového digitoninu rozpuštěného v PBS (8 mg/ml). Směs byla inkubována 10 min na ledu, poté byla 7x naředěna ledovým PBS a centrifugována 5 min při 12 000 g a 4°C. Poté byla peleta 2x promyta 1 ml ledového PBS a opět centrifugována na 12 000 g po dobu 5 min při 4°C. Peleta byla resuspendována ve 100 µl extrakčního pufru (pH 7,0), do vzniklé suspenze bylo přidáno 20 µl 10% dodecylmaltosidu. Směs byla inkubována na ledu po dobu 5 min.

Poté byla suspenze centrifugována 30 min při 20 000 g a 4°C. V supernatantu byla stanovena koncentrace proteinu Bradfordovou metodou a poté bylo do vzorku přidáno 10 µl vzorkového pufru (pH 7,0).

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

20 µg proteinu bylo separováno pomocí gradientového gelu s rozmezím 6% - 15% (tab. 4.2), který umožnil separaci molekul o 100-1000 kDa. Separace probíhala při napětí 100 V po dobu 4 – 5 h. Ke kontrole molekulové hmotnosti bylo použito 5 µl Protein Marker Kit (Amersham Biosciences).

Po celou dobu bylo nutné dbát na nízkou pracovní teplotu. Příprava vzorků i gelů se prováděla na ledu, používaly se vychlazené roztoky, elektroforéza probíhala při 7°C.

**Tab. 4.2 Způsob přípravy gelů pro BN-PAGE**

Komponenty	zaostřovací gel 4%	separační gel 6%	separační gel 15%
H <sub>2</sub> O	2,9 ml	5,4 ml	1,64 ml
3x GB	1,66 ml	3,33 ml	3,33 ml
Akrylamid (49,5%)	0,405 ml	1,2 ml	3 ml
Glycerol (87%)	-	-	2 ml
APS (10%)	60 µl	60 µl	30 µl
TEMED	6 µl	6 µl	3 µl
celkem (ml)	5 ml	10 ml	10 ml

#### 4.5.7 Semi – dry western blot

Pro přenos elektroforeticky separovaných proteinů z gelu na PVDF membránu (Immobilon – FL, Millipore) byla využita blotovací aparatura TEx77SemiDry Blotter (Hoefler). Postupovalo se podle výrobcem doporučených pokynů. Přenos proteinů probíhal 1 h za konstantního napětí a proměnného proudu, jehož hodnota závisela na velikosti plochy PVDF membrány, dle vzorce:  $I [mA] = S * 0,8 * cm^{-1}$ . Po skončení přenosu byl gel barven přes noc v barvicím roztoku, druhý den vysušen při 90°C. PVDF membrána s navázanými proteiny byla osušena a naznačena specifickými protilátkami nebo uchována v -20°C pro pozdější použití.

Usušená PVDF membrána byla 2 h blokována v 5 % mléce v 50 ml 1x TBS při pokojové teplotě. Poté byla inkubována 2 h s primární protilátkou (tab. 4.3) a hodinu se sekundární protilátkou (s koncentrací 1:1 666 ve 2 % mléce v TBST). Využitím komerčního



produktu SuperSignal WestFemto Sensitivity Substrate (ThermoScientific) byla na značené PVDF membráně vyvolána luminiscenční reakce. Signály byly snímány prostřednictvím VersaDoc 4000 zobrazovacího systému (BioRad).

**Tab. 4.3 Použité primární protilátky a jejich koncentrace**

<b>typ komplexu</b>	<b>primární protilátka</b>	<b>koncentrace*</b>
<b>I</b>	<b>anti-NDUFA9</b>	<b>1:4 444</b>
<b>II</b>	<b>anti-SDHa</b>	<b>1:20 000</b>
	<b>anti-SDHb</b>	<b>1:2 857</b>
<b>III</b>	<b>anti-Core2</b>	<b>1:13 333</b>
<b>IV</b>	<b>anti-CoxI</b>	<b>1: 33 333</b>
	<b>anti-CoxII</b>	<b>1:13 333</b>
	<b>anti-Cox5a</b>	<b>1: 3 333</b>
<b>V</b>	<b>anti-<math>\alpha</math></b>	<b>1:8 000</b>
	<b>anti-<math>\beta</math></b>	<b>1:10 000</b>
	<b>anti-<i>d</i></b>	<b>1:8 000</b>
	<b>anti-OSCP</b>	<b>1:2 500</b>
<b>VDAC</b>	<b>anti-Porin</b>	<b>1:2 500</b>
* vztaženo na 2% mléko ve 20 ml TBST		

#### **4.5.8 Enzymologická měření**

Stanovení specifických aktivit enzymových komplexů systému OXPHOS a kontrolního matrixového enzymu citrátsyntázy byla prováděna na izolovaných mitochondriích z kultivovaných buněk. Koncentrace proteinu byla stanovena Lowryho metodou. Měření specifických aktivit bylo provedeno spektrofotometricky odečítáním nárůstu či poklesu absorbancí odpovídající různým množstvím vznikajících produktů jednotlivých reakcí při 37°C. Každý vzorek byl měřen dvakrát v kyvetách (1 ml) o optické dráze 1 cm.

Z naměřených hodnot byl spočítán průměr a specifická aktivita enzymů byla vypočtena dle vzorce:

$$SA = dA * 10^6 / \epsilon * v * c$$

**dA** – aritmetický průměr z naměřených hodnot,  **$\epsilon$**  – molární absorpční koeficient  $19,6 * 10^6$   $\text{dm}^3/\text{cm}/\text{mol}$ , **v** – objem vzorku [ $\mu\text{l}$ ], **c** – koncentrace proteinu ve vzorku [ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ], **SA** – specifická aktivita vyjádřena v [ $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}_{\text{proteinu}}$ ].

#### **4.5.8.1 Stanovení specifické aktivity NADH:CoQ oxidoreduktázy (komplex I)**

Specifická aktivita komplexu I (KI) byla stanovena měřením rychlosti úbytku redukovaného koenzymu NADH. Pokles absorbance byl odečítán při 340nm.

15  $\mu\text{g}$  mitochondriální frakce bylo inkubováno v hypotonickém (vodném) prostředí po dobu 3 minut. Poté byly přidány další substráty reakční směsi: 50 mM TRIS (pH 8,1), 10 % BSA, 0,3 mM KCN, 50  $\mu\text{M}$  CoQ<sub>10</sub>. Reakce byla odstartována 10  $\mu\text{l}$  0,1  $\mu\text{M}$  NADH. Po dobu 3 min byl sledován pokles absorbance vlivem úbytku redukované formy NADH. Po uplynuté době byly přidány 2  $\mu\text{l}$  50  $\mu\text{M}$  rotenonu. Další 3 min byla sledována inhibice enzymatické aktivity KI účinkem tohoto specifického inhibitoru. Od naměřené absorbance bez rotenonu byla odečtena absorbance měřená s rotenonem.

#### **4.5.8.2 Stanovení specifické aktivity sukcinát:CoQ oxidoreduktázy (komplex II)**

Specifická aktivita komplexu II (KII) byla stanovena měřením rychlosti úbytku oxidované formy arteficiálního akceptoru elektronů 2,6 – DCPIP, tedy poklesu absorbance při 600 nm.

Reakční směs obsahovala 15  $\mu\text{g}$  mitochondriální frakce, 10 mM KPi (pH 7,0), 2 mM EDTA, 1 mg/ml BSA, 3  $\mu\text{M}$  rotenon, 10mM sukcinát, 0,2 mM ATP, 0,3 mM KCN. V tomto složení byla směs inkubována 3 min. Poté byl přidán 80  $\mu\text{M}$  2,6 – DCPIP a 1  $\mu\text{M}$  antimycin. Reakce byla odstartována 50  $\mu\text{M}$  CoQ<sub>10</sub> a během 3 min byl průběh reakce zaznamenáván.

#### **4.5.8.3 Stanovení specifické aktivity CoQH<sub>2</sub>:cytochrom c oxidoreduktáza (komplex III)**

Specifická aktivita komplexu III (KIII) byla stanovena měřením rychlosti přírůstku redukované formy oxidovaného cytochromu c. Při vlnové délce 550nm byl pozorován vzrůst absorbance.

Spolu s 15 µg mitochondriální frakce byl do reakční směsi přidán 50 mM KPi (pH 7,8), 2 mM EDTA, 2 mM KCN, 50 µM oxidovaný cytochrom c, 1 mg/ml BSA. Reakce byla odstartována 5 µl 0,2 mM DBH<sub>2</sub>, jakožto arteficiální donor elektronů. Vzestup absorbance při 550 nm byl sledován 3 min. Následně přidáním 1 µl 1 µM antimycinu byla po dobu 1 min zaznamenávána inhibice reakce. Absorbance naměřená s inhibitorem byla odečtena od absorbance naměřené bez inhibitoru.

#### **4.5.8.4 Stanovení specifické aktivity NADH:cytochrom c oxidoreduktázy (komplex I - III)**

Stanovení specifické aktivity komplexu I – III bylo měřeno jako rychlost vzniku redukovaného cytochromu c oxidací NADH v rotenon – senzitivní reakci. Po dobu 1 min byl sledován nárůst absorbance při 550 nm.

15 µg vzorku bylo 3 min inkubováno v hypotonickém prostředí. Poté bylo do kyvety přidáno 50 mM TRIS (pH 8,1), 2,5 mg/ml BSA, 40 µM oxidovaný cytochrom c, 2 mM KCN a k odstartování reakce sloužil 0,1 mM NADH. Reakce byla dále inhibována přidáním 50 µM rotenonu. Sledován byl pokles absorbance při 340 nm. Naměřené hodnoty absorbancí byly od sebe odečteny.

#### **4.5.8.5 Stanovení specifické aktivity sukcinát:cytochrom c oxidoreduktázy (komplex II – III)**

Stanovení specifické aktivity komplexu II – III bylo měřeno jako rychlost vzniku redukovaného cytochromu c oxidací DBH<sub>2</sub> v antimycin – senzitivní reakci při 550 nm. Také bylo možné měřit oxidaci sukcinátu v závislosti na redukci oxidovaného cytochromu c, tedy aktivitu komplexu II v malonát – senzitivní reakci.

Reakční směs byla zpočátku tvořena 50 mM KPi, 2 mM EDTA, 1 mg/ml BSA, 15 µg vzorku, 3 µM rotenon, 10 mM sukcinát, 0,2 mM ATP, 0,3 mM KCN. Reakce byla

odstartována 40  $\mu\text{M}$  oxidovaným cytochromem c, kdy byl měřen komplex II. Po 1 min bylo přidáno 10  $\mu\text{l}$  malonátu. Po další 1 min bylo přidáno 0,2 mM DBH<sub>2</sub>, které odstartovalo měření aktivity komplexu III po dobu 1 min. Poté byla reakce inhibována 1  $\mu\text{M}$  antimycinem.

#### 4.5.8.6 Stanovení specifické aktivity cytochrom c oxidázy (komplex IV)

Specifická aktivita komplexu IV (KIV) byla stanovena měřením rychlosti úbytku redukovaného cytochromu c. Pokles absorbance byl zaznamenáván při 550 nm po dobu 60 s.

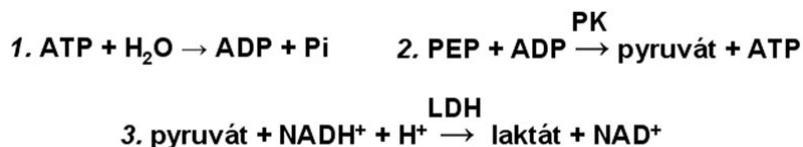
Reakční směs byla tvořena 40 mM KPi (pH 7,0), 1mg/ml BSA, 10  $\mu\text{M}$  redukovaný cytochrom c, 2,5 mM laurylmaltosid. Reakce byla odstartována 15  $\mu\text{g}$  mitochondriální frakce.

#### 4.5.8.7 Stanovení specifické oligomycin-senzitivní ATP-hydrolytické aktivity $F_1F_0$ -ATP syntázy (komplex V)

Specifická ATP-hydrolytická aktivita komplexu V (KV) byla stanovena jeho oligomycin-senzitivní hydrolytickou aktivitou. Ta se měří jako pokles absorbance při 340 nm daný množstvím vzniklé oxidované formy  $\text{NAD}^+$ .

30  $\mu\text{g}$  mitochondriální suspenze bylo inkubováno 3 min v hypotonickém prostředí  $\text{H}_2\text{O}$ . Po této době byla přidána reakční směs tvořena z 50 mM TRIS (pH 8,0), 5 mg/ml BSA, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM KCl, 3  $\mu\text{M}$  *m*-Cl-CCP, 1  $\mu\text{M}$  antimycin, 2 mM PEP, 2 mM ATP, 4 U LDH, 4 U PK. Reakce byla iniciována 0,2 mM NADH. Aktivita byla měřena po dobu 2 minut, poté byl přidán 3  $\mu\text{M}$  oligomycin (inhibitor  $F_1F_0$ -ATP syntázy) a reakce byla měřena další 2 min. Specifická aktivita  $F_1F_0$ -ATP syntázy byla získána odečtením inhibice od celkové aktivity. (Složení reakce a koncentrace komponent byla převzata z protokolu Rustin *et al.*, 1994).

Vznik oxidovaného koenzymu  $\text{NAD}^+$  je spřažen s hydrolyzou ATP katalyzovanou KV v ATP – regenerujícím systému tří reakcí:



#### 4.5.8.8 Stanovení specifické aktivity citrát syntázy

Specifická aktivita citrát syntázy byla stanovena měřením rychlosti vzniku volného koenzymu A. Nárůst absorbance byl měřen při 412 nm.

Reakční směs obsahovala 0,1 mM DTNB (Ellmanovo reagens), 0,5 mM AcCoA, 15 % laurylmaltosid a 15 µg vzorku. V tomto složení bylo 1 min měřeno pozadí, tedy bez přidavku startovního substrátu – oxalacetátu. Po 1 min bylo přidáno 50 µl oxalacetátu a další 1 min sledován vzrůst absorbance při 412 nm. Naměřené pozadí bylo odečteno od reakce s oxalacetátem.

#### 4.5.9 Sekvenování genů *MT-ATP6*, *MT-ATP8*

Oblast mtDNA 7 844 bp – 9 527 bp (kódující geny *MT-ATP6*, *MT-ATP8*) byla amplifikována pomocí PCR ve třech vzájemně se překrývajících fragmentech pomocí specifických primerů (tab. 4.4). Reakční směs o objemu 25 µl se skládala z 9,5 µl vody; 12,5 µl PPP Master Mix (Top-Bio); 2 µl (~ 0,4 pmol/µl) primerů (F+R); 50 ng DNA. PCR reakce byla zahájena počáteční denaturací při 95°C po dobu 2 min. Následovalo 30 cyklů při 95° 30 s, 63°C 20 s a 72°C 40 s. Reakce byla ukončena elongací při 72°C po dobu 7 min.

25 µl PCR produktů bylo rozděleno horizontální elektroforézou v 1,5% agarózovém gelu připraveném v 1x TBE pufru při 18 – 28 V.cm<sup>-1</sup>. K určení molekulové hmotnosti byl použit marker DNA Ladder 100 kb (Fermentas). Fragmenty byly vizualizovány pomocí ethidium bromidu pod UV světlem a vyříznuty z gelu. PCR produkty byly extrahovány z gelu kitem Wizard SV Gel and PCR Clean-Up (Promega).

K sekvenování PCR produktů byl využit genetický analyzátor ABI PRISM 3100-Avant vybavený 4 kapilárami a kit Big Dye Terminátor v.3.1 Cycle Sequencing Kitu (Applied Biosystems). Sekvenační reakční směs o objemu 20 µl obsahovala 2 µl směsi (Big Dye Terminátor v.3.1), 3 µl 5x sekvenačního pufru (BigDye Terminator v1.1 & v3.1 5X Sequencing Buffer, Applied Biosystems), 20 ng templátu (PCR produktu) a 3,2 pmol (F nebo R) primeru. PCR sekvenační reakce začínala počáteční denaturací při 96°C po dobu 1 min; poté ve 25 opakováních probíhalo - denaturace 96°C 10 s; připojení primerů 50°C 5 s; prodlužování 60°C 4 min. Sekvenační reakce byla následně přečištěna etanolovou precipitací dle výrobcem doporučeného postupu a před vlastní sekvenční analýzou denaturována přidavkem 20µl Hi-Di Formamidu (Applied Biosystems) na reakci. PCR produkty byly sekvenovány v obou směrech. K analýze elektroforeogramu byl využit software ChromasLite verze 2.01 (Technelysium). Sekvence byla porovnána s referenční sekvencí NC\_012920 (GeneBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore>).

**Tab. 4.4** Sekvence specifických primerů

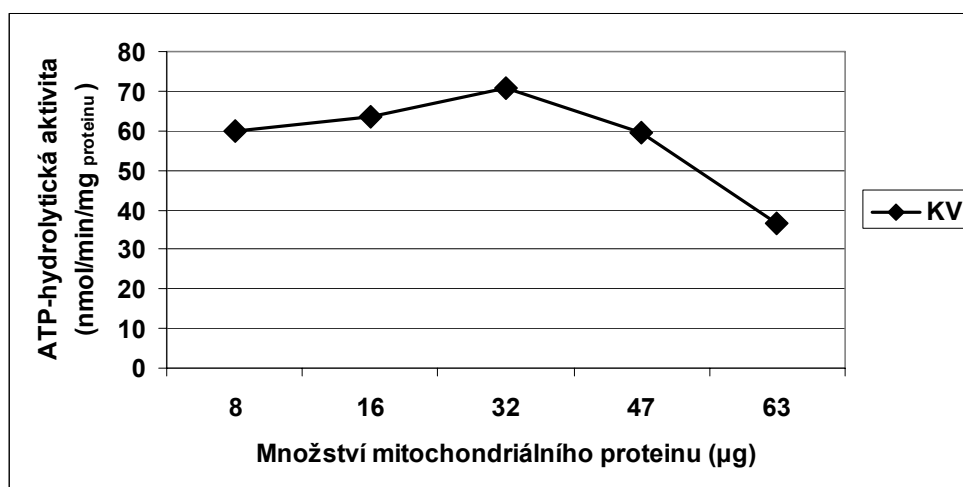
<b>Primery</b>	<b>Sekvence</b>
<b>mt16F</b>	5' - ACAGACGAGGTCAACGATCC - 3'
<b>mt16R</b>	5' - TTTGGTGAGGGAGGTAGGTG - 3'
<b>mt17F</b>	5' - CAGTGAAATGCCCAACTAAA - 3'
<b>mt17R</b>	5' - CCAGGGCTATTGGTTGAATG - 3'
<b>mt18F</b>	5' - AATGCCCTAGCCCACCTTCTT - 3'
<b>mt18R</b>	5' - GGCTAGGCTGGAGTGGTAAA - 3'

## 5 Výsledky

### 5.1 Optimalizace stanovení oligomycin–senzitivní ATP-hydrolytické aktivity $F_1F_0$ -ATP syntázy v izolovaných mitochondriích z kultivovaných buněk

Ke stanovení ATP-hydrolytické aktivity se postupovalo podle protokolu Rustin *et al.* (1994), který jsem optimalizovala pro měření na izolovaných mitochondriích z kultivovaných buněk.

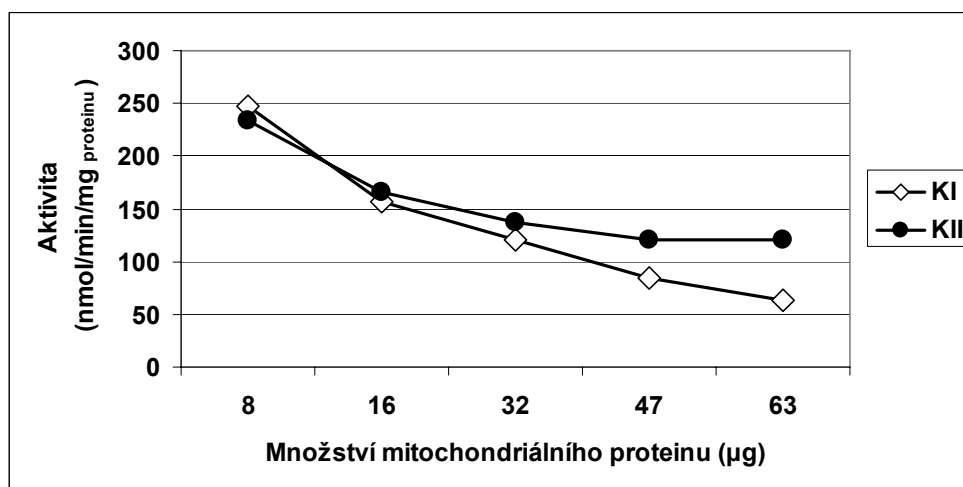
Pro lineární průběh reakce byla provedena optimalizace vstupního množství mitochondriálního proteinu. Z buněk HEK293 byly izolovány mitochondrie a z nich byly připraveny vzorky o koncentracích 8, 16, 32, 47, 63  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  mitochondriálního proteinu. ATP-hydrolytická aktivita byla měřena v dubletech (graf 5.1.). Jako nejvhodnější množství pro lineární průběh stanovení oligomycin-senzitivní ATP-hydrolytické aktivity komplexu V bylo 30  $\mu\text{g}$  mitochondriálního proteinu. Pro lineární průběh reakce je nezbytné všechny komponenty reakce vytemperovat na 37°C.



**Graf 5.1. Závislost stanovení oligomycin-senzitivní ATP-hydrolytické aktivity komplexu V na vstupním množství mitochondriálního proteinu.** Testováním množství 8, 16, 32, 47, 63  $\mu\text{g}$  mitochondriálního proteinu bylo pro lineární průběh reakce nejvhodnější množství 32  $\mu\text{g}$  (používané množství pro další studie bylo zaokrouhлено na 30  $\mu\text{g}$  mitochondriálního proteinu).

Zvolené vstupní množství mitochondriálního proteinu z kultivovaných buněk bylo testováno i pro stanovení aktivit komplexů dýchacího řetězce. Experimenty ukázaly, že

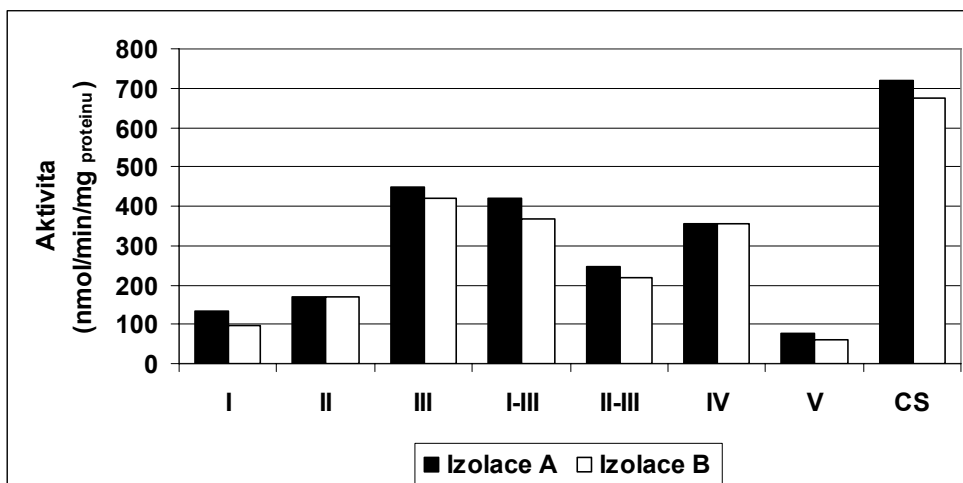
optimální množství pro stanovení specifických aktivit u komplexu I a II je 15  $\mu\text{g}$  mitochondriálního proteinu (graf 5.2.).



**Graf 5.2. Závislost aktivit vybraných komplexů dýchacího řetězce na vstupním množství mitochondriálního proteinu.** Optimálním množstvím pro stanovení specifických aktivit komplexů I a II prezentující komplexy dýchacího řetězce bylo 15  $\mu\text{g}$  mitochondriálního proteinu.

S cílem ověřit reprodukovatelnost optimalizovaného postupu stanovení oligomycin-senzitivní ATP-hydrolytické aktivity  $F_1F_0$ -ATP syntázy, aktivity komplexů dýchacího řetězce a kontrolního enzymu citrát syntázy (CS) byly provedeny dvě nezávislé izolace mitochondrií z buněk HEK293. V izolovaných mitochondriích byly stanoveny nezávisle aktivity komplexů OXPHOS a CS. Nebyl zjištěn významný rozdíl v aktivitách odpovídajících komplexů OXPHOS a CS mezi jednotlivými izolacemi (graf 5.3).





**Graf 5.3** Ověření reprodukovatelnosti metody pro stanovení aktivity komplexů OXPHOS a kontrolního enzymu CS v izolovaných mitochondriích z buněk HEK293. Ve dvou nezávislých izolacích mitochondrií A a B byly naměřeny aktivity komplexů OXPHOS a CS, které se od sebe výrazně nelišily.

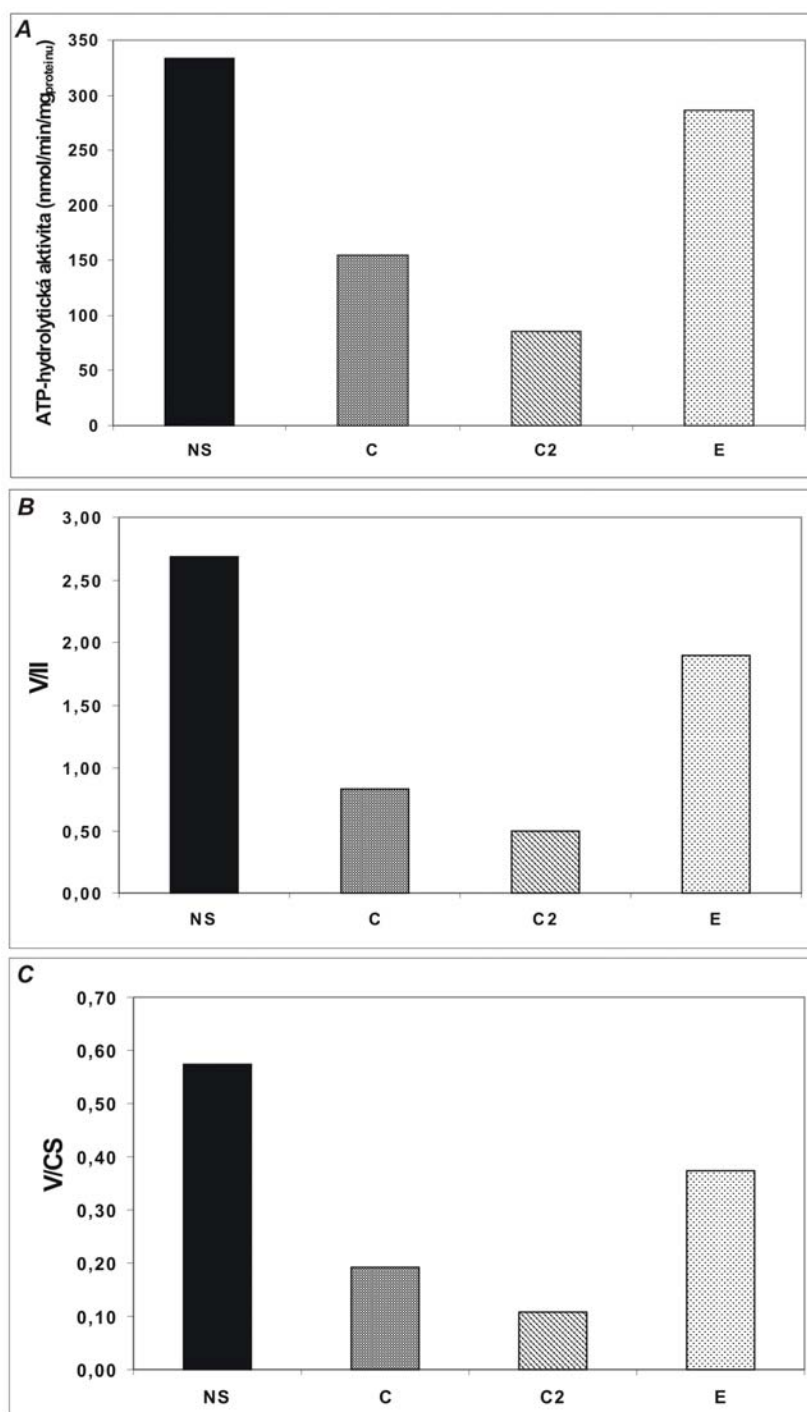
## 5.2 Charakterizace fenotypu buněčných linií HEK293 se stabilně sníženou expresí genu *TMEM70*

### 5.2.1 Stanovení oligomycin-senzitivní ATP-hydrolytické aktivity $F_1F_0$ -ATP syntázy

V izolovaných mitochondriích z buněčných linií C, C2, E se stabilně down-regulovanou expresí genu *TMEM70* a kontrolní linie NS byla stanovena oligomycin-senzitivní ATP-hydrolytická aktivita komplexu V (graf 5.4). Zjištěná oligomycin-senzitivní ATP-hydrolytická aktivita byla v izolovaných mitochondriích z linie C 154 nmol/min/mg<sub>proteinu</sub> a v mitochondriích z linie C2 dosahovala 86 nmol/min/mg<sub>proteinu</sub>, což odpovídá 46%, resp. 25% kontrolních hodnot (tab. 5.1). Snížené byly také poměry oligomycin-senzitivní ATP-hydrolytické aktivity k aktivitě komplexu II, respektive CS (graf 5.4). V izolovaných mitochondriích z linie E byla zjištěna oligomycin-senzitivní ATP-hydrolytická aktivita srovnatelná s hodnotami v mitochondriích izolovaných z kontrolní linie NS (tab.5.1).

**Tab. 5.1** Aktivity komplexů II a V, citrát syntázy v izolovaných mitochondriích z buněk HEK293 se stabilně down-regulovaným genem *TMEM70* (C, C2, E) a kontrolní linie NS.

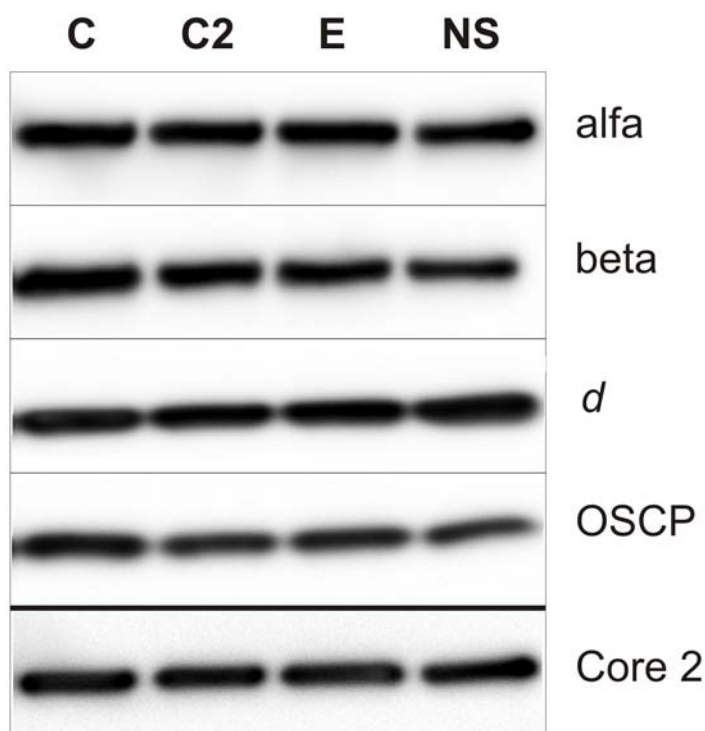
Buněčná linie	Aktivita komplexů OXPHOS (nmol/min/mg <sub>proteinu</sub> )		
	KII	KV	CS
<b>C</b>	186	154	808
<b>C2</b>	174	86	796
<b>E</b>	151	286	767
<b>NS</b>	124	333	580



**Graf 5.4** Oligomycin-senzitivní ATP-hydrolytická aktivita  $F_1F_0$ -ATP syntázy v izolovaných mitochondriích z linií C, C2, E a kontrolní linie NS. *A* - U linie C byl zaznamenán pokles aktivity o 46% v porovnání s linií NS. U linie C2 byla snížena hydrolytická aktivita na 25% kontrolních hodnot. V linii E aktivita dosahovala 86% kontrolních hodnot. *B, C* - Poměry oligomycin-senzitivní ATP-hydrolytické aktivity komplexu V k aktivitám komplexu II a citrát syntázy.

## 5.2.2 Stanovení rovnovážného množství vybraných podjednotek F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP syntázy

20 µg mitochondriálního proteinu z buněčných linií C, C2, E a NS bylo separováno pomocí SDS-elektroforézy s následným Western blotem. Pomocí specifických protilátek byly sledovány změny v rovnovážném množství podjednotek ATP syntázy  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $d$ , OSCP a podjednotky Core2 komplexu III, na kterou bylo normalizováno nanášené množství proteinu. Jak je patrné z obr. 5.1, v izolovaných mitochondriích z linií C, C2 a E nebyly zjištěny změny v rovnovážném množství sledovaných podjednotek v porovnání s kontrolou NS.



**Obr. 5.1** Analýza množství vybraných podjednotek F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP syntázy v mitochondriích z buněčných linií C, C2, E a kontroly NS. Solubilizované proteiny z mitochondriální frakce byly separovány na 12% polyakrylamidovém gelu SDS-elektroforézou. Následně provedený Western blot s imunodetekcí neodhalil snížené množství vybraných podjednotek. Podjednotka komplexu III Core2 je kontrolním proteinem.

### **5.3 Biochemická analýza buněčných linií kultivovaných kožních fibroblastů od pacientů s podezřením na deficit $F_1F_0$ -ATP syntázy**

Od 16 pacientů s podezřením na deficitní  $F_1F_0$ -ATP syntázu byly kultivovány buněčné linie fibroblastů. K dispozici byly 4 kontrolní buněčné linie kožních fibroblastů. Z buněk byla izolována mitochondriální frakce, ve které byla stanovena enzymatická aktivita komplexů OXPHOS stanovení rovnovážného množství jejich vybraných podjednotek.

#### **5.3.1 Spektrofotometrická stanovení enzymových aktivit komplexů OXPHOS**

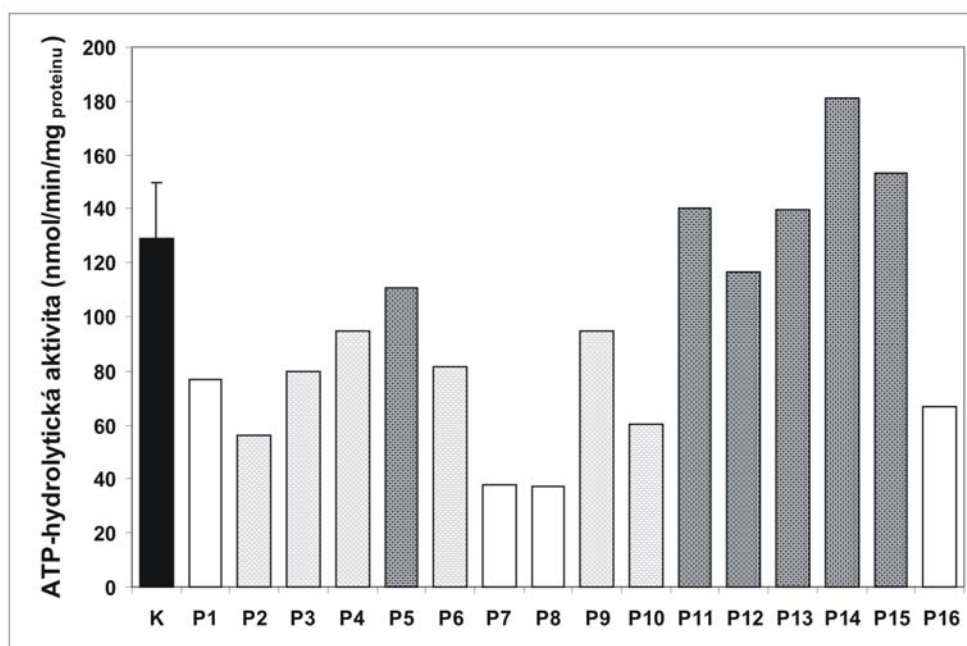
V izolovaných mitochondriích z 20 linií kožních fibroblastů byla stanovena oligomycin-senzitivní ATP-hydrolytická aktivita  $F_1F_0$ -ATP syntázy. Ve 4 kontrolních liniích fibroblastů byla stanovena aktivita 108 – 150 nmol/min/mg<sub>proteinu</sub>, která sloužila jako referenční rozmezí pro další měření. V 16 liniích fibroblastů od pacientů s podezřením nebo potvrzeným deficitem  $F_1F_0$ -ATP syntázy se hodnoty pohybovaly od 37 nmol/min/mg<sub>proteinu</sub> do 181 nmol/min/mg<sub>proteinu</sub> (tab. 5.2). Zjištěné hodnoty oligomycin-senzitivní ATP-hydrolytické aktivity  $F_1F_0$ -ATP syntázy umožnily rozdělit buněčné linie pacientů do tří skupin (graf 5.5). Skupinu A tvoří 4 linie kožních fibroblastů od pacientů (P1, P7, P8, P16) s diagnostikovanou homozygotní mutací c.317-2A>G v genu *TMEM70*. Jejich ATP-hydrolytická aktivita dosahovala hodnot 37 – 77 nmol/min/mg<sub>proteinu</sub>, což odpovídá v průměru 43% kontrolních hodnot. I poměry aktivit komplexu V ke komplexu II a citrát syntáze (CS) byly sníženy o 80% (graf 5.6). Pro další experimenty sloužila skupina A jako pozitivní kontrola. Zbýlých 12 linií kožních fibroblastů od pacientů s důvodným podezřením na deficitní  $F_1F_0$ -ATP syntázu bylo rozděleno na dvě skupiny B a C. Hodnoty ATP-hydrolytické aktivity u skupiny B tvořené z 6 buněčných linií (P2, P3, P4, P6, P9, P10) byly v rozmezí 56 – 94 nmol/min/mg<sub>proteinu</sub>. Jedná se o pokles hydrolytické aktivity na 43-76% kontrolních hodnot. Poměry aktivit komplexu V ke kontrolním enzymům komplexu II a CS byly 43-115% (graf 5.7). U skupiny C tvořené také z 6 buněčných linií (P5, P11, P12, P13, P14, P15) nebylo pozorováno snížení ATP-hydrolytické aktivity pod minimum stanoveného referenčního rozmezí (graf 5.8).

Aktivity komplexů dýchacího řetězce (kromě komplexu I, jehož aktivita nebyla z technických důvodů naměřena) byly stanoveny u všech tří skupin A, B i C (tab. 5.2). Ve skupině A byly zjištěny vyšší hodnoty aktivit (140-340%) většiny komplexů v porovnání

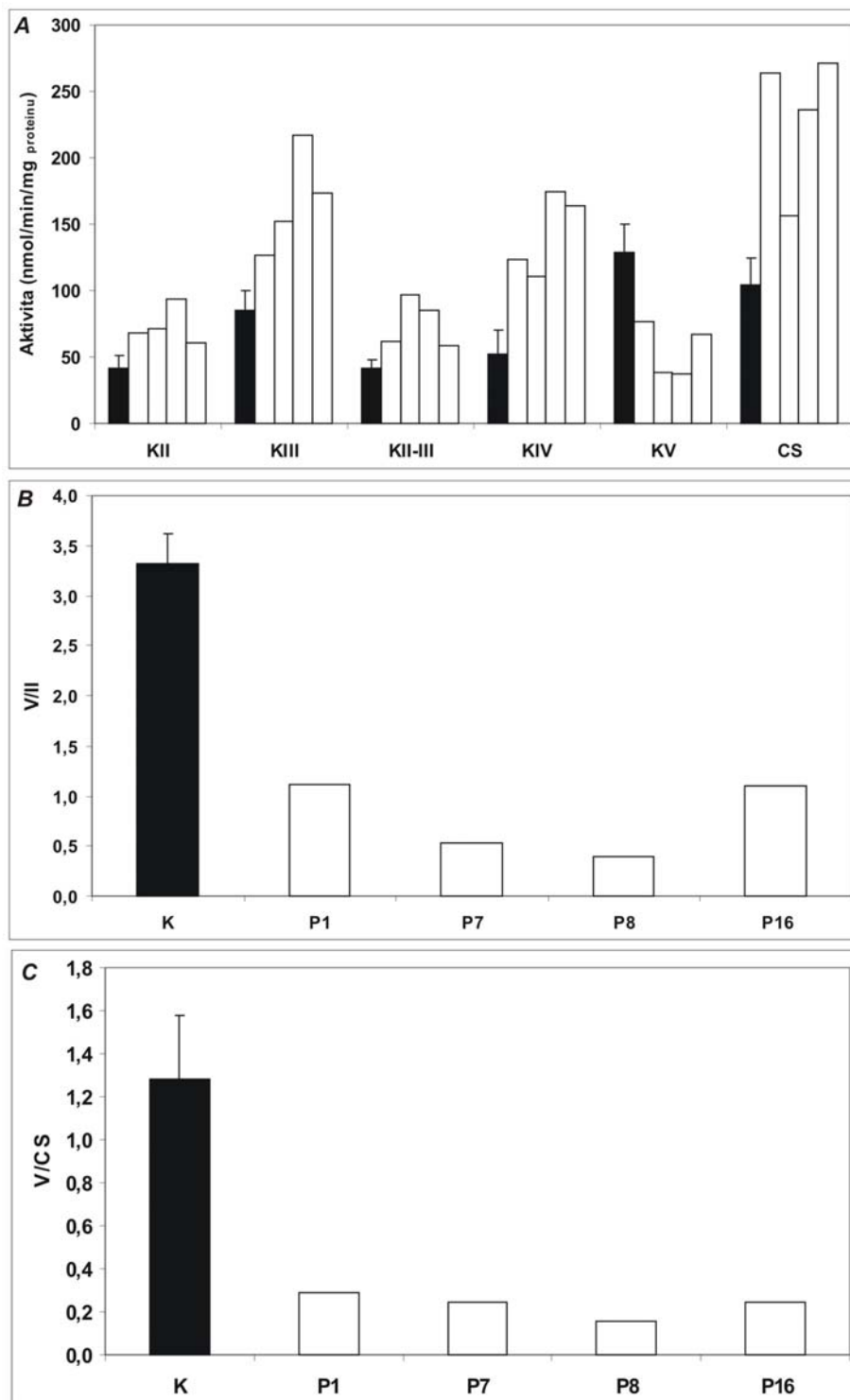
s kontrolními liniemi (graf 5.6). Zatímco u skupin B i C se hodnoty aktivit komplexů dýchacího řetězce pohybovaly v kontrolním rozmezí (graf 5.7; 5.8).

**Tab. 5.2 Aktivity komplexů OXPHOS v izolovaných mitochondriích z buněčných linií kožních fibroblastů**

Buněčná linie	Typ skupiny	Aktivity enzymových komplexů systému OXPHOS (nmol/min/mg <sub>proteinu</sub> )						
		KII	KIII	KI-III	KII-III	KIV	KV	CS
P1	A	69	126	224	62	124	77	264
P2	B	58	-	-	-	77	56	112
P3	B	67	113	241	56	73	80	134
P4	B	59	104	155	43	56	94	104
P5	C	48	65	117	42	37	110	119
P6	B	47	89	-	28	39	82	71
P7	A	71	152	287	96	110	38	156
P8	A	94	217	199	85	175	37	236
P9	B	61	-	-	-	57	94	66
P10	B	71	110	227	57	55	60	103
P11	C	-	-	-	-	-	141	84
P12	C	60	119	170	46	54	117	127
P13	C	55	-	-	-	55	140	78
P14	C	72	117	187	50	118	181	140
P15	C	65	110	170	43	78	154	92
P16	A	61	174	-	59	163	67	271
K	-	42 ± 17	85 ± 9	145 ± 18	42 ± 6	52 ± 18	129 ± 21	104 ± 20

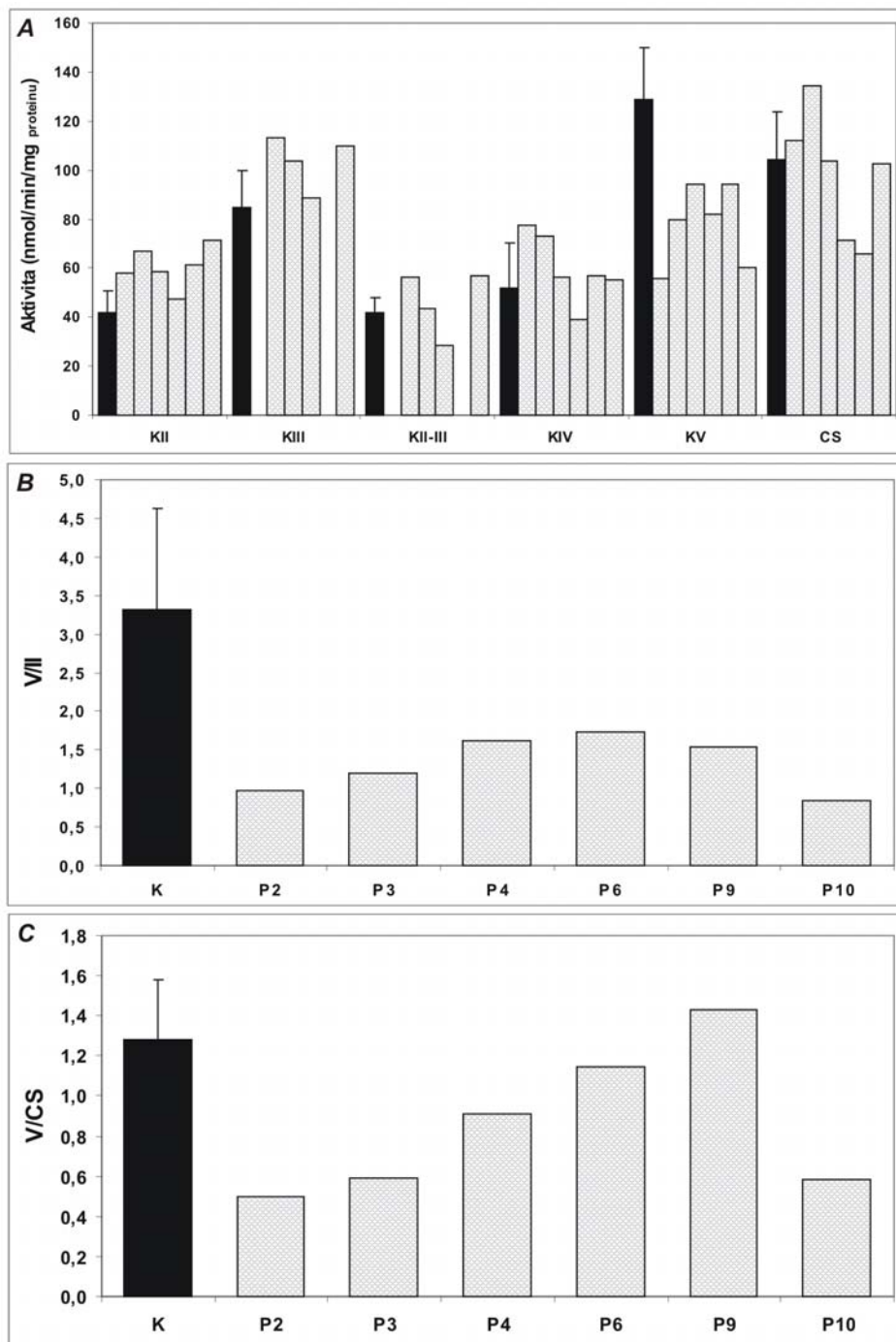


**Graf 5.5 Oligomycin-senzitivní ATP-hydrolytická aktivita  $F_1F_0$ -ATP syntázy v izolovaných mitochondriích z 16 linií kožních fibroblastů od pacientů s podezřením nebo potvrzeným deficitem  $F_1F_0$ -ATP syntázy.** Na základě zjištěných hodnot byl soubor rozdělen na skupinu A (P1, P7, P8, P16) – s mutací v genu *TMEM70*, skupinu B (P2, P3, P4, P6, P9, P10) – snížená hydrolytická aktivita pod dolní hranicí referenčního rozmezí, skupinu C (P5, P11, P12, P13, P14, P15) – hydrolytická aktivita v rozmezí referenčních hodnot.

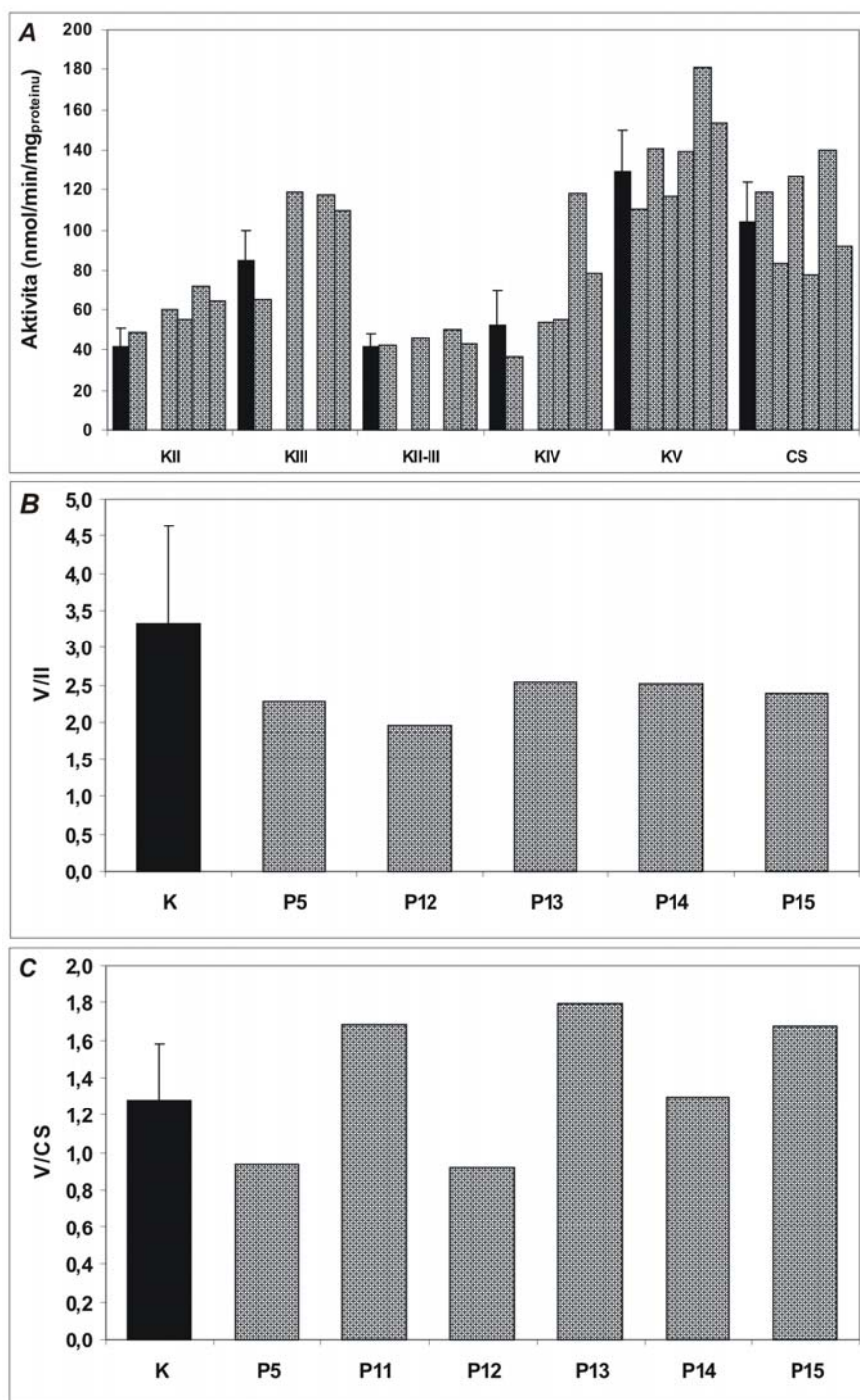


**Graf 5.6** Aktivity komplexů OXPHOS a CS v izolovaných mitochondriích ze 4 linií kožních fibroblastů s mutací c.317-2A>G v genu *TMEM70* (skupina A). *A* - Výrazně zvýšené aktivity komplexů dýchacího řetězce a CS se pohybovaly nad referenčním rozmezím, zatímco oligomycin-senzitivní ATP-hydrolytická aktivita komplexu V dosahuje 43% kontroly. *B*, *C* - Poměry aktivit komplexu V ke komplexu II a CS sníženy o 80% v porovnání s kontrolou.





*Graf 5.7* Aktivity komplexů OXPHOS a CS v izolovaných mitochondriích z 12 buněčných linií kožních fibroblastů se sníženou oligomycin-senzitivní ATP-hydrolytickou aktivitou  $F_1F_0$ -ATP-syntázy (skupina B). A - Aktivity komplexů dýchacího řetězce a CS jsou v referenčním rozmezí, ale ATP-hydrolytická aktivita je snížena na 45-76% kontroly. B, C – Znázorněné poměry aktivit komplexu V ke KII a CS se pohybují mezi 43-115% kontrolních hodnot.



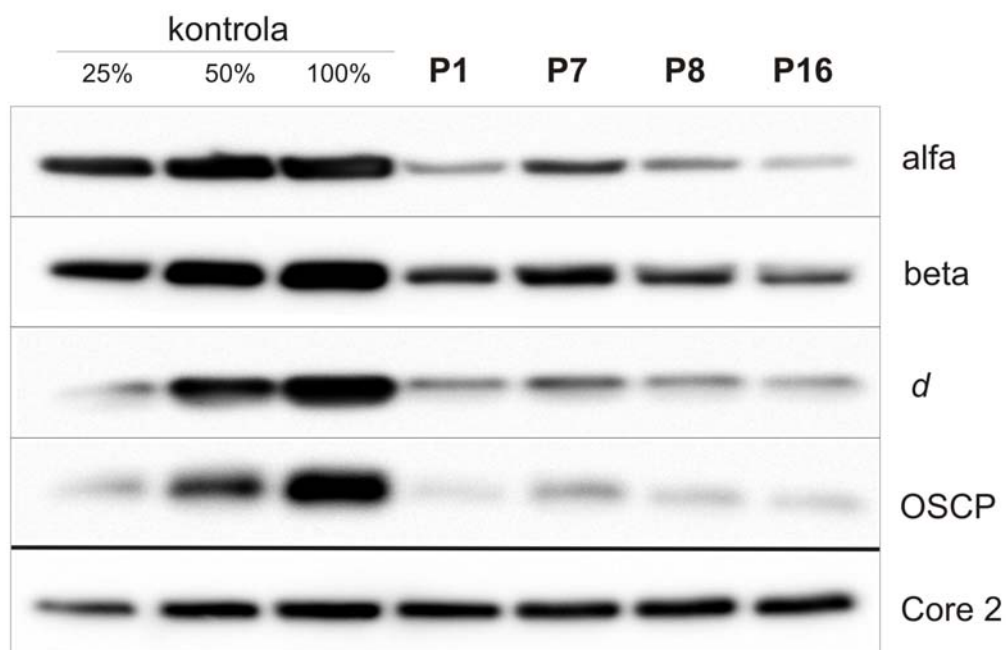
*Graf 5.8* Aktivity komplexů OXPHOS a CS v izolovaných mitochondriích z 12 buněčných linií kožních fibroblastů s nezměněnou oligomycin-senzitivní ATP-hydrolytickou aktivitou  $F_1F_0$ -ATP-syntázy (skupina C). A – Aktivity komplexů dýchacího řetězce i hydrolytická aktivita komplexu V, spolu se stanovenými poměry aktivit komplexu V ke KII a CS (B, C) byly v rozmezí kontrolních hodnot.

### **5.3.2 Stanovení rovnovážného množství komplexů OXPHOS a jejich vybraných podjednotek v liniích kožních fibroblastů se sníženou oligomycin-senzitivní ATP-hydrolytickou aktivitou**

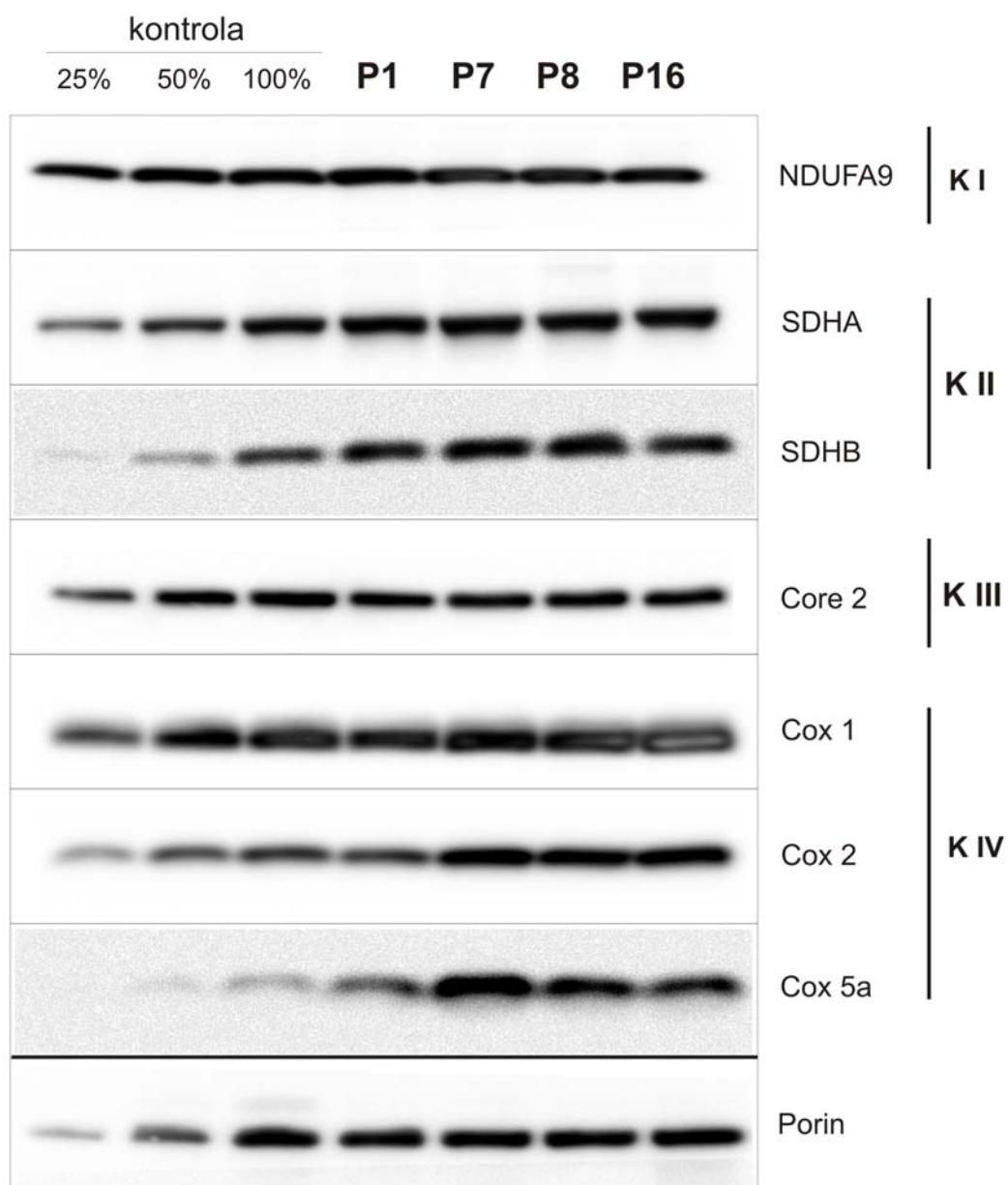
SDS-elektroforézou bylo separováno 20  $\mu\text{g}$  izolovaných mitochondrií z buněčných linií fibroblastů od pacientů skupiny A a B. Následným Western blotem a imunodetekcí byly studovány změny v množství podjednotek  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $d$ , OSCP komplexu V u skupiny A i B. Na základě zvýšených aktivit komplexů dýchacího řetězce a CS ( $>100\%$  kontrolních hodnot) v izolovaných mitochondriích z buněčných linií skupiny A byla provedena analýza rovnovážného množství podjednotek komplexů dýchacího řetězce.

U skupiny A bylo zjištěno výrazné snížení všech studovaných podjednotek ATPsyntázy dosahující  $\leq 25\%$  kontroly (obr. 5.2). Zatímco množství detekovaných podjednotek SDHA a SDHB (komplexu II), Cox2 a Cox5a (komplexu IV) bylo mírně zvýšeno v porovnání s kontrolou (obr. 5.3). Množství podjednotky NDUFA9 (komplex I) a Core2 (komplex III) bylo srovnatelné s kontrolou.

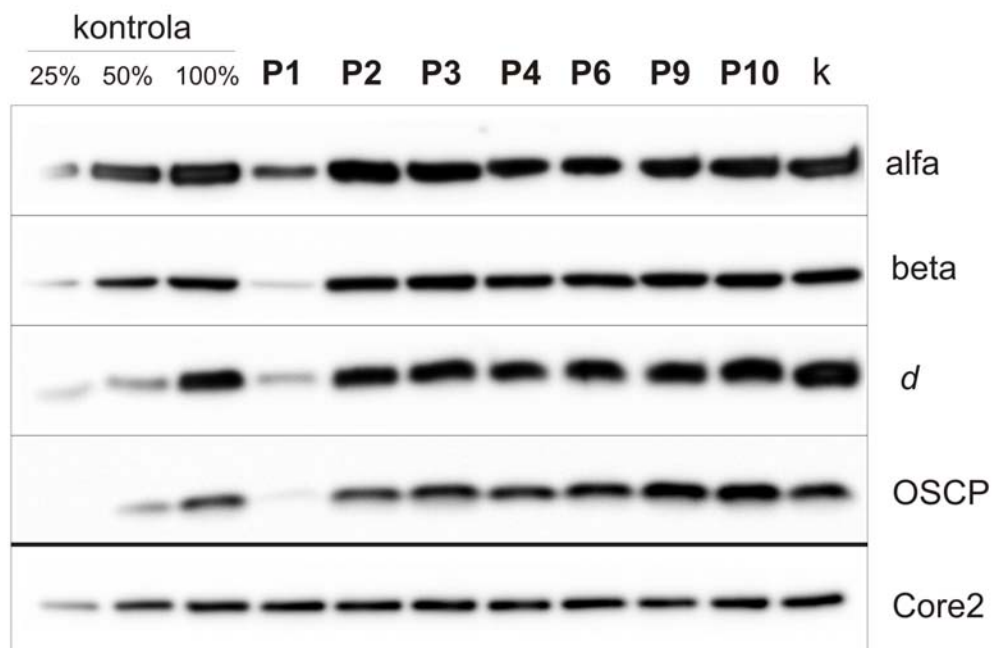
Ve skupině B nebyly zjištěny změny v rovnovážném množství vybraných podjednotek  $F_1$ - a  $F_0$ -domény ATPsyntázy (obr. 5.4). S cílem zjistit případné změny v rovnovážném množství nebo assemblaci komplexu  $F_1F_0$ -ATPsyntázy byla provedena také nativní elektroforéza (BN-PAGE) na digitoninem permeabilizovaných fibroblastech. Pomocí BN-PAGE bylo separováno 20  $\mu\text{g}$  proteinové mitochondriální frakce. Při imunodetekci byl holoenzym  $F_1F_0$ -ATPsyntázy značen monoklonální protilátkou proti podjednotce  $\alpha$  (obr. 5.5). Analýzou BN-PAGE nebylo prokázáno snížené množství komplexu V v buněčných liniích fibroblastů pacientů skupiny B, ani nebyla pozorována přítomnost asemblačních intermediátů.



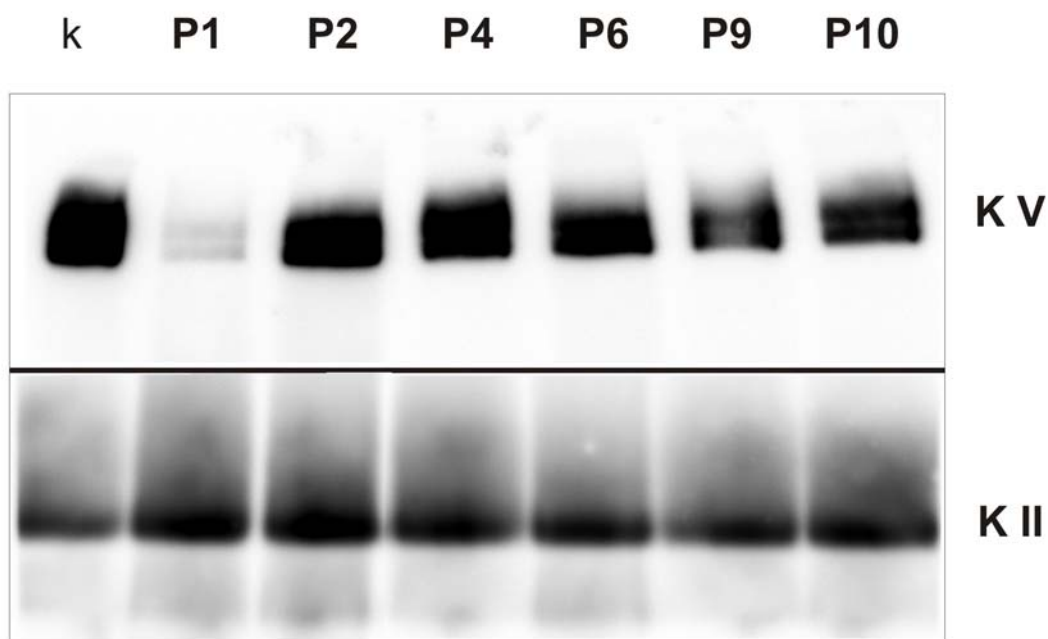
**Obr. 5.2 Analýza rovnovážného množství vybraných podjednotek F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP syntázy u buněčných linií skupiny A.** Na 12% polyakrylamidovém gelu bylo během SDS-elektroforézy separováno 20 µg mitochondriální proteinové frakce. Western blot s imunodetekcí prokázal snížené množství všech vybraných podjednotek na řádově  $\geq 25\%$  kontroly.



**Obr. 5.3** Analýza rovnovážného množství vybraných podjednotek komplexů dýchacího řetězce u buněčných linií skupiny A v izolovaných mitochondriích. U podjednotek SDHA a SDHB komplexu II a Cox2 a Cox5a komplexu IV bylo zjištěno zvýšené množství (>100% kontroly). U komplexů I a III množství podjednotek odpovídá 100% kontrole normalizované na kontrolní protein vnější mitochondriální membrány - porin.



**Obr. 5.4 Analýza rovnovážného množství vybraných podjednotek  $F_1F_0$ -ATP syntázy u buněčných linií skupiny B.** 20  $\mu$ g mitochondriálního proteinu bylo separováno pomocí SDS-elektroforézy s následným Western blotem a imunodetekcí. Množství studovaných podjednotek bylo srovnatelné s kontrolou. Vzorek P1 ze skupiny A byl použit jako pozitivní kontrola.



**Obr. 5.5 Analýza rovnovážného množství komplexu  $F_1F_0$ -ATP syntázy pomocí BN-PAGE s následným Western blotem u buněčných linií skupiny B.** 20  $\mu\text{g}$  proteinu z digitoninem permeabilizovaných fibroblastů bylo rozděleno v nativním gradientu 6-15%. Na PVDF membráně byl holoenzym komplexu V detekován monoklonální primární protilátkou proti  $\alpha$ -podjednotce. Nebylo zjištěno snížené množství holoenzymu komplexu V, ani přítomnost assemblyních intermediátů. Vzorek P1 ze skupiny A byl použit jako pozitivní kontrola. Vzorek P3 nebyl z důvodu nedostatku dalšího materiálu analyzován.

#### 5.4 Sekvenování mitochondriálních genů *MT-ATP6*, *MT-ATP8*

K sekvenační analýze jediných dvou genů  $F_1F_0$ -ATP syntázy kódovaných mtDNA *MT-ATP6* a *MT-ATP8* byla využita DNA izolovaná ze svalové biopsie od pacientů P2, P4, P9, P10.

V genech *MT-ATP6* a *MT-ATP8* nebyla zjištěna přítomnost patogenní mutace a byly identifikovány pouze známé polymorfismy. V genu *MT-ATP6* byly identifikovány dva polymorfismy, z nichž 8860A>G byl přítomen u všech sekvenovaných vzorků DNA od pacientů P2, P4, P9, P10 (tab. 5.3).

Tab. 5.3 Zjištěné polymorfismy u P2, P4, P9, P10 v genu *MT-ATP6*

Vzorek	Nalezené polymorfismy
<b>P2</b>	8701A>G, 8860A>G
<b>P4</b>	8860A>G
<b>P9</b>	8860A>G
<b>P10</b>	8860A>G



## 6 Diskuze

Cílem práce bylo charakterizovat mitochondriální energetický metabolismus v buněčných liniích C, C2 a E, které vykazují stabilně sníženou expresi genu *TMEM70*, a v kultivovaných fibroblastech od 16 pacientů s deficitem nebo s podezřením na deficit  $F_1F_0$ -ATP syntázy. Studovala jsem jak aktivity  $F_1F_0$ -ATP syntázy a ostatních komplexů OXPHOS tak i případné změny v rovnovážném množství vybraných podjednotek  $F_1F_0$ -ATP syntázy separovaných SDS-elektroforézou, popř. analýzou stavu celého komplexu  $F_1F_0$ -ATP syntázy s využitím nativní elektroforézy (Schagger a von Jagow 1991).

### **6.1 Optimalizace stanovení oligomycin-senzitivní ATP-hydrolytické aktivity $F_1F_0$ -ATP syntázy v izolovaných mitochondriích z kultivovaných buněk**

Způsob stanovení oligomycin-senzitivní ATP-hydrolytické aktivity  $F_1F_0$ -ATP syntázy podle protokolu Rustin *et al.* (1994) jsem optimalizovala pro jeho využití na izolovaných mitochondriích z kultivovaných buněk. Pro lineární průběh reakce bylo nutné zvolit vhodné vstupní množství mitochondriálního proteinu a dodržovat žádoucí pracovní podmínky (temperování komponent reakce na 37°C). Spolu se stanovením vstupního množství mitochondriálního proteinu pro změření ATP-hydrolytické aktivity komplexu V (30 µg) bylo zjištěno také jeho množství pro naměření aktivit komplexů dýchacího řetězce a kontrolního enzymu citrát syntázy (CS), které bylo poloviční – 15 µg. Všechna měření enzymových aktivit komplexů OXPHOS (I, II, III, I-III, II-III, IV, V) a CS byla provedena v dubletu a pro jejich stanovení bylo zapotřebí celkem 270 µg mitochondriálního proteinu. Toto množství odpovídá ¼ kultivační lahve (75 cm<sup>2</sup>) buněk HEK293 nebo 11 kultivačním lahvím (75 cm<sup>2</sup>) fibroblastů. Z hlediska potřebného materiálu a doby kultivace jde v případě stanovení enzymových aktivit u fibroblastů o časově náročnou přípravu. Optimalizovaná stanovení enzymových aktivit byla využita k popisu biochemického profilu 3 buněčných linií HEK293 (C, C2, E) se stabilně sníženou expresí genu *TMEM70* a buněčných linií fibroblastů od 4 pacientů s diagnostikovaným postižením  $F_1F_0$ -ATP syntázy a 12 pacientů s podezřením na deficit  $F_1F_0$ -ATP syntázy.

Zvolený způsob měření ATP-hydrolytické aktivity podle Rustin *et al.* (1994) podává informaci o míře intaktnosti  $F_1F_0$ -ATP syntázy, jelikož se pro odstínění nespecifické aktivity

používá oligomycin. Přesný mechanismus, kterým podjednotka Fo-domény OSCP propůjčuje sensitivitu k tomuto inhibitoru, není znám. Ale oligomycin sehraává roli v inhibici protonové translokace (Slater 1967). F<sub>1</sub>-doména je ATP-hydrolyticky aktivní částí enzymu, pokud je oddělena od F<sub>0</sub>-domény, náchylnost k oligomycinu klesá. Oproti jiným inhibitorům (antibiotika auroventrin, efrapeptiny), které interagují s  $\alpha$ - a  $\beta$ -podjednotkami F<sub>1</sub>-domény a mohou inhibovat hydrolytickou aktivitu F<sub>1</sub>-ATPázy odpráženou od translokace protonů (Gledhill a Walker 2006), se oligomycin váže pouze na intaktní enzym. Buněčné linie studovaných kultivovaných buněk vykazovaly během měření oligomycin-senzitivní ATP-hydrolytické aktivity komplexu V poměrně vysokou citlivost na oligomycin, což poukazuje na tu funkční část populace F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-syntázy, která zůstává ve vnitřní mitochondriální membráně intaktní.

## **6.2 Buněčné linie HEK293 se stabilně sníženou expresí genu *TMEM70***

### **6.2.1 Charakterizace buněčných linií stanovením oligomycin-senzitivní ATP-hydrolytické aktivity F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-syntázy, enzymových aktivit komplexů dýchacího řetězce a CS**

U buněčných liniích C, C2, E se stabilně sníženou expresí genu *TMEM70* byla naměřena snížená ATP-hydrolytická aktivita komplexu V potvrzující fenotyp buněk, který souvisí se sníženou expresí genu *TMEM70*, jehož proteinový produkt Tmem70p asistuje během biogeneze ATP-syntázy. Hodnoty u linií C2 a C dosahovaly 25%, resp. 46% hodnot kontrolní linie NS. U linie E nebylo snížení ATP-hydrolytické aktivity tak výrazné, dosahovalo úrovně 86% kontrolních hodnot. Enzymové aktivity komplexů dýchacího řetězce byly srovnatelné s kontrolou NS. V případě komplexu II a CS se jednalo o navýšení aktivit na 120-150% kontrolních hodnot.

### **6.2.2 Charakterizace buněčných linií na proteinové úrovni**

Z již dříve provedených analýz u buněčných linií C, C2, E byla zjištěna snížená hladina transkriptů genu *TMEM70* u linie C na 60%, u linie C2 na 70% a u linie E na 45% v porovnání s kontrolní linií NS. V izolovaných mitochondriích z těchto buněk nebylo pomocí BN-PAGE zjištěno výrazně snížené množství komplexu F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-syntázy. Bohužel z důvodu absence dostatečně specifické protilátky pro detekci proteinu Tmem70 nebylo možné stanovit

hladinu tohoto proteinu v uvedených buněčných liniích. Z naměřených dat ATP-hydrolytické aktivity v liniích C, C2, E by se dalo očekávat, že zjištěná snížená aktivita komplexu V bude korespondovat s poklesem v množství podjednotek  $F_1F_0$ -ATP syntázy separovaných SDS-elektroforézou a pozorovatelným snížením komplexu na nativní elektroforéze z důvodu down-regulované exprese genu *TMEM70*. Výsledná data z Western blotu tato očekávání nepotvrdila. Nepřítomnost výrazných změn v rovnovážném množství podjednotek  $F_1F_0$ -ATP syntázy a samotného komplexu může být vysvětlena tím, že i když snížené tak stále dostatečné množství transkriptu pokryje potřebnou produkci proteinu Tmem70 pro dostatečnou biogenezi komplexu V. Jiná skutečnost byla popsána u buněk HEK293, kde byl down-regulován jaderný strukturní gen  $F_1F_0$ -ATP syntázy *ATP5E* kódující podjednotku  $\epsilon$  (hladina transkriptu byla u 3 transfekovaných linií HEK293 snížena na 16%, 47% a 29%) (Havlíčková *et al.* 2010). Funkce podjednotky  $\epsilon$  není zcela jasná, ale má roli nejen jako strukturní komponenta centrální stopky, je důležitá také v biogenezi  $F_1F_0$ -ATP syntázy. Fenotyp buněk se sníženou expresí genu *ATP5E* se shodoval s výše popsanými buněčnými liniemi C, C2, E pouze v poklesu oligomycin-senzitivní ATP-hydrolytické aktivity  $F_1F_0$ -ATP syntázy (54-64%, respektive 25-86%). Hodnoty v závislosti na inhibici oligomycinem naznačují snížené zastoupení intaktního komplexu  $F_1F_0$ -ATP syntázy u obou typů buněk. Ale pouze u buněk s down-regulovaným genem *ATP5E* bylo analyzované množství vybraných podjednotek a holoenzymu  $F_1F_0$ -ATP syntázy snížené, navíc s nově pozorovanou akumulací agregátů z *c*-podjednotek (Havlíčková *et al.* 2010). Snížená oligomycin-senzitivní ATP-hydrolytická aktivita bez poklesu množství podjednotek komplexu V u buněčných linií se stabilně sníženou expresí genu *TMEM70* naznačuje, že mírný deficit proteinu Tmem70 pravděpodobně může destabilizovat enzymový komplex, ale nevede k výrazné poruše biogeneze  $F_1F_0$ -ATP syntázy.

### **6.3 Buněčné linie kožních fibroblastů od pacientů s deficitem $F_1F_0$ -ATP syntázy**

#### **6.3.1 Charakterizace buněčných linií stanovením oligomycin-senzitivní ATP-hydrolytické aktivity $F_1F_0$ -ATP syntázy, enzymových aktivit komplexů dýchacího řetězce a CS**

Stanovením ATP-hydrolytické aktivity komplexu V v izolovaných mitochondriích z 16 linií kultivovaných fibroblastů od pacientů byl soubor rozdělen do 3 skupin. 4 buněčné linie kožních fibroblastů od pacientů s potvrzeným deficitem  $F_1F_0$ -ATP syntázy způsobeným

homozygotní mutací c.317-2A>G v genu *TMEM70*, která byla u všech 4 pacientů letální (skupina A). Nefunkčnost komplexu V způsobila ve velké míře poškození svalových buněk vedoucí k závažné hypertrofické kardiomyopatii, poklesu svalového tonu u kosterního svalstva (Honzík *et al.* 2010). Naměřené ATP-hydrolytické aktivity komplexu V dosahovaly nízkých hodnot v průměru 43% kontrolních vzorků. Skupinu B tvoří buněčné linie kožních fibroblastů od 6 pacientů s důvodným podezřením na deficienci  $F_1F_0$ -ATP-syntázy. Jak dokládá tab. 6.1, klinická manifestace je u těchto pacientů závažná a heterogenita v orgánovém poškození je typická pro mitochondriální onemocnění. Ze stanovených hodnot ATP-hydrolytické aktivity komplexu V lze pozorovat pokles pohybující se v rozmezí 43-76% kontrolních hodnot.

U zbývajících 6 linií kultivovaných fibroblastů nebyly naměřeny snížené hodnoty ATP-hydrolytické aktivity komplexu V a proto nebyly předmětem dalších studií (skupina C). Tím se však nevylučuje jejich případný defekt v  $F_1F_0$ -ATP-syntáze, který se nemusí projevovat poškozením této katalytické funkce enzymu.

**Tab. 6.1 Klinické příznaky pacientů se sníženou oligomycin-senzitivní ATP-hydrolytickou aktivitou  $F_1F_0$ -ATP-syntázy v izolovaných mitochondriích z kožních fibroblastů (skupina B)**

Pacient	Věk	Klinická manifestace
P2	11 let	od 12 měsíců neuropatie, neprospívání, porucha růstu, mikrocefalie, svalová hypotonie, od 7 let rozvoj CPEO, ptózy a strabismu
P3	6 let	od novorozeneckého věku centrální hypotonický syndrom, kvadruspasticita, psychomotorická retardace, epilepsie, neprospívání, dysgeneze corpus callosum, kraniofaciální dysmorfie, mírná laktátová acidóza
P4	10 měsíců (exitus)	od novorozeneckého věku hypotonie, epilepsie, porucha zraku a sluchu, mikrocefalie, mozková atrofie, dystrofizace, laktátová acidóza
P6	4 roky	od novorozeneckého věku kvadruspasticita, ataky dystonie, farmakorezistentní epilepsie, mikrocefalie, zástava psychomotorického vývoje, kongenitální ichtyóza, mírná laktátová acidóza
P9	6 let	od novorozeneckého věku hypotonie, dystonie, zástava vývoje, Leigh syndrom od 4 měsíců, iktu podobné příhody, laktátová acidóza
P10	11 let	od novorozeneckého věku hypotonie, těžká psychomotorická retardace se zástavou vývoje, MRI v 6 letech bez patologického nálezu

Enzymové aktivity komplexů dýchacího řetězce a citrát-syntázy naměřené na mitochondriích izolovaných z linií fibroblastů skupiny B i C vykazovaly nesnížené hodnoty pohybující se v kontrolním rozmezí. U mitochondrií izolovaných z linií fibroblastů skupiny A byly naměřené hodnoty aktivit komplexů dýchacího řetězce i citrát-syntázy nadlimitní,

dosahující 140-340% kontrolních hodnot. Stejný trend vykazovaly buněčné linie (C, C2, E) se stabilně sníženou expresí genu *TMEM70* v rámci komplexu II a citrát-syntázy. Společným rysem těchto buněčných linií je úplný (fibroblasty skupiny A) nebo částečný (linie C, C2, E) deficit genu *TMEM70*. U *TMEM70*-deficientních pacientů kolabuje biogeneze  $F_1F_0$ -ATP-syntázy, ve vnitřní mitochondriální membráně chybí dostatečné množství složeného enzymového komplexu, který by fosforyloval ADP na úkor spotřeby protonů z intermembránového prostoru. Odpovědí na nedostatečnost  $F_1F_0$ -ATP-syntázy se zdá být hyperfunkční nasazení komplexů dýchacího řetězce. Tento efekt spíše škodí, než-li by dopad defektu zmírňoval. Jelikož protonmotivní síla v intermembránovém prostoru neklesá a narůstající mitochondriální membránový potenciál může spustit tvorbu volných kyslíkových intermediátů (ROS) (Houštěk *et al.* 2004).

### 6.3.2 Charakterizace buněčných linií na proteinové úrovni

Izolovaný defekt  $F_1F_0$ -ATP-syntázy diagnostikovaný u pacientů ze svalové biopsie byl potvrzen také u fibroblastů s nízkou ATP-hydrolytickou aktivitou (skupiny A). Hodnoty aktivit komplexu V korelovaly se sníženým množstvím holoenzymu na nativní elektroforéze. Což je v souladu se studii jiných mutovaných jaderných genů kódující biogenetické faktory komplexů OXPHOS, v případě  $F_1F_0$ -ATP-syntázy jde o publikovanou mutaci v genu *ATPAF2* (De Meirleir *et al.* 2004). Snížené množství podjednotek  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $d$  a OSCP spolu se sníženým množstvím holoenzymu  $F_1F_0$ -ATP-syntázy ilustruje důležitost proteinu *Tmem70* pro biogenezi tohoto komplexu. Stejně patrný pokles v množství podjednotek byl také analyzován v případě mutovaného genu *ATPAF2* (De Meirleir *et al.* 2004) kódující  $F_1$ -specifický biogenetický faktor *Atpaf2* a *ATP5E* kódující podjednotku  $\epsilon$  (Mayr *et al.* 2010). Pozorovaný trend nárůstu enzymových aktivit u komplexů dýchacího řetězce byl potvrzen v buněčných liniích kožních fibroblastů (skupina A) i na proteinové úrovni u podjednotek SDHA a SDHB komplexu II a podjednotek *Cox2* a *Cox5a* komplexu IV, jejichž množství dosahovalo 100-200% kontrolního vzorku. Tato snaha o kompenzaci defektu  $F_1F_0$ -ATP-syntázy způsobené mutací v jaderném genu *TMEM70* byla popsána i v případě missense mutace jaderného strukturního genu  $F_1F_0$ -ATP-syntázy *ATP5E*. Nárůst v množství se týkal vybraných podjednotek všech komplexů dýchacího řetězce, ale hodnoty enzymových aktivit komplexů dýchacího řetězce a CS se pohybovaly v rozmezí kontrolních hodnot (Mayr *et al.* 2010). Stejně tomu bylo i u naměřených enzymových aktivit ve svalových buňkách u pacienta s mutovaným genem *ATPAF2* (De Meirleir *et al.* 2004). Výrazně vysoké hodnoty

aktivit spolu se zvýšeným množstvím některých podjednotek komplexů dýchacího řetězce se zdají být unikátní pro buněčné linie s mutací v genu *TMEM70*.

Pokles ATP-hydrolytické aktivity komplexu V zaznamenaný v izolovaných mitochondriích z buněčných linií kožních fibroblastů (skupina B) nebyl doprovázen sníženým množstvím vybraných podjednotek  $F_1F_0$ -ATP syntázy ani nízkým obsahem holoenzymu a přítomností asemblačních intermediátů na nativní elektroforéze. Sekvenováním strukturních mitochondriálních genů *MT-ATP6* a *MT-ATP8* ve vzorcích dostupné DNA od pacientů ze skupiny B nebyla nalezena patogenní mutace. Pro doposud známé mutace v genu *MT-ATP6* je typická přítomnost  $F_1$ -asemblačních intermediátů z důvodu poškozené *a*-podjednotky a tím negativně ovlivněné biogeneze  $F_1F_0$ -ATP syntázy (Houštěk *et al.* 1995). Biochemickým projevem mutace v genu *MT-ATP8* je typicky nízká sensitivita k oligomycinu, která koreluje se sníženým obsahem holoenzymu doprovázený navýšeným množstvím asemblačních intermediátů (Jonckheere *et al.* 2008). Pro zjištění příčiny nízké hydrolytické aktivity  $F_1F_0$ -ATP syntázy u kožních fibroblastů (skupina B) by bylo proto vhodné provést mutační analýzu jaderně kódovaných genů pro strukturní podjednotky  $F_1F_0$ -ATP syntázy.

## 7 Shrnutí

- Byla optimalizována spektrofotometrická metoda pro stanovení oligomycin-senzitivní ATP-hydrolytické aktivity enzymu  $F_1F_0$ -ATP syntázy v mitochondriální frakci izolované z kultivovaných buněk.
- Optimalizace byla provedena i u spektrofotometrických měření aktivit komplexů dýchacího řetězce a kontrolního enzymu citrát syntázy (CS).
- Pro stanovení enzymových aktivit komplexů (I, II, III, I-III, II-III, IV, V) a CS bylo spotřebováno 270  $\mu\text{g}$  mitochondriálního proteinu. Toto množství odpovídá  $\frac{1}{4}$  kultivační lahve ( $75\text{ cm}^2$ ) HEK293 buněk, ale přibližně 11 kultivačním lahvám ( $75\text{ cm}^2$ ) fibroblastů.
- U buněčných linií HEK293 (C, C2, E) se stabilně sníženou expresí genu *TMEM70* byla nalezena snížená ATP-hydrolytická aktivita komplexu V. Aktivity komplexů dýchacího řetězce a CS se pohybovaly v kontrolním rozmezí. V případě komplexu II a CS byly hodnoty mezi 120-150% kontrolní linie NS. Nebylo zjištěno snížené množství vybraných podjednotek  $F_1F_0$ -ATP syntázy. I přes snížené množství transkriptů genu *TMEM70* je pravděpodobně produkováno dostatek proteinu Tmem70.
- 16 členný soubor kultivovaných fibroblastů od pacientů byl podle naměřené oligomycin-senzitivní ATP-hydrolytické aktivity rozdělen na 3 skupiny. 4 buněčné linie od *TMEM70*-deficientních pacientů (sk.A) a 6 buněčných linií od pacientů s podezřením na deficit  $F_1F_0$ -ATP syntázy (sk.B) vykazovaly výrazně snížené hodnoty pod spodní hranicí kontrolního rozmezí. ATP-hydrolytická aktivita u 6 buněčných linií od pacientů s podezřením na defekt  $F_1F_0$ -ATP syntázy (sk.C) se pohybovala v referenčním rozmezí, proto nebyly předmětem dalšího studia. Enzymové aktivity stanovené u komplexů dýchacího řetězce všech buněčných linií kožních fibroblastů byly srovnatelné s kontrolními hodnotami. V liniích fibroblastů skupiny A byly pozorovány zvýšené aktivity komplexů dýchacího řetězce a CS nad maximem referenčních hodnot. Nárůst se potvrdil i na proteinové úrovni u vybraných podjednotek komplexů dýchacího řetězce.
- U linií fibroblastů skupiny A bylo pozorováno výrazné snížení hladin podjednotek ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $d$ , OSCP)  $F_1F_0$ -ATP syntázy, množství holoenzymu na BN-PAGE bylo nepatrné ve srovnání s kontrolou. U linií fibroblastů skupiny B nebyl proteinovou analýzou potvrzen pokles v rovnovážném množství vybraných podjednotek ani samotného komplexu  $F_1F_0$ -ATP syntázy.

- Sekvenační analýza mitochondriálních genů *MT-ATP6* a *MT-ATP8* v dostupné DNA od pacientů se sníženou ATP-hydrolytickou aktivitou v liniích kultivovaných fibroblastů (skupina B) nebyla nalezena patogenní mutace.



## 8 Seznam použité literatury

- Abrahams, J. P., Leslie, A. G., Lutter, R., Walker, J. E. (1994). "Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria." *Nature* **370**(6491): 621-8.
- Ackerman, S. H. (2002). "Atp11p and Atp12p are chaperones for F(1)-ATPase biogenesis in mitochondria." *Biochim Biophys Acta* **1555**(1-3): 101-5.
- Ackerman, S. H., Tzagoloff, A. (1990a). "ATP10, a yeast nuclear gene required for the assembly of the mitochondrial F1-F0 complex." *J Biol Chem* **265**(17): 9952-9.
- Ackerman, S. H., Tzagoloff, A. (1990b). "Identification of two nuclear genes (ATP11, ATP12) required for assembly of the yeast F1-ATPase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(13): 4986-90.
- Ackerman, S. H., Tzagoloff, A. (2005). "Function, structure, and biogenesis of mitochondrial ATP synthase." *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **80**: 95-133.
- Aksimentiev, A., Balabin, I. A., Fillingame, R. H., Schulten, K. (2004). "Insights into the molecular mechanism of rotation in the Fo sector of ATP synthase." *Biophys J* **86**(3): 1332-44.
- Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., de Bruijn, M. H., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I. C., Nierlich, D. P., Roe, B. A., Sanger, F., Schreier, P. H., Smith, A. J., Staden, R., Young, I. G. (1981). "Sequence and organization of the human mitochondrial genome." *Nature* **290**(5806): 457-65.
- Arnold, I., Pfeiffer, K., Neupert, W., Stuart, R. A., Schagger, H. (1998). "Yeast mitochondrial F1F0-ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits." *EMBO J* **17**(24): 7170-8.
- Belogradov, G. I. (2009). "Recent advances in structure-functional studies of mitochondrial factor B." *J Bioenerg Biomembr* **41**(2): 137-43.
- Belogradov, G. I., Hatefi, Y. (2002). "Factor B and the mitochondrial ATP synthase complex." *J Biol Chem* **277**(8): 6097-103.
- Bianchet, M. A., Hullihen, J., Pedersen, P. L., Amzel, L. M. (1998). "The 2.8-Å structure of rat liver F1-ATPase: configuration of a critical intermediate in ATP synthesis/hydrolysis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(19): 11065-70.
- Bornhvd, C., Vogel, F., Neupert, W., Reichert, A. S. (2006). "Mitochondrial membrane potential is dependent on the oligomeric state of F1F0-ATP synthase supracomplexes." *J Biol Chem* **281**(20): 13990-8.
- Bowler, M. W., Montgomery, M. G., Leslie, A. G., Walker, J. E. (2007). "Ground state structure of F1-ATPase from bovine heart mitochondria at 1.9 Å resolution." *J Biol Chem* **282**(19): 14238-42.
- Boyer, P. D. (1993). "The binding change mechanism for ATP synthase--some probabilities and possibilities." *Biochim Biophys Acta* **1140**(3): 215-50.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* **72**: 248-54.
- Cabezon, E., Arechaga, I., Jonathan, P., Butler, G., Walker, J. E. (2000). "Dimerization of bovine F1-ATPase by binding the inhibitor protein, IF1." *J Biol Chem* **275**(37): 28353-5.
- Cabezon, E., Montgomery, M. G., Leslie, A. G., Walker, J. E. (2003). "The structure of bovine F1-ATPase in complex with its regulatory protein IF1." *Nat Struct Biol* **10**(9): 744-50.
- Cabezon, E., Runswick, M. J., Leslie, A. G., Walker, J. E. (2001). "The structure of bovine IF(1), the regulatory subunit of mitochondrial F-ATPase." *EMBO J* **20**(24): 6990-6.

- Campos, Y., Martin, M. A., Rubio, J. C., Solana, L. G., Garcia-Benayas, C., Terradas, J. L., Arenas, J. (1997). "Leigh syndrome associated with the T9176C mutation in the ATPase 6 gene of mitochondrial DNA." *Neurology* **49**(2): 595-7.
- Capaldi, R. A., Aggeler, R. (2002). "Mechanism of the F(1)F(0)-type ATP synthase, a biological rotary motor." *Trends Biochem Sci* **27**(3): 154-60.
- Carrozzo, R., Murray, J., Santorelli, F. M., Capaldi, R. A. (2000). "The T9176G mutation of human mtDNA gives a fully assembled but inactive ATP synthase when modeled in *Escherichia coli*." *FEBS Lett* **486**(3): 297-9.
- Carrozzo, R., Tessa, A., Vazquez-Memije, M. E., Piemonte, F., Patrono, C., Malandrini, A., Dionisi-Vici, C., Vilarinho, L., Villanova, M., Schagger, H., Federico, A., Bertini, E., Santorelli, F. M. (2001). "The T9176G mtDNA mutation severely affects ATP production and results in Leigh syndrome." *Neurology* **56**(5): 687-90.
- Castagna, A. E., Addis, J., McInnes, R. R., Clarke, J. T., Ashby, P., Blaser, S., Robinson, B. H. (2007). "Late onset Leigh syndrome and ataxia due to a T to C mutation at bp 9,185 of mitochondrial DNA." *Am J Med Genet A* **143A**(8): 808-16.
- Cizkova, A., Stranecky, V., Mayr, J. A., Tesarova, M., Havlickova, V., Paul, J., Ivanek, R., Kuss, A. W., Hansikova, H., Kaplanova, V., Vrbacky, M., Hartmannova, H., Noskova, L., Honzik, T., Drahota, Z., Magner, M., Hejzlarova, K., Sperl, W., Zeman, J., Houstek, J., Kmoch, S. (2008). "TMEM70 mutations cause isolated ATP synthase deficiency and neonatal mitochondrial encephalocardiomyopathy." *Nat Genet* **40**(11): 1288-90.
- Clayton, D. A. (1992). "Structure and function of the mitochondrial genome." *J Inherit Metab Dis* **15**(4): 439-47.
- Cortes-Hernandez, P., Vazquez-Memije, M. E., Garcia, J. J. (2007). "ATP6 homoplasmic mutations inhibit and destabilize the human F1F0-ATP synthase without preventing enzyme assembly and oligomerization." *J Biol Chem* **282**(2): 1051-8.
- De Meirleir, L., Seneca, S., Lissens, W., De Clercq, I., Eyskens, F., Gerlo, E., Smet, J., Van Coster, R. (2004). "Respiratory chain complex V deficiency due to a mutation in the assembly gene ATP12." *J Med Genet* **41**(2): 120-4.
- De Meirleir, L., Seneca, S., Lissens, W., Schoentjes, E., Desprechins, B. (1995). "Bilateral striatal necrosis with a novel point mutation in the mitochondrial ATPase 6 gene." *Pediatr Neurol* **13**(3): 242-6.
- Dickson, V. K., Silvester, J. A., Fearnley, I. M., Leslie, A. G., Walker, J. E. (2006). "On the structure of the stator of the mitochondrial ATP synthase." *EMBO J* **25**(12): 2911-8.
- Dudkina, N. V., Sunderhaus, S., Boekema, E. J., Braun, H. P. (2008). "The higher level of organization of the oxidative phosphorylation system: mitochondrial supercomplexes." *J Bioenerg Biomembr* **40**(5): 419-24.
- El Meziane, A., Lehtinen, S. K., Hance, N., Nijtmans, L. G., Dunbar, D., Holt, I. J., Jacobs, H. T. (1998). "A tRNA suppressor mutation in human mitochondria." *Nat Genet* **18**(4): 350-3.
- Everard-Gigot, V., Dunn, C. D., Dolan, B. M., Brunner, S., Jensen, R. E., Stuart, R. A. (2005). "Functional analysis of subunit e of the F1Fo-ATP synthase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: importance of the N-terminal membrane anchor region." *Eukaryot Cell* **4**(2): 346-55.
- Fersht, A. (1999). *Structure and Mechanism in Protein Science*. W.H.Freeman and Co., New York, NY
- Fillingame, R. H., Angevine, C. M., Dmitriev, O. Y. (2002). "Coupling proton movements to c-ring rotation in F(1)F(o) ATP synthase: aqueous access channels and helix rotations at the a-c interface." *Biochim Biophys Acta* **1555**(1-3): 29-36.
- Gao, Y. Q., Yang, W., Karplus, M. (2005). "A structure-based model for the synthesis and hydrolysis of ATP by F1-ATPase." *Cell* **123**(2): 195-205.

- Garcia-Trejo, J. J., Morales-Rios, E. (2008). "Regulation of the F1F0-ATP synthase rotary nanomotor in its monomeric-bacterial and dimeric-mitochondrial forms." J Biol Phys **34**(1-2): 197-212.
- Garrido, N., Griparic, L., Jokitalo, E., Wartiovaara, J., van der Blik, A. M., Spelbrink, J. N. (2003). "Composition and dynamics of human mitochondrial nucleoids." Mol Biol Cell **14**(4): 1583-96.
- Gibbons, C., Montgomery, M. G., Leslie, A. G., Walker, J. E. (2000). "The structure of the central stalk in bovine F(1)-ATPase at 2.4 Å resolution." Nat Struct Biol **7**(11): 1055-61.
- Gledhill, J. R., Walker, J. E. (2006). "Inhibitors of the catalytic domain of mitochondrial ATP synthase." Biochem Soc Trans **34**(Pt 5): 989-92.
- Hao, H., Morrison, L. E., Moraes, C. T. (1999). "Suppression of a mitochondrial tRNA gene mutation phenotype associated with changes in the nuclear background." Hum Mol Genet **8**(6): 1117-24.
- Havlickova, V., Kaplanova, V., Nuskova, H., Drahota, Z., Houstek, J. (2010). "Knockdown of F(1) epsilon subunit decreases mitochondrial content of ATP synthase and leads to accumulation of subunit c." Biochim Biophys Acta **1797**(6-7): 1124-1129.
- Helfenbein, K. G., Ellis, T. P., Dieckmann, C. L., Tzagoloff, A. (2003). "ATP22, a nuclear gene required for expression of the F0 sector of mitochondrial ATPase in *Saccharomyces cerevisiae*." J Biol Chem **278**(22): 19751-6.
- Hendrick, J. P., Hartl, F. U. (1993). "Molecular chaperone functions of heat-shock proteins." Annu Rev Biochem **62**: 349-84.
- Hinton, A., Gatti, D. L., Ackerman, S. H. (2004). "The molecular chaperone, Atp12p, from *Homo sapiens*. In vitro studies with purified wild type and mutant (E240K) proteins." J Biol Chem **279**(10): 9016-22.
- Holt, I. J., Harding, A. E., Petty, R. K., Morgan-Hughes, J. A. (1990). "A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy." Am J Hum Genet **46**(3): 428-33.
- Honzik, T., Tesarova, M., Mayr, J. A., Hansikova, H., Jesina, P., Bodamer, O., Koch, J., Magner, M., Freisinger, P., Huemer, M., Kostkova, O., van Coster, R., Kmoch, S., Houstek, J., Sperl, W., Zeman, J. (2010). "Mitochondrial encephalocardio-myopathy with early neonatal onset due to TMEM70 mutation." Arch Dis Child **95**(4): 296-301.
- Houstek, J., Klement, P., Hermanska, J., Houstkova, H., Hansikova, H., Van den Bogert, C., Zeman, J. (1995). "Altered properties of mitochondrial ATP-synthase in patients with a T->G mutation in the ATPase 6 (subunit a) gene at position 8993 of mtDNA." Biochim Biophys Acta **1271**(2-3): 349-57.
- Houstek, J., Kmoch, S., Zeman, J. (2009). "TMEM70 protein - a novel ancillary factor of mammalian ATP synthase." Biochim Biophys Acta **1787**(5): 529-32.
- Houstek, J., Mracek, T., Vojtiskova, A., Zeman, J. (2004). "Mitochondrial diseases and ATPase defects of nuclear origin." Biochim Biophys Acta **1658**(1-2): 115-21.
- Houstek, J., Pickova, A., Vojtiskova, A., Mracek, T., Pecina, P., Jesina, P. (2006). "Mitochondrial diseases and genetic defects of ATP synthase." Biochim Biophys Acta **1757**(9-10): 1400-5.
- Hubbard, M. J., McHugh, N. J. (1996). "Mitochondrial ATP synthase F1-beta-subunit is a calcium-binding protein." FEBS Lett **391**(3): 323-9.
- Chen, C., Ko, Y., Delannoy, M., Ludtke, S. J., Chiu, W., Pedersen, P. L. (2004). "Mitochondrial ATP synthasome: three-dimensional structure by electron microscopy of the ATP synthase in complex formation with carriers for Pi and ADP/ATP." J Biol Chem **279**(30): 31761-8.
- Chen, X. J., Butow, R. A. (2005). "The organization and inheritance of the mitochondrial genome." Nat Rev Genet **6**(11): 815-25.

- Jesina, P., Tesarova, M., Fornuskova, D., Vojtiskova, A., Pecina, P., Kaplanova, V., Hansikova, H., Zeman, J., Houstek, J. (2004). "Diminished synthesis of subunit a (ATP6) and altered function of ATP synthase and cytochrome c oxidase due to the mtDNA 2 bp microdeletion of TA at positions 9205 and 9206." Biochem J **383**(Pt. 3): 561-71.
- Jonckheere, A. I., Hogeveen, M., Nijtmans, L. G., van den Brand, M. A., Janssen, A. J., Diepstra, J. H., van den Brandt, F. C., van den Heuvel, L. P., Hol, F. A., Hofste, T. G., Kapusta, L., Dillmann, U., Shamdeen, M. G., Smeitink, J. A., Rodenburg, R. J. (2008). "A novel mitochondrial ATP8 gene mutation in a patient with apical hypertrophic cardiomyopathy and neuropathy." J Med Genet **45**(3): 129-33.
- Kagawa, R., Montgomery, M. G., Braig, K., Leslie, A. G., Walker, J. E. (2004). "The structure of bovine F1-ATPase inhibited by ADP and beryllium fluoride." EMBO J **23**(14): 2734-44.
- Karrasch, S., Walker, J. E. (1999). "Novel features in the structure of bovine ATP synthase." J Mol Biol **290**(2): 379-84.
- Kaukonen, J., Juselius, J. K., Tiranti, V., Kyttala, A., Zeviani, M., Comi, G. P., Keranen, S., Peltonen, L., Suomalainen, A. (2000). "Role of adenine nucleotide translocator 1 in mtDNA maintenance." Science **289**(5480): 782-5.
- Korshunov, S. S., Skulachev, V. P., Starkov, A. A. (1997). "High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria." FEBS Lett **416**(1): 15-8.
- Krause, F., Reifschneider, N. H., Goto, S., Dencher, N. A. (2005). "Active oligomeric ATP synthases in mammalian mitochondria." Biochem Biophys Res Commun **329**(2): 583-90.
- Lee, J. K., Belogradov, G. I., Stroud, R. M. (2008). "Crystal structure of bovine mitochondrial factor B at 0.96-Å resolution." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(36): 13379-84.
- Lefebvre-Legendre, L., Vaillier, J., Benabdelhak, H., Velours, J., Slonimski, P. P., di Rago, J. P. (2001). "Identification of a nuclear gene (FMC1) required for the assembly/stability of yeast mitochondrial F(1)-ATPase in heat stress conditions." J Biol Chem **276**(9): 6789-96.
- Leyva, J. A., Bianchet, M. A., Amzel, L. M. (2003). "Understanding ATP synthesis: structure and mechanism of the F1-ATPase (Review)." Mol Membr Biol **20**(1): 27-33.
- Lightowers, R. N., Chinnery, P. F., Turnbull, D. M., Howell, N. (1997). "Mammalian mitochondrial genetics: heredity, heteroplasmy and disease." Trends Genet **13**(11): 450-5.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1954). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem **193**: 265-275.
- Ludlam, A., Brunzelle, J., Pribyl, T., Xu, X., Gatti, D. L., Ackerman, S. H. (2009). "Chaperones of F1-ATPase." J Biol Chem **284**(25): 17138-46.
- Mayr, J. A., Havlickova, V., Zimmermann, F., Magler, I., Kaplanova, V., Jesina, P., Pecinova, A., Nuskova, H., Koch, J., Sperl, W., Houstek, J. (2010). "Mitochondrial ATP synthase deficiency due to a mutation in the ATP5E gene for the F1 epsilon subunit." Hum Mol Genet **19**(17): 3430-9.
- Mayr, J. A., Merkel, O., Kohlwein, S. D., Gebhardt, B. R., Bohles, H., Fotschl, U., Koch, J., Jaksch, M., Lochmuller, H., Horvath, R., Freisinger, P., Sperl, W. (2007). "Mitochondrial phosphate-carrier deficiency: a novel disorder of oxidative phosphorylation." Am J Hum Genet **80**(3): 478-84.
- Menz, R. I., Walker, J. E., Leslie, A. G. (2001). "Structure of bovine mitochondrial F(1)-ATPase with nucleotide bound to all three catalytic sites: implications for the mechanism of rotary catalysis." Cell **106**(3): 331-41.

- Meyer, B., Wittig, I., Trifilieff, E., Karas, M., Schagger, H. (2007). "Identification of two proteins associated with mammalian ATP synthase." Mol Cell Proteomics **6**(10): 1690-9.
- Minauro-Sanmiguel, F., Wilkens, S., Garcia, J. J. (2005). "Structure of dimeric mitochondrial ATP synthase: novel F<sub>0</sub> bridging features and the structural basis of mitochondrial cristae biogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(35): 12356-8.
- Moore, K. J., Angevine, C. M., Vincent, O. D., Schwem, B. E., Fillingame, R. H. (2008). "The cytoplasmic loops of subunit a of Escherichia coli ATP synthase may participate in the proton translocating mechanism." J Biol Chem **283**(19): 13044-52.
- Morais, R., Gregoire, M., Jeannotte, L., Gravel, D. (1990). "Chick embryo cells rendered respiration-deficient by chloramphenicol and ethidium bromide are auxotrophic for pyrimidines." Biochem Biophys Res Commun **94**: 71-77.
- Nas, M. M. K., Nas, S. (1963). "Intramitochondrial fibers with DNA characteristic. I. Fixation and electron staining reactions." J Cell Biol **19**: 593-611.
- Nijtmans, L. G., Klement, P., Houstek, J., van den Bogert, C. (1995). "Assembly of mitochondrial ATP synthase in cultured human cells: implications for mitochondrial diseases." Biochim Biophys Acta **1272**(3): 190-8.
- Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M., Kinosita, K., Jr. (1997). "Direct observation of the rotation of F<sub>1</sub>-ATPase." Nature **386**(6622): 299-302.
- Palmieri, F. (2008). "Diseases caused by defects of mitochondrial carriers: a review." Biochim Biophys Acta **1777**(7-8): 564-78.
- Palmieri, L., Alberio, S., Pisano, I., Lodi, T., Meznaric-Petrusa, M., Zidar, J., Santoro, A., Scarcia, P., Fontanesi, F., Lamantea, E., Ferrero, I., Zeviani, M. (2005). "Complete loss-of-function of the heart/muscle-specific adenine nucleotide translocator is associated with mitochondrial myopathy and cardiomyopathy." Hum Mol Genet **14**(20): 3079-88.
- Paumard, P., Vaillier, J., Couлары, B., Schaeffer, J., Soubannier, V., Mueller, D. M., Brethes, D., di Rago, J. P., Velours, J. (2002). "The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology." EMBO J **21**(3): 221-30.
- Pedersen, P. L. (2005). "Transport ATPases: structure, motors, mechanism and medicine: a brief overview." J Bioenerg Biomembr **37**(6): 349-57.
- Pickova, A., Potocky, M., Houstek, J. (2005). "Assembly factors of F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase across genomes." Proteins **59**(3): 393-402.
- Prezant, T. R., Agopian, J. V., Bohlman, M. C., Bu, X., Oztas, S., Qiu, W. Q., Arnos, K. S., Cortopassi, G. A., Jaber, L., Rotter, J. I., et al. (1993). "Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness." Nat Genet **4**(3): 289-94.
- Rastogi, V. K., Girvin, M. E. (1999). "Structural changes linked to proton translocation by subunit c of the ATP synthase." Nature **402**(6759): 263-8.
- Reisinger, V., Eichacker, L. A. (2006). "Analysis of membrane protein complexes by blue native PAGE." Proteomics **6 Suppl 2**: 6-15.
- Rustin, P., Chretien, D., Bourgeron, T., Gerard, B., Rotig, A., Saudubray, J. M., Munnich, A. (1994). "Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies." Clin Chim Acta **228**(1): 35-51.
- Saddar, S., Dienhart, M. K., Stuart, R. A. (2008). "The F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase complex influences the assembly state of the cytochrome bc<sub>1</sub>-cytochrome oxidase supercomplex and its association with the TIM23 machinery." J Biol Chem **283**(11): 6677-86.
- Seneca, S., Abramowicz, M., Lissens, W., Muller, M. F., Vamos, E., de Meirleir, L. (1996). "A mitochondrial DNA microdeletion in a newborn girl with transient lactic acidosis." J Inherit Metab Dis **19**(2): 115-8.

- Sgarbi, G., Baracca, A., Lenaz, G., Valentino, L. M., Carelli, V., Solaini, G. (2006). "Inefficient coupling between proton transport and ATP synthesis may be the pathogenic mechanism for NARP and Leigh syndrome resulting from the T8993G mutation in mtDNA." *Biochem J* **395**(3): 493-500.
- Sheluhó, D., Ackerman, S. H. (2001). "An accessible hydrophobic surface is a key element of the molecular chaperone action of Atp11p." *J Biol Chem* **276**(43): 39945-9.
- Schaefer, A. M., Taylor, R. W., Turnbull, D. M., Chinnery, P. F. (2004). "The epidemiology of mitochondrial disorders--past, present and future." *Biochim Biophys Acta* **1659**(2-3): 115-20.
- Schagger, H., Pfeiffer, K. (2000). "Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria." *EMBO J* **19**(8): 1777-83.
- Schagger, H., von Jagow, G. (1991). "Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form." *Anal Biochem* **199**(2): 223-31.
- Schon, E. A., Santra, S., Pallotti, F., Girvin, M. E. (2001). "Pathogenesis of primary defects in mitochondrial ATP synthesis." *Semin Cell Dev Biol* **12**(6): 441-8.
- Schwartz, M., Vissing, J. (2002). "Paternal inheritance of mitochondrial DNA." *N Engl J Med* **347**(8): 576-80.
- Slater, E. C. (1967). "Application of inhibitors and uncouplers for a study of oxidative phosphorylation." *Methods Enzymol.* **10**: 48-57.
- Spannagel, C., Vaillier, J., Chaignepain, S., Velours, J. (1998). "Topography of the yeast ATP synthase F<sub>0</sub> sector by using cysteine substitution mutants. Cross-linkings between subunits 4, 6, and f." *Biochemistry* **37**(2): 615-21.
- Stock, D., Gibbons, C., Arechaga, I., Leslie, A. G., Walker, J. E. (2000). "The rotary mechanism of ATP synthase." *Curr Opin Struct Biol* **10**(6): 672-9.
- Strauss, M., Hofhaus, G., Schroder, R. R., Kuhlbrandt, W. (2008). "Dimer ribbons of ATP synthase shape the inner mitochondrial membrane." *EMBO J* **27**(7): 1154-60.
- Tatuch, Y., Robinson, B. H. (1993). "The mitochondrial DNA mutation at 8993 associated with NARP slows the rate of ATP synthesis in isolated lymphoblast mitochondria." *Biochem Biophys Res Commun* **192**(1): 124-8.
- Timmis, J. N., Ayliffe, M. A., Huang, C. Y., Martin, W. (2004). "Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes." *Nat Rev Genet* **5**(2): 123-35.
- Valiyaveetil, F. I., Fillingame, R. H. (1998). "Transmembrane topography of subunit a in the Escherichia coli F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthase." *J Biol Chem* **273**(26): 16241-7.
- Vassault, A., Bonnefont, J.P., Specola, N., Saudubray, J.M. (1991). "Lactate, pyruvate and ketone bodies." In: *Hommes FA, ed. Techniques in diagnostic human genetics: a laboratory manual.* New York: Wiley Liss: 285-308.
- Vives-Bauza, C., Magrane, J., Andreu, A. L., Manfredi, G. (2010). "Novel role of ATPase subunit C targeting peptides beyond mitochondrial protein import." *Mol Biol Cell* **21**(1): 131-9.
- Walker, J. E., Dickson, V. K. (2006). "The peripheral stalk of the mitochondrial ATP synthase." *Biochim Biophys Acta* **1757**(5-6): 286-96.
- Walker, J. E., Fearnley, I. M., Gay, N. J., Gibson, B. W., Northrop, F. D., Powell, S. J., Runswick, M. J., Saraste, M., Tybulewicz, V. L. (1985). "Primary structure and subunit stoichiometry of F<sub>1</sub>-ATPase from bovine mitochondria." *J Mol Biol* **184**(4): 677-701.
- Wang, Z. G., Ackerman, S. H. (2000). "The assembly factor Atp11p binds to the beta-subunit of the mitochondrial F(1)-ATPase." *J Biol Chem* **275**(8): 5767-72.
- Wang, Z. G., Sheluhó, D., Gatti, D. L., Ackerman, S. H. (2000). "The alpha-subunit of the mitochondrial F(1) ATPase interacts directly with the assembly factor Atp12p." *EMBO J* **19**(7): 1486-93.

- Wang, Z. G., White, P. S., Ackerman, S. H. (2001). "Atp11p and Atp12p are assembly factors for the F(1)-ATPase in human mitochondria." J Biol Chem **276**(33): 30773-8.
- Weber, J. (2007). "ATP synthase--the structure of the stator stalk." Trends Biochem Sci **32**(2): 53-6.
- Wittig, I., Schagger, H. (2008). "Structural organization of mitochondrial ATP synthase." Biochim Biophys Acta **1777**(7-8): 592-8.
- Wong, L. J. (2007). "Pathogenic mitochondrial DNA mutations in protein-coding genes." Muscle Nerve **36**(3): 279-93.
- Yasuda, R., Noji, H., Kinosita, K., Jr., Yoshida, M. (1998). "F1-ATPase is a highly efficient molecular motor that rotates with discrete 120 degree steps." Cell **93**(7): 1117-24.
- Yasuda, R., Noji, H., Yoshida, M., Kinosita, K., Jr., Itoh, H. (2001). "Resolution of distinct rotational substeps by submillisecond kinetic analysis of F1-ATPase." Nature **410**(6831): 898-904.
- Zeng, X., Neupert, W., Tzagoloff, A. (2007). "The metalloprotease encoded by ATP23 has a dual function in processing and assembly of subunit 6 of mitochondrial ATPase." Mol Biol Cell **18**(2): 617-26.

## 9 Přílohy



# **Dědičné metabolické poruchy 2009**

**24. pracovní dny**

**13.-15. května 2009**

**Hotel Priessnitz**

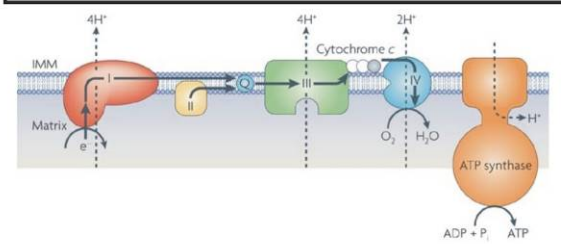
**Lázně Jeseník**

# Stanovení aktivit komplexů OXPHOS v izolovaných mitochondriích z kultivovaných buněk

Sabina Suldořská, Markéta Tesařová, Hana Hansíková, Jiří Zeman

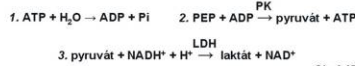
Klinika dětského a dorostového lékařství I.LF UK VFN, Praha

**Úvod:**  
F1Fo-ATP syntáza (komplex V, ATP syntáza) je pátým multiproteinovým komplexem systému oxidativní fosforylace (OXPHOS), který je lokalizovaný na vnitřní mitochondriální membráně. K syntéze až 95% buněčného ATP z ADP a Pi, ATP syntáza využívá protonový gradient vytvořený čtyřmi komplexy dýchacího řetězce. ATP syntáza se skládá z 16 různých podjednotek, z nichž dvě jsou kódované mitochondriální DNA (mtDNA). Deficit ATP syntázy způsobený jak mutacemi v genech mtDNA, tak i v jaderných genech kódující faktory nezbytné pro biogenezi tohoto komplexu, vede k fatálnímu onemocnění postihující tkáň s vysokou energetickou náročností (srdce, mozek, sval).  
Stanovení aktivit komplexů OXPHOS spektrofotometrickými metodami patří mezi základní analýzy využívané při diagnostice mitochondriálních onemocnění způsobených deficitem jednotlivých komplexů nebo jejich kombinací. Získané výsledky pak umožňují lépe navrhnout další diagnostické postupy. Aktivitu komplexů OXPHOS jsou stanovovány v různých biotických vzorcích (sval, srdce, játra) nebo v kultivovaných kožních fibroblastech. V kultivovaných fibroblastech se k enzymatickým analýzám využívají celé nebo permeabilizované buňky. Nicméně stanovení aktivit komplexů OXPHOS v izolovaných mitochondriích zvyšuje citlivost použitých metod a rozšiřuje spektrum možných analýz, zejména možnost stanovení aktivity ATP syntázy.  
Cílem práce je optimalizovat spektrofotometrické stanovení aktivit komplexů OXPHOS a kontrolního enzymu citrát syntázy (CS) v mitochondriích izolovaných z kultivovaných lidských buněk a stanovit minimální množství mitochondrií potřebných pro analýzu jednotlivých komplexů.



Obr.1 Schématické znázornění komplexů OXPHOS ve vnitřní mitochondriální membráně.

**Materiál a Metody:**  
Mitochondrie byly izolovány z: 1) buněk HEK293; 2) 3 buněčných linií HEK293 (C, C2, E), ve kterých byla pomocí shRNA stabilně down-regulována exprese genu TMEM70, kódujícího faktora biogeneze ATP syntázy (1); 3) kontrolní linie HEK293 (NS) stabilně exprimující kontrolní shRNA.  
Kultivované buňky byly sklizeny trypsinizací a dvakrát promyty PBS. Sklizené buňky byly resuspendovány v STE roztoku (250 mM sacharóza, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA, 1% protease inhibitor cocktail; Sigma) a postupně homogenizovány sklíčením v homogénizátorem (1 ml). Pro separaci jader a nerozbitých buněk byl homogénát centrifugován při 4°C na 600 g po dobu 15 min. Vzniklý supernatant byl v čistých mikrozkumavkách centrifugován při 4°C a 10,000 g dalších 25 min. Vzniklá peleta tvořena mitochondrii byla resuspendována ve 100 µl STE roztoku a znovu centrifugována (4°C, 10,000 g, 25 min). Supernatant byl odstráněn, pelety byly resuspendovány v 50 µl čerstvého roztoku STE a skladovány při -70°C. Koncentrace mitochondriálního proteinu byla stanovena Lowryho metodou (2).  
Jednotlivé aktivity systému OXPHOS (I, II, III, I-II, II-III, IV, V) a citrát syntázy byly naměřeny spektrofotometricky na přístroji Shimadzu UV-260 při 37°C podle standardních protokolů (3). U komplexu V (ATP syntázy) bylo stanovení jeho oligomycin-senzitivní hydrolytické aktivity. 30 µg mitochondriální suspenze bylo 3 minuty inkubováno v hypotonickém prostředí HO. Po této době byla přidána reakční směs tvořena z 50mM TRIS, pH 8.0, 5mg/ml BSA, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM KCl, 3µM karbonyl kyanid m-chlorophenylhydrazon (m-Cl-CCP), 1µM antimycin, 2mM fosfoenolpyruvát (PEP), 2mM ATP, 4U laktátdehydrogenáza (LDH), 4U pyruvátkináza (PK). Reakce byla iniciována 0,2mM NADH. Aktivita se měří jako úbytek absorbance při 340nm daného množství vzniklé oxidované formy NAD<sup>+</sup> (obr.2). Aktivita byla stanovována po dobu 2 minut, poté byla reakce inhibována přidáním 3µM oligomycinu. Skutečná aktivita se získá odečtením inhibice od celkové aktivity.

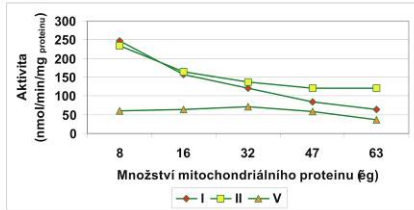


Obr.2 ATP-regenerační systém ve spojení s laktátdehydrogenázou (LDH) a pyruvátkinázou (PK)

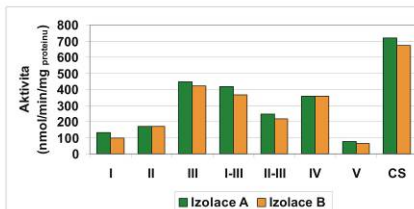
**Závěr:**  
Pro spektrofotometrické stanovení aktivit komplexů systému OXPHOS a citrát syntázy jako kontrolního enzymu je zapotřebí minimálně 270 µg mitochondriálního enzymu. Toto množství odpovídá 4 kultivačním lahvim (75 cm) buněk HEK293 nebo 16 kultivačním lahvim kožních fibroblastů. I přes zvýšené požadavky na množství kultivovaných buněk je využití izolovaných mitochondrií pro spektrofotometrickou analýzu systému OXPHOS vhodné a zvyšuje citlivost použitých metod.  
Optimalizované postupy byly využity pro analýzu aktivit komplexů OXPHOS v mitochondriích izolovaných z buněčných linií s down-regulovaným genem TMEM70, jehož proteinový produkt je důležitý v biogenezi F1Fo-ATP syntázy. U buněčné linie C2 byla pozorována snížená oligomycin-senzitivní hydrolytická aktivita ATP syntázy až na 41% hodnoty zjištěné u negativní kontroly. Tento poznatek podpořil další studie. Mimo to bude výše popsaná metodika aplikována na izolované mitochondrie z kultivovaných fibroblastů od téměř 20 pacientů s podezřením na deficit komplexu V. Zjištěná data budou následně využita k zacílení dalších molekulárně-biologických analýz.

**Literatura:**  
1. Čížková A, Stránecký V, Mayr JA, Tesařová M, Havlíčková V, Paál J, Ivánek R, Kuss AW, Hansíková H, Kaplanová V, Vrbáček M, Hartmannová H, Hrobová L, Honěk T, Oratová Z, Wagner M, Hejzlarová K, Šperl M, Zeman J, Houšek J, Knoch S. TMEM70 mutations cause isolated ATP synthase deficiency and neonatal mitochondrial encephalomyopathy. Nat Genet 2016; 48(11):1288-90  
2. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1956; 193:265-275  
3. Rudin P, Chretien D, Bourgeron T, Gérard B, Rötig A, Saudubert JM, Munnich A. Biochemical and molecular investigation in respiratory chain deficiencies. Clin Chim Acta 1994; 228:35-51

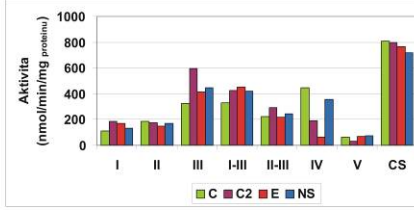
**Výsledky:**  
Pro stanovení mezích hodnot aktivit systému OXPHOS a citrát syntázy byly provedeny dvě nezávislé izolace mitochondrií z kontrolních HEK293 buněk. U izolace A bylo optimalizováno vstupní množství mitochondriálního proteinu do reakce. Komplex I, II a V byly změřeny v dubletech při pěti různých množstvích mitochondriálního proteinu s podáteční koncentrací 7,89 µg/µl (obr.3). Pro stanovení hydrolytické aktivity ATP syntázy je optimální množství mitochondriálního proteinu 30 µg. Pro stanovení aktivit komplexů dýchacího řetězce je postačující poloviční množství, tj. 15 µg. V mitochondriích z obou izolací byly naměřeny aktivity všech komplexů OXPHOS a citrát syntázy. Nebyly nalezeny rozdíly v aktivitách u mitochondrií pocházejících z různých izolací (obr.4). Zjištěná vstupní množství mitochondriálního proteinu byla použita pro stanovení aktivit komplexů OXPHOS a CS v izolovaných mitochondriích z buněk NS, C, C2, E (obr.5). U linie C2 byla zjištěna snížená hydrolytická aktivita ATP syntázy na 41% hodnot naměřených v kontrolní linii NS (obr.6).



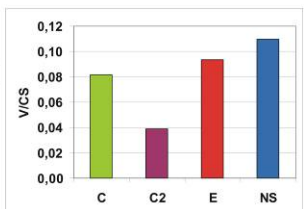
Obr.3 Optimalizace vstupního množství mitochondriálního proteinu do reakce u izolace A. U izolovaných mitochondrií z kontrolních buněk HEK293 byly v dubletech při pěti různých vstupních množstvích změněny aktivity komplexů OXPHOS a citrát syntázy. Optimálním množstvím pro stanovení aktivit komplexů dýchacího řetězce je 15 µg, pro komplex V 30 µg.



Obr.4 Porovnání aktivit komplexů OXPHOS a citrát syntázy dvou nezávislých izolací mitochondrií z kontrolních buněk HEK293. U izolací A a B byla provedena dvě nezávislá dubletová měření aktivit komplexů OXPHOS a CS. Naměřené hodnoty se shodují.



Obr.5 Aktivity komplexů OXPHOS a citrát syntázy v mitochondriích izolovaných z buněčných linií HEK293 (C, C2, E, NS). Hodnoty aktivit u buněk HEK293 s down-regulovaným genem TMEM70 (C, C2, E) se významně neliší od hodnot naměřených u negativní kontroly (NS). U buněčné linie C2 byla zjištěna snížená hydrolytická aktivita komplexu V.



Obr.6 Poměry aktivit komplexu V ke komplexu II (A) a k CS (B). U buněčné linie C2 byl zjištěn pokles hydrolytické aktivity až na 41% hodnot kontrolní buněčné linie NS.

Tato práce je podporována výzkumným záměrem VZ64165.



# **Dědičné metabolické poruchy 2010**

**25. pracovní dny**

**5. – 7. května 2010**

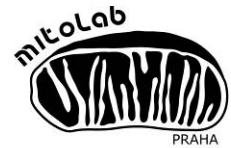
**Kúpeľná Dvorana**

**Trenčianské Teplice**

**Slovensko**

# Deficit $F_1F_0$ -ATP syntázy ve fibroblastech u 6 pacientů

Sabina Suldovská, Markéta Tesařová, Hana Kratochvílová, Tomáš Honzík, Hana Hansíková, Jiří Zeman



Klinika dětského a dorostového lékařství 1. LF UK a VFN v Praze

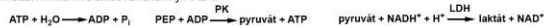
**M**itochondriální  $F_1F_0$ -ATP syntáza (komplex V, ATPáza), poslední komplex systému oxidativní fosforylace, zajišťuje produkci více než 90% buněčného ATP. Komplex  $F_1F_0$ -ATP syntázy je lokalizován na vnitřní mitochondriální membráně a skládá se z 16 různých podjednotek, z nichž 2 jsou kódované mitochondriální DNA (mtDNA). Deficit  $F_1F_0$ -ATP syntázy vede k rozvoji závažných onemocnění s nástupem v časném novorozeneckém věku a s nepříznivou prognózou.

**D**agnostika deficitu mitochondriální ATPázy se skládá z analýzy jejího množství pomocí nativní elektroforózy (BN-PAGE) a stanovením její hydrolytické aktivity v izolovaných mitochondriích z důvodu omezeného množství biologického materiálu získaného při biopsii tkání byla v minulém roce zavedena analýza aktivity  $F_1F_0$ -ATP syntázy v mitochondriích izolovaných z kultivovaných fibroblastů.

**C**ílem práce bylo stanovit aktivitu mitochondriální  $F_1F_0$ -ATP syntázy a množství jejích podjednotek v mitochondriích izolovaných z kultivovaných fibroblastů od pacientů s podezřením na deficit  $F_1F_0$ -ATP syntázy.

**M**ateriálem bylo 20 buněčných linií kultivovaných kožních fibroblastů: 4 kontrolní linie, 4 linie od pacientů s mutací v genu *TMEM70*, které sloužily jako pozitivní kontrola, a 12 linií od pacientů, u kterých bylo na základě BN-PAGE vysloveno podezření na deficit  $F_1F_0$ -ATP syntázy. Od každé linie bylo připraveno 16 kultivačních lahvič fibroblastů, které byly použity k izolaci mitochondrií.

**M**etody: Fibroblasty byly kultivovány v médiu Quantum 333 For Fibroblasts (PAA) při 37°C v 5% atmosféře  $CO_2$ . Po dosažení konfluencí 90% byly buňky sklizeny trypsinizací a 2x promyty roztokem PBS. Sklizené buňky byly resuspendovány v roztoku STE (250 mM sacharóza, 10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 1 mM EDTA, 1% protease inhibitor cocktail, Sigma) a homogenizovány skleněným homogénizátorem (1 ml). Buněčná jádra a nerozbité buňky byly odstraněny centrifugací homogénátu při 4°C na 600g po dobu 15 min. Supernatant byl v čistých mikrotubových centrifugách při 4°C a 10.000g dalších 25 min. Vzniklá peleta mitochondrií byla resuspendována ve 100  $\mu$ l STE roztoku a znovu centrifugována (4°C, 10.000 g, 25 min). Supernatant byl odstráněn, pelety byly resuspendovány v 50  $\mu$ l čerstvého roztoku STE a skladovány při -70°C. Koncentrace mitochondriálního proteinu byla stanovena Lowryho metodou (1). Aktivita komplexu II a citrát syntázy byla stanovena spektrofotometricky na přístroji Shimadzu UV-260 při 37°C podle standardních protokolů (2). Oligomycin senzitivní ATP hydrolytická aktivita  $F_1F_0$ -ATP syntázy byla stanovena stanovením spektrofotometricky dle následujícího protokolu: 30  $\mu$ g mitochondriální suspenze bylo inkubováno 3 minuty v hypotonickém prostředí  $H_2O$ . Následně byla přidána reakční směs o složení 50mM TRIS, pH 8,0, 5mg/ml BSA, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM KCl, 3mM karbonyl kyanid *m*-2-chlorophenylhydrazon (*m*-Cl-CCP), 1 $\mu$ M antimycin, 2mM fosfoenolpyruvát (PEP), 2mM ATP, 4U laktátdehydrogenázy (LDH) a 4U pyruvátkinázy (PK). Reakce byla iniciována po přidání 0,2mM NADH. Hydrolyza ATP odpovídá poklesu absorbance při 340nm daného množství vzniklé oxidované formy NAD<sup>+</sup>.

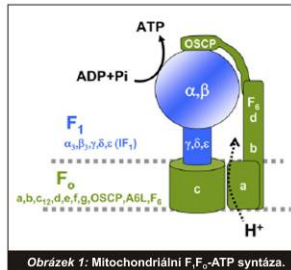


Po 2 minutách byla reakce inhibována přidáním 3 $\mu$ M oligomycinu. ATP hydrolytická aktivita  $F_1F_0$ -ATP syntázy odpovídá rozdílu celkové aktivity ATP hydrolyzy a inhibice oligomycinem. Množství podjednotek komplexu  $F_1F_0$ -ATP syntázy bylo stanoveno pomocí Western blotu. 20  $\mu$ g mitochondriálních proteinů bylo separováno pomocí elektroforózy v 10% SDS-PAGE. Proteiny byly následně přeneseny na PVDF membránu, kde byly detekovány pomocí monoklonálních protilátek proti jednotlivým podjednotkám (Mitosciences).

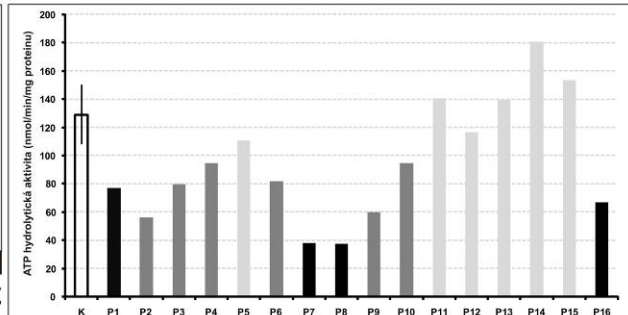
**V**ýsledky: V izolovaných mitochondriích ze 4 linií s mutací v *TMEM70* (P1, P7, P8, P16) byla zjištěna snížená hydrolytická aktivita (40% kontrol, obrázek 2) a snížen byl i poměr její aktivity k aktivitě komplexu II a kontrolního enzymu citrát syntázy (25% kontrol, obrázek 3A, 3C). Ve skupině 12 linií fibroblastů od pacientů s podezřením na deficit ATPázy byla zjištěna snížená její hydrolytická aktivita v 6 liniích (P2, P3, P4, P6, P9, P10; 45%-76% kontrol, obrázek 2). Poměr aktivity  $F_1F_0$ -ATP syntázy k aktivitě komplexu II a citrát syntázy byl v těchto liniích 43% - 115% kontrolních hodnot (obrázek 3B, 3D). Pomocí SDS-PAGE s Western blotem bylo studováno množství 4 podjednotek  $F_1F_0$ -ATP syntázy v mitochondriích z linií P2, P3, P4, P6, P9, P10. Množství podjednotek  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  a OSCP v těchto liniích bylo srovnatelné s kontrolami.

**Tabulka 1: Přehled klinických symptomů u 6 pacientů se sníženou ATP hydrolytickou aktivitou  $F_1F_0$ -ATP syntázy v mitochondriích izolovaných z fibroblastů.**

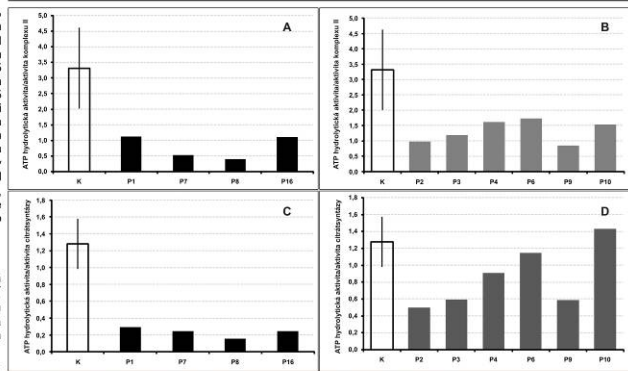
Pacient	Věk	Klinická manifestace
P2	11 let	od 12 měsíců neuropatie, neprosávání, porucha růstu, mikrocefalie, svalová hypotonie, od 7 let rozvoj CPEO, ptózy a strabismus
P3	6 let	od novorozeneckého věku centrální hypotonický syndrom, kvadraspastická, psychomotorická retardace, epilepsie, neprosávání, dysgenese corpus callosum, kraniofaciální dysmorfie, mírná laktátová acidóza
P4	10 měsíců (exitus)	od novorozeneckého věku hypotonie, epilepsie, porucha zraku a sluchu, mikrocefalie, mozková atrofie, dystrofizace, laktátová acidóza
P6	4 roky	od novorozeneckého věku kvadraspastická, ataky dystonie, farmakoresistentní epilepsie, mikrocefalie, zástava psychomotorického vývoje, kongenitální ichtyóza, mírná laktátová acidóza
P9	6 let	od novorozeneckého věku hypotonie, dystonie, zástava vývoje, Leigh syndrom od 4 měsíců, řtu podobné příhody, laktátová acidóza
P10	11 let	od novorozeneckého věku hypotonie, těžká psychomotorická retardace se zástavou vývoje, MRI v 6 letech bez patologického nálezu



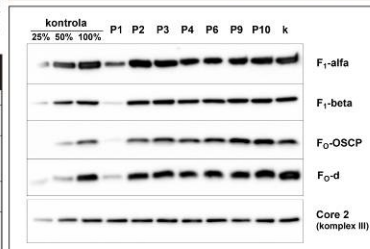
**Obrázek 1: Mitochondriální  $F_1F_0$ -ATP syntáza.**



**Obrázek 2: Aktivity mitochondriální  $F_1F_0$ -ATP syntázy v mitochondriích izolovaných z fibroblastů. Černé sloupce (P1, P7, P8, P16) - pacienti s mutací v *TMEM70* (pozitivní kontroly), tmavě šedé sloupce (P2, P3, P4, P6, P9, P10) - pacienti se sníženou aktivitou pod referenčním rozmezím, světle šedé sloupce - pacienti s aktivitou v referenčním rozmezí.**



**Obrázek 3: Poměr ATP hydrolytické aktivity  $F_1F_0$ -ATP syntázy k aktivitě komplexu II (A,B), resp. k aktivitě kontrolního enzymu citrát syntázy (C,D) ve skupině pacientů s mutací v *TMEM70* (A,C) a skupině pacientů se sníženou ATP hydrolytickou aktivitou (B,D).**



**Obrázek 4: Analýza množství vybraných podjednotek  $F_1F_0$ -ATP syntázy v izolovaných mitochondriích z fibroblastů od pacientů se sníženou ATP hydrolytickou aktivitou. P1-pacient s mutací v *TMEM70* (pozitivní kontrola).**

**Z**ávěr: V souboru 12 buněčných liniích kultivovaných fibroblastů od pacientů s podezřením na deficit mitochondriální  $F_1F_0$ -ATP syntázy jsme u 6 z nich prokázali sníženou ATP hydrolytickou aktivitu. Změny v množství 4 vybraných podjednotek komplexu  $F_1F_0$ -ATP syntázy jsme v těchto liniích však neprokázali. V současné době probíhají molekulárně genetické analýzy ke objasnění příčin enzymatického deficitu.

**Literatura:**  
1. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1954; 193:265-275  
2. Ruslin P, Chretien D, Bourgeron T, Gérard B, Rötig A, Saudubray JM, Munnich A. Biochemical and molecular investigation in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta* 1994; 228:35-51

*Podpořeno grantem Ministerstva zdravotnictví ČR IGA NS 9759/4 a výzkumným centrem 1M520.*