

# Univerzita Karlova v Praze

## Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie



**Bc. Michaela Marková**

Expres vybraných defektů oxidativní fosforylace na úrovni kultivovaných fibroblastů

Expression of selected defects of oxidative phosphorylation system in cultivated fibroblasts

**Diplomová práce**

**Školitel:** RNDr. Hana Hansíková, CSc.

Praha, 2015

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 30.4.2015

Michaela Marková

### **Poděkování:**

Na tomto místě bych velice ráda poděkovala své školitelce RNDr. Haně Hansíkové, CSc. za neutuchající trpělivost, vstřícnost a cenné rady při odborném vedení této práce. Dále bych chtěla poděkovat Prof. MUDr. Jiřímu Zemanovi za možnost působení v Laboratoři pro studium mitochondriálních poruch a Mgr. Janě Spáčilové a celému kolektivu laboratoře za spolupráci, ochotu a vytvoření přátelské atmosféry.

Největší poděkování patří mé rodině a partnerovi za to, že mi byli obrovskou podporou po celou dobu studia.

### **Diplomová práce vznikla s podporou následujících grantových projektů:**

Česko-Norský výzkumný program 7F14308,

14-36804G, MŠMT/COST LD14082 , SVV - UK 260148/2015,

ExAM - Z.1.05./2.1.00/03.0124

## **Abstrakt:**

Savčí organismus je zcela závislý na produkci ATP systémem oxidativní fosforylace (OXPHOS) na vnitřní mitochondriální membráně. OXPHOS se skládá z komplexů I-IV dýchacího řetězce, ATP syntázy a součástí jsou také 2 elektronové přenašeče cytochrom c a koenzym Q. Poruchy mitochondriálního energetického metabolismu způsobené defekty OXPHOS jsou charakteristické extrémní heterogenitou klinických příznaků, variabilitou postižených tkání a také tíží defektu na úrovni jednotlivé tkáně. Ne vždy jsou poruchy jasně vyjádřeny na úrovni dostupných tkání či nejnáze dosažitelných kultivovaných fibroblastů a/nebo zatím dostupnými metodami nejsme schopni tyto defekty na úrovni fibroblastů zachytit. Cílem diplomové práce bylo pomocí biochemických metod, zejména vysoce citlivé polarografie, identifikovat poruchy OXPHOS na úrovni kultivovaných fibroblastů a charakterizovat jejich funkční dopad na mitochondriální energetický metabolismus jako celek. Biologickým materiálem bylo 10 linií kultivovaných kožních fibroblastů od pacientů s izolovanými (SURF1, SCO2, ND1, ND5) nebo kombinovanými poruchami komplexů OXPHOS, jejichž biochemický defekt byl potvrzen ve svalové tkáni a také od 14 pacientů s mitochondriální dysfunkcí sekundárního charakteru (8 pacientů s Huntingtonovou chorobou, 6 pacientů s poruchou metabolismu sirných aminokyselin). Byl testován i dopad různých podmínek kultivace na míru respirace. Ve všech testovaných liniích byly zjištěny v různé míře změny ve spotřebě kyslíku a také v ultrastruktuře mitochondrií. Výsledky DP přispějí k přesnější identifikaci defektů OXPHOS v kultivovaných fibroblastech a tím úspěšnějšímu zachytu pacientů s mitochondriálními onemocněními.

**Klíčová slova:** mitochondrie, oxidativní fosforylace, kultivované fibroblasty, cytochrom c oxidáza

## **Abstract:**

The mammalian organism is entirely dependent on ATP production by oxidative phosphorylation system (OXPHOS) on the inner mitochondrial membrane. OXPHOS is composed of respiratory chain complexes I-IV, ATP synthase and also include two electron transporters cytochrome *c* and coenzyme Q. Disorders of mitochondrial energy metabolism caused by OXPHOS defects are characterized by extreme heterogeneity of clinical symptoms, variability of tissues affected and the severity of the defect at the level of individual tissues. The mitochondrial disorders are not always clearly expressed at the level of available tissue or most easily available cultured fibroblasts and/or currently available methods are not capable to detect the defects on the fibroblasts level. The aim of this master thesis was to identify by biochemical methods, especially by high sensitive polarography, OXPHOS disorders in cultured fibroblasts. Cell lines from 10 patients with isolated (SURF21, SCO1 ND1, ND5) or combined defects of OXPHOS complexes whose biochemical defect was confirmed in muscle tissue as well as 14 patients with non-mitochondrial diseases (8 patients with Huntington disease, 6 patients with disorder of sulphur amino acids metabolism) were analysed. Furthermore impact of various cultivation conditions on OXPHOS function was studied. Significant disturbances in mitochondrial respiration, ultrastructure and mitochondrial network were found. The results of this thesis will contribute to a more precise identification OXPHOS defects in cultured fibroblasts and thus more successful detection of patients with mitochondrial diseases

**Key words:** mitochondria, oxidative phosphorylation, cultivated fibroblasts, cytochrome *c* oxidase

# Obsah

<b>1 Teoretický úvod.....</b>	<b>5</b>
1.1 Mitochondrie.....	5
1.2 Struktura mitochondrií.....	5
1.3 Mitochondriální genom.....	7
1.4 Systém oxidativní fosforylace (OXPHOS).....	8
1.4.1 NADH-koenzym Q oxidoreduktáza.....	9
1.4.2 Sukcinát-koenzym Q oxidoreduktáza.....	9
1.4.3 Koenzym Q-cytochrom c oxidoreduktáza.....	11
1.4.4 Cytochrom c oxidáza.....	12
1.4.5 F <sub>0</sub> F <sub>1</sub> ATP syntáza.....	12
1.4.6 Superkomplexy v systému OXPHOS.....	13
1.5 Mitochondriální onemocnění.....	14
1.5.1 Vybraná primární mitochondriální onemocnění.....	15
1.5.1.1 Poruchy komplexu I.....	15
1.5.1.2 Poruchy komplexu IV.....	16
1.5.2 Vybraná sekundární mitochondriální onemocnění.....	17
1.5.2.1 Huntingtonova choroba (HD).....	17
1.5.2.2 Poruchy metabolismu siřných aminokyselin.....	19
1.6 Diagnostika mitochondriálních onemocnění.....	21
1.6.1 Měření spotřeby kyslíku.....	22
1.6.1.1 Historie respirometrie.....	22
1.6.1.2 Princip fungování přístroje Oxygraph.....	24
1.6.1.3 Respirometrická měření.....	25
<b>2 Cíle diplomové práce.....</b>	<b>28</b>
<b>3 Materiál a metody.....</b>	<b>29</b>
3.1 Materiál.....	29
3.1.1 Kontrolní linie.....	29
3.1.2 Pacienti s primárními mitochondriálními poruchami.....	29
3.1.3 Pacienti se sekundárními mitochondriálními poruchami.....	32
3.2 Použité chemikálie.....	33

3.3	Použité přístroje .....	35
3.4	Metody .....	36
3.4.1	Skladování a rozmrazování buněk.....	36
3.4.2	Sklízení a zamrazování fibroblastů .....	36
3.4.3	Kultivace fibroblastů .....	37
3.4.3.1	Kultivace fibroblastů v médiu DMEM s glukózou .....	37
3.4.3.2	Kultivace fibroblastů v médiu DMEM s galaktózou.....	37
3.4.4	Sklízení fibroblastů pro účely respirometrie .....	38
3.4.5	Respirometrie .....	38
3.4.6	Analýzy výsledné křivky spotřeby kyslíku .....	40
3.4.7	Stanovení koncentrace proteinu podle Lowryho .....	42
3.4.8	Barvení mitochondriální sítě .....	42
3.4.9	Transmisní elektronová mikroskopie .....	43
<b>4</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>44</b>
4.1	Optimalizace metody vysoce citlivé polarografie pro účely diagnostiky mitochondriálních funkcí ve fibroblastech .....	44
4.1.1	Vliv délky kultivace na respiraci.....	44
4.1.2	Vliv věku na respiraci.....	46
4.2	Identifikace poruch OXPHOS na úrovni kultivovaných fibroblastů pomocí vysoce citlivé polarografie .....	48
4.2.1	Analýza spotřeby kyslíku u pacientů s primárními mitochondriálními defekty .....	48
4.2.2	Analýza spotřeby kyslíku u pacientů se sekundárními mitochondriálními defekty .....	52
4.2.2.1	Pacienti s Huntingtonovou chorobou .....	52
4.2.2.2	Pacienti s poruchou metabolismu sirných aminokyselin.....	55
4.3	Analýza ultrastruktury mitochondrií .....	57
4.4	Struktura mitochondriální sítě.....	59
4.5	Testování vlivu různých podmínek kultivace na funkci OXPHOS .....	60
4.5.1	Kultivace kontrolních linií v médiu DMEM s glukózou a galaktózou.....	60
4.5.2	Kultivace linií pacientů v médiu DMEM s glukózou a galaktózou.....	63
4.6	Aktivita komplexů dýchacího řetězce .....	66
<b>5</b>	<b>Diskuse .....</b>	<b>67</b>

5.1	Vliv doby kultivace a věku osoby v době odběru fibroblastů na respiraci .....	67
5.2	Identifikace poruch OXPHOS pomocí vysoce citlivé polarografie na úrovni kultivovaných fibroblastů .....	68
5.2.1	Pacienti s primárními mitochondriálními poruchami .....	69
5.2.2	Korelace výsledků získaných ve fibroblastech s nálezy ze svalové tkáně .....	70
5.2.3	Analýza fibroblastů pacientů se sekundárními mitochondriálními dysfunkcemi .....	72
5.2.3.1	Pacienti s Huntingtonovou chorobou .....	72
5.2.3.2	Pacienti s poruchou metabolismu sirných aminokyselin.....	73
5.3	Změny na úrovni ultrastruktury mitochondrií a mitochondriálních sítí .....	74
5.4	Testování vlivu různých podmínek kultivace na funkci OXPHOS .....	76
<b>6</b>	<b>Souhrn .....</b>	<b>78</b>
<b>7</b>	<b>Seznam použité literatury.....</b>	<b>80</b>
<b>8</b>	<b>Přílohy .....</b>	<b>90</b>
8.1	Hodnoty respirace kontrolní linie K1 v pasážích P5, P11 a P18.....	90
8.2	Hodnoty respirace kontrolních linií dětí (K1-K3) a dospělých (K4-K6) .....	90
8.3	Hodnoty respirace pacientů (P1-P10) s primárními mitochondriálními poruchami .....	92
8.4	Hodnoty respirace pacientů (P11-P18) s Huntingtonovou chorobou.....	93
8.5	Hodnoty respirace pacientů (P19-P24) s poruchou metabolismu sirných aminokyselin .....	94
8.6	Hodnoty respirace kontrolních linií kultivovaných v médiu DMEM s glukózou nebo galaktózou.....	95
8.7	Hodnoty respirace linií pacienta P6 kultivovaných v médiu DMEM s glukózou nebo galaktózou.....	97
8.8	Aktivita komplexů dýchacího řetězce .....	98
8.9	Seznam prezentací na mezinárodních konferencích, kde byly použity výsledky diplomové práce .....	99



## Seznam zkratek

·Q	radikál koenzymu Q
2D-PAGE	dvourozměrná polyakrylamidová gelová elektroforéza
a, A6L	podjednotky komplexu V kódované mtDNA
AD	Alzheimerova choroba
ADP	adenosindifosfát
ALS	amyotrofická laterální skleróza
AntA, AmA	antimycin A
Asc	askorbát
ATB	antibiotický a antimykotický roztok
ATP	adenosintrifosfát
BHMT	betain:homocystein methyltransferáza
BN-PAGE	modrá nativní polyakrylamidová gelová elektroforéza
bp	pár bazí
BSA	hovězí sérový albumin
CS	citrátsyntáza
CAG	cytosin, adenin, guanin (kodon pro glutamin)
CBS	cystathion $\beta$ -syntáza
CGL	cystathion $\gamma$ -lyáza
COI, COII, COIII	podjednotky komplexu IV kódované mtDNA
COX	cytochrom <i>c</i> oxidáza
COX6B1	podjednotka komplexu IV jaderně kódovaná
CT	počítačová tomografie
cyt	cytochrom
Da	Dalton
Dig	digitonin
DKK	dolní končetiny
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle medium
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová aminokyselina
e <sup>-</sup>	elektron
ECAR	extracelulární rychlost acidifikace
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
ELMI	elektronová mikroskopie
EMG	elektromyografie
F <sub>1</sub>	podjednotka komplexu V

FBS	fetální hovězí sérum
FCCP	karbonylkyanid-p-trifluoro-methoxyfenylhydrazon
FAD, FADH <sub>2</sub>	flavinadenindinukleotid
Fe-S	železosírné centrum
FMN	flavinmononukleotid
F <sub>o</sub>	část komplexu V
Glu, G	glutamát
H <sup>+</sup>	vodíkový kationt
HCMP	hypertrofická kardiomyopatie
HD	Huntingtonova choroba
HKK	horní končetiny
HRR	respirometrie s vysokým rozlišením
Htt	huntingtin
iFBS	inaktivované fetální hovězí sérum
JHD	juvenilní Huntingtonova choroba
K 1-6	kontrola
KI	komplex I
KII	komplex II
KIII	komplex III
KIV	komplex IV
KV	komplex V
LA	laktátová acidóza
LHON	Leberova hereditární optická neuropatie
LS	Leighův syndrom
Mal, M	malát
MAMs	z anglického „mitochondria-associated ER membranes
mHtt	mutovaný huntingtin
ME	mitochondriální encefalopatie
MELAS	mitochondriální encefalomyopatie, laktátová acidóza a mrtvici podobné příhody
MS	methionin syntáza
mtDNA	mitochondriální deoxyribonukleová aminokyselina
MTHFR	methylenetetrahydrofolát reduktáza
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
NARP	neuropatie, ataxie a retinitis pigmentosa

ND1, ND2, ND3, ND4 ND4L, ND5, ND6	podjednotky komplexu I kódované mtDNA
NDUFAF1, NDUFAF2, NDUFAF3, NDUFAF4,C20ORF7,C8ORF38, NUBPL, FOXRED1, ACAD9	asemblační faktory komplexu I kódované jadernou DNA
NDUFV1, NDUFV2, NDUFA1, NDUFA2,NDUFA9,NDUFA10, NDUFA11,NDUFA12,NDUFB3, NDUFB9,NDUFS1,NDUFS2,NDUFS3, NDUFS4, NDUFS6, NDUFS7, NDUFS8	podjednotky komplexu I kódované jadernou DNA
NMR	nukleární magnetická rezonance
OCR	rychlost spotřeby kyslíku
OXPPOS	oxidativní fosforylace
P	pacient
PBS	fyzilogický roztok pufrovaný fosfáty
PCR	polymerázová řetězová reakce
PD	Parkinsonova choroba
PDH	pyruvátdehydrogenáza
Pi	anorganický fosfát
PIC	koktejl inhibitorů proteáz
PMR	psychomotorická retardace
PMSF	fenylmethylylsulfonyl fluorid
POS	polarografický kyslíkový sensor
PVDF	polyvinylidín difluorid
Q	koenzym Q
QH <sub>2</sub>	redukovaný koenzym Q
RCR	index respirační kontroly
RIPA	z anglického „radio immunoprecipitation assay“
RNA	ribonukleová aminokyselina
ROS	reaktivní formy kyslíku
Rot	rotenon
rRNA	ribosomální ribonukleová aminokyselina
SDH	sukcinátdehydrogenáza
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	dodecylsulfát sodný polyakrylamidová gelová elektroforéza

SHMT	serin hydroxymethyltransferáza
SUIT	substrát-rozpřahovač-inhibitor titrace
Suk, Su	sukcinát
SURF1, SCO1, SCO2, COX10, COX15	asemblační faktory komplexu IV kódované jadernou DNA
T+E	roztok trypsinu a EDTA
THF	tetrahydrofolát
TMPD	tetramethyl-p-phenylendiamin dihydrochlorid
tRNA	transferová ribonukleová aminokyselina
UR	míra rozpřažení
$\alpha_3$ , $\beta_3$ , $\gamma$ , $\delta$ , $\epsilon$ , IF1, a, b <sub>2</sub> , c <sub>8</sub> , d, e, f, g, F6, A6L a OSCP	podjednotky komplexu V

# 1 Teoretický úvod

## 1.1 Mitochondrie

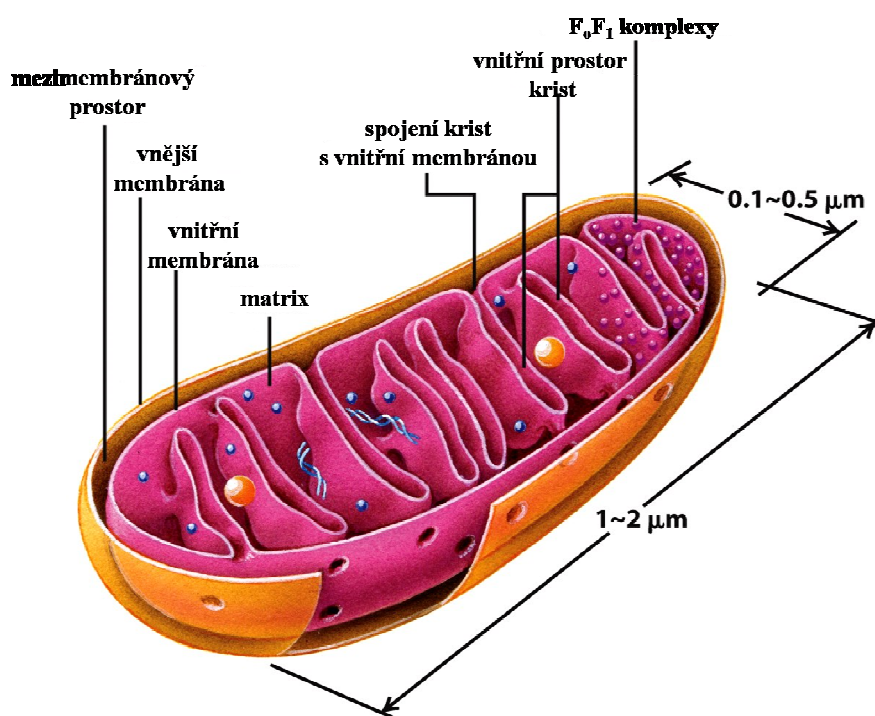
Mitochondrie jsou semiautonomní membránové organely, které zastávají v eukaryotických buňkách různou, mnohdy velmi odlišnou, funkci. Tyto organely se podílejí jak na procesech přežití buněk, tak i na procesech vedoucích k jejich smrti. Svoji důležitou roli sehrávají v energetickém metabolismu (Wilson 2013), ve stresové odpovědi (Kroemer et al. 2010) či v apoptóze (Brenner & Mak 2009). Podle endosymbiotické teorie tyto organely vznikly endocytózou  $\alpha$ -proteobakterie proto-eukaryotickým organismem, čemuž nasvědčuje přítomnost vlastního genomu (Margulis 1975). V buňce neexistují mitochondrie jako samostatné struktury, ale vytváří velmi dynamické struktury, které nazýváme mitochondriální sít' (Amchenkova et al. 1988).

Množství mitochondrií v buňkách je různé. Liší se v závislosti na buněčném typu a stavu organismu. V různých buněčných typech můžeme najít od několika set až po několik tisíc mitochondrií na buňku. Přesto, že se jejich velikost i tvar může lišit, vnitřní struktura se za fyziologických podmínek nemění. Běžně jsou mitochondrie 0,5 – 1  $\mu\text{m}$  dlouhé organely skládající se ze 4 kompartmentů: vnější membrány, mezimembránového prostoru, vnitřní membrány a matrix. Díky této členitosti vznikají v mitochondriích odlišná mikroprostředí, ve kterých mohou probíhat různé metabolické procesy jako Krebsův cyklus,  $\beta$ -oxidace mastných kyselin, biosyntéza hemu, glukoneogeneze, ketogeneze či metabolismus aminokyselin. Hlavní úlohou mitochondrií v energetickém metabolismu je bezpochyby syntéza ATP, který slouží jako energetický zdroj pro buňky (Scheffler 2007). Neméně podstatnou roli sehrávají tyto organely ve vápníkové signalizaci. Společně s endoplazmatickým retikulem totiž slouží jako hlavní zásobárna  $\text{Ca}^{2+}$  v buňce (Rizzuto et al. 2012).

## 1.2 Struktura mitochondrií

Mitochondrie se skládají ze 2 membrán (vnější a vnitřní), mezimembránového prostoru a matrix (Obr.1). Vnější mitochondriální membrána odděluje cytosol od mezimembránového prostoru. Díky přítomnosti porinů je vysoce propustná pro ionty a různé metabolity, čímž zprostředkovává komunikaci mezi cytosolem a mitochondrií. Velikost pórů umožňuje průchod různých molekul s maximální velikostí do 6kDa do mezimembránového prostoru (Zalman et al. 1980).

Mezimembránový prostor slouží k propojení mitochondriálních procesů s ostatními procesy probíhajícími v buňce. A to prostřednictvím výměny proteinů, lipidů a dalších molekul mezi matrix a cytosolem. Důležitou roli hraje mezimembránový prostor také v apoptóze. Obsahuje totiž velké množství cytochromu *c*, jehož vylití do cytosolu iniciuje aktivaci kaspáz a s tím spojené apoptotické procesy (Brenner & Mak 2009).



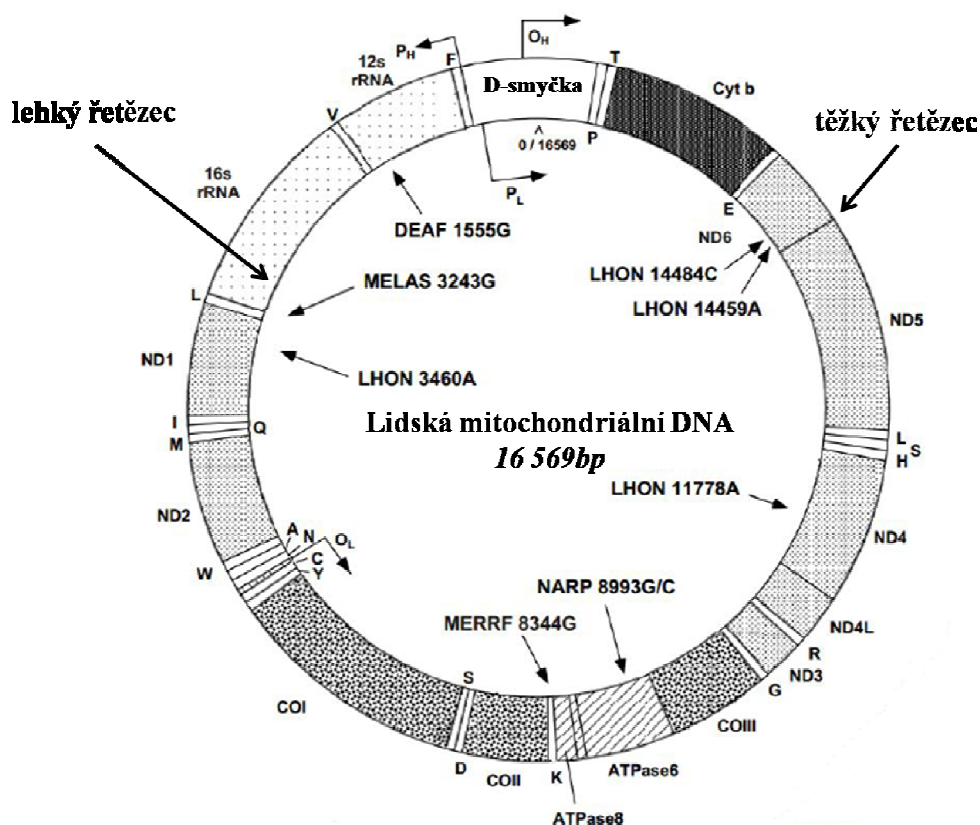
**Obr. 1. Model mitochondriální struktury.** Na obrázku je zobrazena mitochondrie skládající se z vnější a vnitřní membrány, mezimembránového prostoru a matrix. Jsou zde také vyobrazeny  $F_0F_1$  ATP syntázy na vnitřní mitochondriální membráně jež tvoří kristy, které jsou s ní propojeny prostřednictvím spojů (převzato a upraveno podle Lodish & Berk 2008).

Druhou membránou ohraničující mezimembránový prostor je membrána vnitřní. Tato membrána tvoří struktury vybíhající do matrix, které se nazývají kristy a jsou pomocí spojů s touto membránou propojeny. Kristy zvětšují povrch vnitřní membrány a tím poskytují větší prostor pro průběh metabolických reakcí. Na rozdíl od vnější je vnitřní membrána velmi málo propustná a její propustnost je přísně regulovaná specifickými přenašeči. Nejen v propustnosti, ale také ve složení obou membrán je výrazný rozdíl. Běžně se v membránách nachází přibližně 50% proteinů a 50% lipidů, ale vnitřní mitochondriální membrána je výjimkou s obsahem proteinů kolem 75%. Toto vysoké množství souvisí s přítomností proteinových přenašečů a také jednotlivých komponent systému oxidativní fosforylace (OXPHOS) v této membráně (kapitola 1.4).

Posledním mitochondriálním kompartmentem je matrix, kde se nachází řada solubilních enzymů, které katalyzují různé metabolické procesy (jako  $\beta$ -oxidaci mastných kyselin či Krebsův cyklus), ale také ribozomy a mitochondriální DNA (mtDNA) (Scheffler 2007).

### 1.3 Mitochondriální genom

Přítomnost DNA v mitochondriích byla objevena v roce 1963 (Nass & Nass 1963) a její sekvence byla následně popsána Andersonem v roce 1981. Mitochondriální DNA je dvouvláknová 16 569 bp dlouhá kruhová molekula (Obr. 2) (Anderson et al. 1981). V závislosti na obsahu bází rozdělujeme jednotlivé řetězce mtDNA na lehký (L - z anglického light), který obsahuje větší podíl cytosinů a těžký (H - z anglického heavy), který obsahuje větší podíl guanosinů. Součástí mtDNA je i významná regulační oblast nazývaná D-smyčka, ve které dochází k počátku replikace obou řetězců (Shadel & Clayton 1997).



**Obr. 2. Mapa lidské mtDNA.** Na obrázku je zobrazena struktura lidské mtDNA s vyznačenými geny, které kóduje. Pomocí černých šipek jsou označena místa v mtDNA, jejichž mutace souvisí s mitochondriálními chorobami (převzato a upraveno podle [www.mitomap.org](http://www.mitomap.org))

V průběhu ontogeneze došlo k přesunu mnoha původně mitochondriálních genů do jádra, i přesto dnes nalezneme geny, které jsou touto DNA kódované (Martin 1998). Dlouhou dobu se myslelo, že mtDNA kóduje celkem 37 genů, z toho 2 geny pro ribozomální RNA (12S rRNA a 16S rRNA), 22 genů pro tRNA a 13 genů pro peptidy, které jsou součástí jednotlivých komplexů systému OXPHOS (1.4) (Anderson et al. 1981). V poslední době se však ukazuje, že mtDNA zřejmě kóduje více než jen 13 genů pro peptidy. V mtDNA totiž byly objeveny krátké otevřené čtecí rámce, které kódují různě dlouhé peptidy. Doposud byly identifikovány dva takovéto peptidy, a to humanin (Lee et al. 2013) a MOTS-c, který reguluje metabolickou homeostázu a zřejmě také folátový cyklus (Lee et al. 2015).

Běžně se v mitochondriích obratlovců nachází mtDNA v počtu  $10^3$ - $10^4$  kopií na buňku (Shadel & Clayton 1997). Její množství se může lišit v závislosti na typu tkáně a fyziologickém stavu buněk. Například oxidativní stres přispívá ke změnám počtu mitochondrií stejně jako k ovlivnění integrity jejich DNA (Lee & Wei 2005). Zvýšený počet kopií stejně jako dědičnost po mateřské linii odlišují mitochondriální genom od jaderného. Výrazným rysem mtDNA je také vysoká kompaktnost, narozdíl od jaderného genomu totiž neobsahuje introny a některé geny se dokonce překrývají (Shadel & Clayton 1997).

Jak již bylo řečeno, mtDNA se nachází v matrix mitochondrií. Bylo prokázáno, že je zde spojena s vnitřní mitochondriální membránou (Nass 1969) a tvoří zde nukleoproteinové komplexy, které se nazývají nukleoidy (Legros 2004). MtDNA má proto velmi blízko ke komplexům systému OXPHOS (1.4). Během reakcí probíhajících v těchto komplexech dochází k tvorbě různých vedlejších produktů jako například reaktivních forem kyslíku (ROS). Jejich přítomnost v blízkosti mtDNA má zřejmě za následek zvýšený vznik mutací této DNA, který úzce souvisí s mnoha mitochondriálními onemocněními (Wallace 1999). Vzhledem k tomu, že mtDNA je v buňkách ve vysokém počtu, nemusí se dopad těchto mutací projevit. Kromě mutované mtDNA se totiž často v buňkách nachází i určitý počet kopií nemutované mtDNA, tento jev se nazývá heteroplazmie. Narozdíl od stavu homoplazmie, kdy jsou všechny mtDNA stejné. Rozhodující roli v projevu dané mutace poté sehrává překročení určitého množství mutované mtDNA, kterému se říká prahový efekt (Rossignol et al. 2003).

#### **1.4 Systém oxidativní fosforylace (OXPHOS)**

Systém oxidativní fosforylace (OXPHOS) je lokalizován na vnitřní mitochondriální membráně a skládá se ze 4 komplexů dýchacího řetězce (komplex I - IV), dvou elektronových



přenašečů (koenzymu Q a cytochromu *c*) a ATP syntázy (nazývanou též komplex V). Jednotlivými komplexy dýchacího řetězce jsou NADH-koenzym Q oxidoreduktáza (komplex I), sukcinát-koenzym Q oxidoreduktáza (komplex II), koenzym Q-cytochrom *c* oxidoreduktáza (komplex III) a cytochrom *c* oxidáza (komplex IV), (Obr. 3).

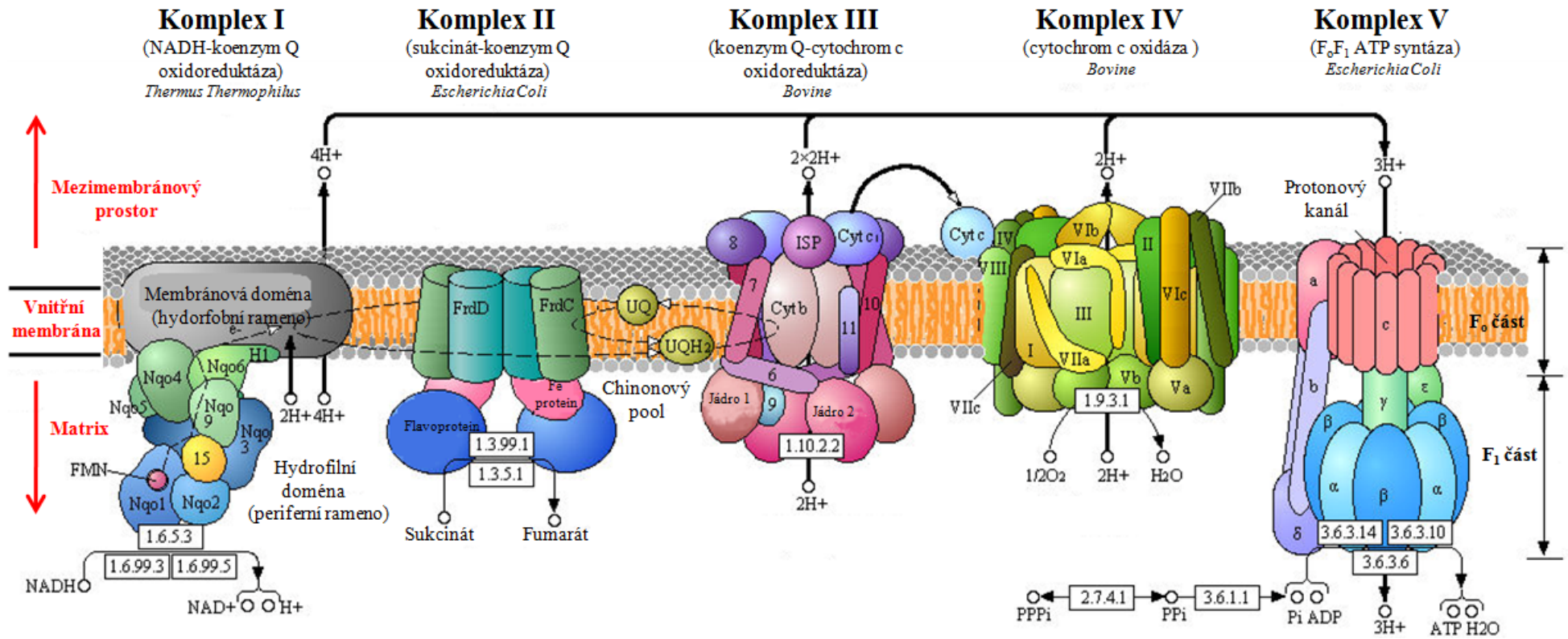
Hlavní úlohou systému OXPHOS je oxidace redukovaných koenzymů NADH a FADH<sub>2</sub> vznikajících během metabolických procesů (glykolýzy a Krebsova cyklu). Elektrony z těchto koenzymů jsou přenášeny přes jednotlivé komplexy až na koncový akceptor elektronů, kterým je kyslík. Komplexy se liší redoxním potenciálem, což zajišťuje správný směr toku elektronů. Současně s přenosem elektronů dochází k pumpování protonů (H<sup>+</sup>) do mezimembránového prostoru (komplexy I, III a IV) a tím k tvorbě protonového gradientu mezi matrix a mezimembránovým prostorem. Vzniklý gradient je následně využit F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP syntázou (komplexe V) k syntéze ATP z ADP a P<sub>i</sub> (Nicholls & Ferguson 2013).

#### 1.4.1 NADH-koenzym Q oxidoreduktáza

Prvním komplexem systému OXPHOS je NADH-koenzym Q oxidoreduktáza (komplex I, KI), která je největším enzymem dýchacího řetězce. Má tvar písmene L a u savců se skládá ze 44 podjednotek (14 základních a 30 přídatných) (Vinothkumar et al. 2014). Pouze 7 z těchto podjednotek (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 a ND6) je kódovaných mtDNA (Brandt 2006). Její hlavní role spočívá v příjmu elektronů (e<sup>-</sup>) od redukovaného koenzymu NADH. Rozlišujeme u ní 2 domény: hydrofilní, která zasahuje do matrix a je místem vazby NADH a hydrofobní, která je zanořena do vnitřní mitochondriální membrány (Sazanov & Walker 2000). Prvním krokem jejího fungování je zprostředkování přenosu 2e<sup>-</sup> z NADH na flavinmononukleotid (FMN). Následně jsou elektrony přeneseny přes 9 železo-sirných (Fe-S) center až na koenzym Q (ubichinon) a přes něj pokračují ve své cestě k dalšímu z komplexů, ke komplexu III. Společně s přenosem 2e<sup>-</sup> dochází k přesunu 4H<sup>+</sup> z matrix mitochondrie do mezimembránového prostoru (Baradaran et al. 2013).

#### 1.4.2 Sukcinát-koenzym Q oxidoreduktáza

Druhý z komplexů, sukcinát-koenzym Q oxidoreduktáza (komplex II, KII), sprostředkovává přenos e<sup>-</sup> z FADH<sub>2</sub>. Tento komplex se skládá ze 4 podjednotek (kódovaných pouze jadernou DNA) a rozlišujeme u něj velkou (solubilní) a menší (membránově vázanou) doménu. Sukcinát-koenzym Q oxidoreduktáza není jen součástí OXPHOS, ale také Krebsova cyklu. Sprostředkovává 2 odlišné chemické reakce: oxidaci sukcinátu na fumarát (v Krebsově

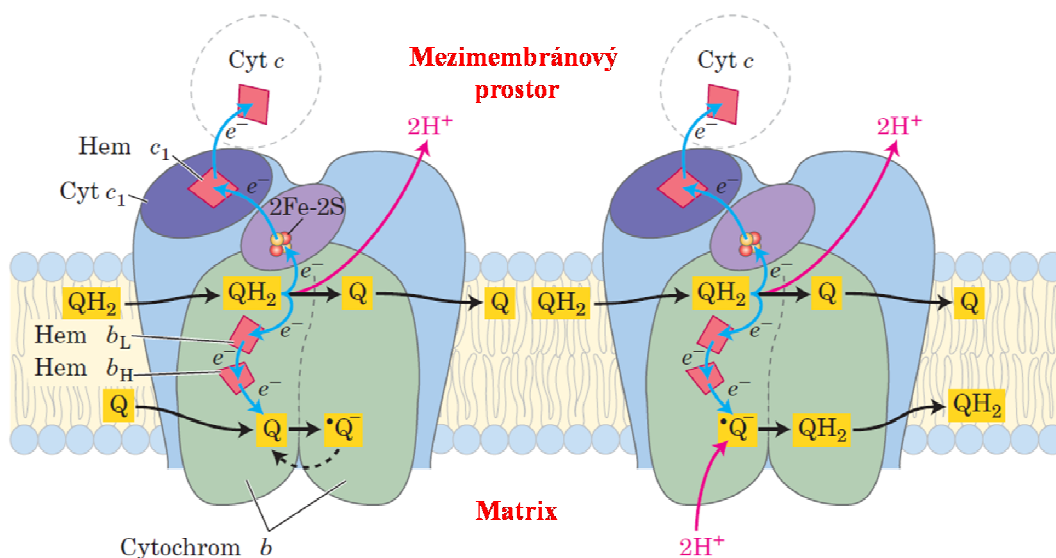


**Obr. 3. Schématické znázornění jednotlivých komplexů systému OXPHOS.** Na obrázku jsou zobrazeny komplexy systému OXPHOS I-V (NADH-koenzym Q oxidoreduktáza, sukcinát-koenzym Q oxidoreduktáza, koenzym Q-cytochrom c oxidoreduktáza, cytochrom c oxidáza a F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATPsyntáza). Tučnými černými šipkami je zde znázorněn přenos protonů přes vnitřní mitochondriální membránu do mezimembránového prostoru (komplex I, III a IV), který je poté využit komplexem V k syntéze ATP. Dále jsou zde zobrazeny podjednotky jednotlivých komplexů systému OXPHOS, O<sub>2</sub> jako cílový akceptor elektronů z redukováných koenzymů, elektronové přenašeče (koenzym Q – viz chinonový pool a cytochrom c) a jednotlivé části V. komplexu OXPHOS (F<sub>0</sub> část ve vnitřní membráně a F<sub>1</sub> část čnící do matrix), (převzato a upraveno podle Granata et al. 2009).

cyklu) a a redukcí koenzymu Q (ubichinonu na ubichinol v dýchacím řetězci). Její funkce spočívá v tom, že umožňuje přenos  $2e^-$  uvolněných během oxidace sukcinátu na fumarát, které následně redukují kovalentně navázaný flavinadenindinukleotid (FAD). Tyto elektrony poté pokračují přes Fe-S centra až na koenzym Q. Z něj jsou následně přeneseny na III. komplex systému OXPHOS. Komplex II je jediným z komplexů dýchacího řetězce u nějž nedochází s přenosem elektronů k pumpování protonů do mezimembránového prostoru (Iverson 2013).

### 1.4.3 Koenzym Q-cytochrom *c* oxidoreduktáza

Přenos elektronů z redukovaných koenzymů sprostředkovaný na komplexech I a II dále pokračuje přes další z komplexů dýchacího řetězce, a to komplex III (KIII) neboli koenzym Q-cytochrom *c* oxidoreduktázu. Tento komplex se skládá z 11 podjednotek z nichž pouze 1 (cytochrom *b*) je kódovaná mtDNA (Crofts 2004). Přenos elektronů tímto komplexem funguje prostřednictvím tzv. Q cyklu (Obr.4).



**Obr. 4. Model fungování Q cyklu.** Na obrázku je schématicky zobrazen Q cyklus (1.4.3). Q znázorňuje oxidovanou formu koenzymu Q,  $QH_2$  redukovanou formu koenzymu Q,  $\cdot Q$  radikál koenzymu Q, 2Fe-2S železosírné centrum, cyt zobrazuje cytochrom,  $e^-$  elektron a  $H^+$  proton (převzato a upraveno podle Lehninger et al. 2005)

Na komplex III jsou přeneseny  $2e^-$  ve formě redukovaného koenzymu Q ( $QH_2$ ), které putují odlišnými drahami. Jeden z elektronů jde cestou přes Fe-S centra na cytochrom  $c_1$  a odtud na cytochrom  $c$  (mobilní přenašeč, který je schopný přenášet pouze  $1e^-$ ). Druhý elektron putuje cestou přes cytochrom  $b$  (obsahující hemy  $b_L$  a  $b_H$ ) na oxidovaný koenzym Q (Q), ze kterého vytvoří radikál ( $\cdot Q$ ). Celý proces se opakuje vazbou dalšího redukovaného

koenzymu Q. Jeden z elektronů opět putuje cestou přes Fe-S centra až na cytochrom *c* a druhý přes cytochrom *b* až na koenzym Q, který se stane plně redukováným. Během přenosu  $2e^-$  dojde k transportu  $4H^+$  do mezimembránového prostoru (Crofts et al. 2008).

#### 1.4.4 Cytochrom *c* oxidáza

Cytochrom *c*, který je na komplexu III redukován přenáší elektrony (vždy pouze 1) na poslední z komplexů dýchacího řetězce, kterým je cytochrom *c* oxidáza (COX), neboli komplex IV (KIV). Redukovaný cytochrom *c* nejprve předává elektrony měďnatému centru  $Cu_a$ . Ty dále pokračují přes cytochrom *a*, cytochrom  $a_3$  a druhé měďnaté centrum  $Cu_b$  až na finální akceptor elektronů  $O_2$ , ze kterého vzniknou 2 molekuly  $H_2O$ . Tento komplex se skládá z 13 podjednotek z nichž pouze tři (COI, COII, COIII) jsou kódované mtDNA. Pro redukci 1 molekuly  $O_2$  jsou potřebné 4 elektrony, které cytochrom *c* donese postupně. V průběhu redukce molekuly  $O_2$  dojde k přenosu  $4H^+$  z matrix do mezimembránového prostoru (Brzezinski & Gennis 2008).

#### 1.4.5 $F_0F_1$ ATP syntáza

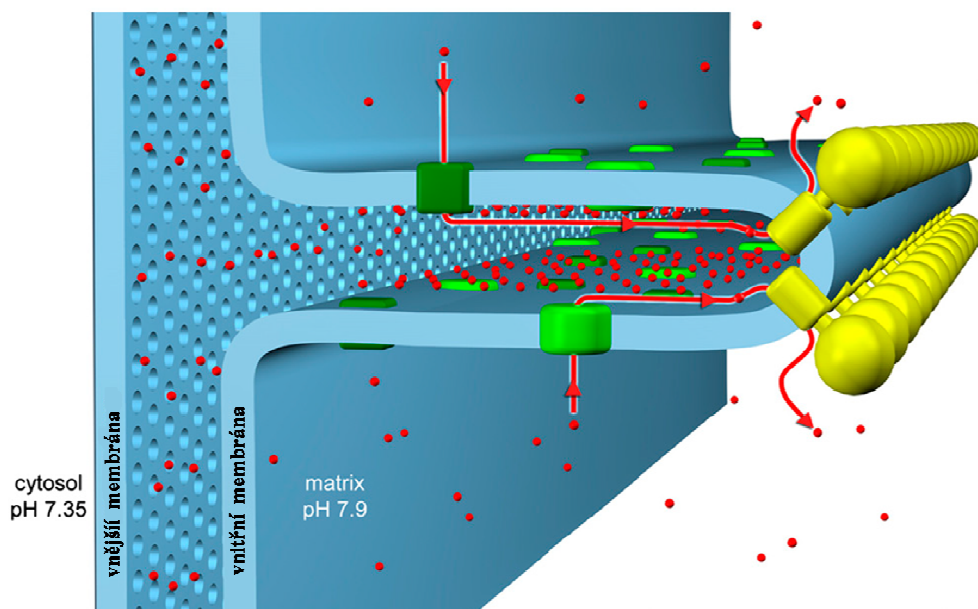
Přenosem elektronů přes jednotlivé komplexy systému OXPHOS dochází k nárůstu protonového gradientu mezi matrix a mezimembránovým prostorem. Podle chemiosmotické hypotézy je vzniklý gradient využit posledním z komplexů OXPHOS k syntéze ATP (Mitchell 1961). Tento komplex se nazývá  $F_0F_1$  ATP syntáza nebo také komplex V (KV) a skládá se z 16 různých podjednotek z nichž pouze 2 ( $a$  a A6L) jsou kódované mtDNA. Lidskou  $F_0F_1$  ATP syntázu můžeme rozdělit na 2 funkční celky -  $F_1$  a  $F_0$ . První z částí  $F_1$  se skládá z 6 podjednotek ( $\alpha_3$ ,  $\beta_3$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ , inhibičního protein IF1) a vyčnívá do matrix. Druhá část  $F_0$  je zakotvena ve vnitřní mitochondriální membráně a skládá se z 10 podjednotek ( $a$ ,  $b_2$ ,  $c_8$ ,  $d$ ,  $e$ ,  $f$ ,  $g$ , F6, A6L a OSCP), (Boyer 1997).

Přenos protonů z mezimembránového prostoru zpět do matrix prostřednictvím  $F_0F_1$  ATP syntázy je spojen s konformačními změnami jednotlivých podjednotek. Přesný způsob, kterým  $H^+$  prochází dosud nebyl objasněn. Nejspíše k tomu však dochází tak, že nejprve  $H^+$  prochází přes  $F_0$  část. Konkrétně přes prstenec tvořený  $c$  podjednotkami, kterých je různé množství v závislosti na typu organismu (u savců je  $c$ -prstenec tvořen 8 podjednotkami) (Watt et al. 2010). Průchod protonů způsobí rotaci  $c$ -prstence jež vyvolá rotaci  $\gamma$  podjednotky, která způsobí změny  $F_1$  části v matrix vedoucí k cyklickým změnám podjednotky  $\beta$  (v hexameru  $\alpha_3\beta_3$ ) a to umožní tvorbu ATP (Menz et al. 2001).

### 1.4.6 Superkomplexy v systému OXPHOS

V poslední době různé výzkumy (Bianchi et al. 2004, Dudkina et al. 2005) poukazují na to, že jednotlivé komplexy systému OXPHOS nejsou v membráně rozmístěny náhodně, jak se původně myslelo, ale tvoří tzv. superkomplexy. Vznik takovýchto struktur je zřejmě velmi výhodný. Přiblížením jednotlivých komplexů dochází k jejich stabilizaci (Schägger et al. 2004), k účinnějšímu směřování substrátů (Schägger 2001) a také ke kontrolování produkce ROS (Winge 2012).

Tvorby superkomplexů se v různých poměrech (lišících se u jednotlivých organismů) účastní komplexy I, III, IV a V. Jediným z komplexů, který tyto struktury zřejmě netvoří je komplex II. Superkomplexy se na základě složení rozdělují do 4 hlavních skupin: tvořené  $KI+KIII_2$ ,  $KIII_2+KIV_{1-2}$ ,  $KI+KIII_2+KIV_{1-4}$  a  $KV_2$  (Chaban et al. 2014). V lidském dýchacím řetězci jsou superkomplexy nejčastěji tvořeny KI a KIII, tomuto uspořádání se říká respirazom. Mnohdy se k těmto dvěma komplexům přidružuje také KIV (Schägger et al. 2004). Bylo prokázáno, že tvorba superkomplexů společně s uspořádáním komplexu V do dimerů na konci mitochondriálních krist (Obr.5) zřejmě umožňuje vytvářet lokální gradient protonů, který je poté efektivně využit k syntéze ATP (Davies et al. 2011).



**Obr. 5. Struktura dimerů komplexu V na mitochondriální kristě.** Na modré vnitřní mitochondriální membráně jsou žlutě vyznačeny dimery KV, zeleně komplexy dýchacího řetězce (s převahou KI), a červeně protony pumpované do oblasti krist jednotlivými komplexy dýchacího řetězce (I-IV), které jsou následně využity KV k syntéze ATP (převzato a upraveno podle Davies et al. 2011).

## 1.5 Mitochondriální onemocnění

Poruchy mitochondrií způsobují mnoho různých onemocnění s velmi odlišnými projevy. Skupinu těchto heterogenních poruch nazýváme mitochondriální onemocnění nebo také mitopatie a rozdělujeme je na primární a sekundární.

Primární mitochondriální onemocnění jsou důsledkem dědičné nebo nově vzniklé mutace, která vede ke změnám funkce proteinů či RNA s přímým dopadem na metabolismus mitochondrií. Primární mitochondriální onemocnění mohou vznikat mutací jaderné či mtDNA. První případ mitochondriálního onemocnění byl popsán Luftem v roce 1962 (Luft et al. 1962), na objasnění dalších případů se čekalo ještě mnoho let. Trvalo téměř 25 let od objevu mtDNA (Nass & Nass 1963) než bylo prokázáno, že mutace mtDNA mohou souviset s patologickým stavem. První důkazy, které tuto skutečnost potvrdily, byly podány až v roce 1988, a to nejprve Holtem (Holt et al. 1988) a poté Wallaceem (Wallace et al. 1988). Od té doby byla popsána již celá řada mutací jaderné i mtDNA souvisejících s mitochondriálními onemocněními. V dnešní době se odhaduje, že tato onemocnění postihují přibližně 1 člověka z 5000. Vzhledem k velkému počtu jaderně kódovaných genů, zapojených do správného fungování mitochondrií, se však odhaduje, že až 1 z 5 jedinců může být přenašečem takovéto mutace (Thorburn 2004).

Komplexy systému OXPHOS se skládají z mnoha podjednotek, pro jejich správnou funkci je proto velmi důležitá nejen korektní syntéza jednotlivých podjednotek, ale také jejich správné sestavení a udržení. Na sestavování podjednotek enzymů OXPHOS se podílí celá řada asemblačních faktorů. Mnoho mitochondriálních poruch je proto způsobeno nejen mutacemi genů kódujících jednotlivé podjednotky, ale také poruchami jejich asemblačních faktorů, či narušením mitochondriální fúze nebo dělení (Schapira 2012).

Mitochondrie hrají důležitou roli v mnoha metabolických procesech a také v udržení buněčné homeostázy a fyziologie. Narušením těchto procesů dochází ke vzniku sekundárních mitochondriálních poruch, které se projevují změnami v biogenezi mitochondrií, v  $\text{Ca}^{2+}$  signalizaci, v extramitochondriální signalizaci, ale také zvýšenou tvorbou volných radikálů, které mohou výrazně poškodit systém OXPHOS. Mezi sekundární mitochondriální onemocnění řadíme patologické změny, které vznikají v souvislosti s celou řadou chorob, například neurodegenerativních poruch jako je Huntingtonova choroba (HD), Alzheimerova choroba (AD), Parkinsonova choroba (PD), amyotrofická laterální skleróza (ALS), ale také

třeba u pacientů s diabetem mellitem nebo dalších dědičných nemitochondriálních poruch metabolismu (Duchen & Szabadkai 2010).

Mitochondriální onemocnění postihují nejčastěji tkáně s vysokou energetickou náročností jako jsou svaly, srdce a mozek. K jejich propuknutí může dojít kdykoli. Nástup nemoci v nízkém věku bývá častější a mívá většinou fatální následky, narozdíl od propuknutí nemoci ve věku pozdějším (Schapira 2012). Pro mitochondriální onemocnění je typická velká heterogenita různých příznaků. Jedna mutace se může projevit mnoha klinickými projevy v různých tkáních, jako například bodová mutace (T8993G) v mtDNA u syndromu NARP (Mattiuzzi et al. 2004). A naopak jeden klinický projev může být způsoben mnoha různými mutacemi jako je tomu u Leighova syndromu (Nesbitt et al. 2012).

## **1.5.1 Vybraná primární mitochondriální onemocnění**

### **1.5.1.1 Poruchy komplexu I**

Komplex I patří mezi největší z enzymů systému OXPHOS. Poruchy tohoto komplexu mohou být způsobeny mutací podjednotek kódovaných jadernou DNA, mtDNA nebo mutací některého z jaderně kódovaných asemblačních faktorů. Izolovaný defekt komplexu I patří mezi nejčastější mitochondriální poruchy systému OXPHOS u dětí (Kirby et al. 1999). U těchto onemocnění dochází k nástupu většinou v raném dětství a jejich průběh bývá velmi rychlý a zastoupený řadou různých příznaků. Mezi projevy nemoci patří například laktátová acidóza (LA), leukoencefalopatie, kardiomyopatie nebo jsou spojeny se syndromy jako MELAS, LHON či Leighův syndrom (Loeffen et al. 2000). Klinickými projevy mutace mtDNA kódované podjednotky ND1 jsou nejčastěji syndromy LHON (Howell et al. 1991) či MELAS (Kirby et al. 2004). Mutace další z mtDNA kódovaných podjednotek ND5 se velmi často kromě těchto dvou syndromů projevují také Leighovým syndromem (Taylor et al. 2002). Doposud byla popsána souvislost mitochondriálních onemocnění komplexu I s mutací všech 7 mtDNA kódovaných podjednotek, 17 z 38 jaderně kódovaných podjednotek a 9 asemblačních faktorů (Tab 1.), (Fassone & Rahman 2012).

Biochemicky se poruchy komplexu I mitochondriálního původu mohou projevovat na funkční úrovni snížením aktivity komplexu, a to samostatně nebo v kombinaci se změnou v proteinovém obsahu celého komplexu nebo jeho podjednotek, přičemž míra postižení jednotlivých tkání se může lišit.

**Tab 1. : Popsané mutace komplexu I dýchacího řetězce související s mitochondriálními onemocněními (převzato a upraveno podle Fassone & Rahman 2012)**

	Jaderně kódované	mtDNA kódované
<b>Mutované podjednotky komplexu I</b>	NDUFV1, NDUFV2, NDUFA1, NDUFA2, NDUFA9, NDUFA10, NDUFA11, NDUFA12, NDUFB3, NDUFB9, NDUFS1, NDUFS2, NDUFS3, NDUFS4, NDUFS6, NDUFS7, NDUFS8	ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6
<b>Mutované asemblační faktory</b>	NDUFAF1, NDUFAF2, NDUFAF3, NDUFAF4, C20ORF7, C8ORF38, NUBPL, FOXRED1, ACAD9	—————

### 1.5.1.2 Poruchy komplexu IV

Cytochrom *c* oxidáza neboli komplex IV je posledním z komplexů dýchacího řetězce a skládá se z 13 podjednotek. Z nich 3 (COXI, COXII, COXIII) jsou kódované mtDNA a zbylých 10 jadernou DNA. Dlouho se myslelo, že defekty komplexu IV jsou způsobeny pouze mutacemi mtDNA kódovaných podjednotek a nikoli mutacemi jaderně kódovaných podjednotek (Shoubridge 2001). Poté byla u jedné rodiny objevena mutace v jaderně kódované podjednotce COX6B1 (Massa et al. 2008). K poruchám jaderně kódovaných podjednotek však dochází velmi často, a to v důsledku mutací jejich jaderně kódovaných asemblačních faktorů Tab 2. (Shoubridge 2001). Mezi mutované asemblační faktory objevené u pacientů s poruchou IV. komplexu patří nejčastěji SURF1 (Tiranti et al. 1998) a SCO2 (Papadopoulou et al. 1999). V poslední době bylo popsáno mnoho dalších mutací asemblačních faktorů, mezi které patří SCO1 (Valnot, Osmond, et al. 2000), COX10 (Valnot, von Kleist-Retzow, et al. 2000) či COX15 (Antonicka, Mattman, et al. 2003).

Mezi klinické projevy doposud jediné mutace popsané u jaderně kódované podjednotky COX6B1 patří encefalopatie, myopatie a poruchy růstu s časným nástupem (Massa et al. 2008). Klinické projevy mutace asemblačního faktoru SURF1 mají většinou také nástup již v nízkém věku a patří mezi ně převážně Leighův syndrom (Tiranti et al. 1998). Bylo zjištěno, že u pacientů s poruchou IV. komplexu, způsobenou mutací v SURF1, kteří mají Leighův syndrom, je snižená aktivita tohoto komplexu ve všech tkáních na 10-25% v porovnání se zdravými jedinci (Shoubridge 2001). Mutace asemblačního faktoru SCO2



se projevují také velmi brzy, a to převážně hypertrofickou kardiomyopatií často doprovázenou encefalopatií (Jaksch et al. 2000). Případů pacientů s mutací COX10 zatím nebylo popsáno mnoho. U prvního z popsaných případů bylo zjištěno, že mezi projevy této mutace patří tubulopatie a leukodystrofie (Valnot, von Kleist-Retzow, et al. 2000). S dalšími popsanými případy byla škála klinických projevů této mutace rozšířena o anémii, Leighův syndrom, ztrátu sluchu a kardiomyopatii (Antonicka, Leary, et al. 2003). Zatím poslední popsaná mutace asambláčního faktoru byla u COX15. Klinickým projevem této mutace je infantilní hypertrofická kardiomyopatie (Antonicka, Mattman, et al. 2003).

**Tab 2. : Popsané mutace komplexu IV dýchacího řetězce související s mitochondriálními onemocněními**

	Jaderně kódované	mtDNA kódované
Mutované podjednotky komplexu IV	COX6B1	COXI, COXII, COXIII
Mutované asambláční faktory	SURF1, SCO1, SCO2, COX10, COX15	—————

## 1.5.2 Vybraná sekundární mitochondriální onemocnění

### 1.5.2.1 Huntingtonova choroba (HD)

Sekundární mitochondriální poruchy zahrnují velkou škálu různých onemocnění, jedním z nich je i Huntingtonova choroba (HD, z anglického Huntington's disease). Toto neurodegenerativní onemocnění bylo popsáno Georgem Huntingtonem v roce 1872. Huntington popsal mnoho příznaků onemocnění jako poruchy pohybu či změny osobnosti a také určil, že se jedná o autozomálně-dominantní chorobu (Bates 2005). Uvádí se, že tímto onemocněním trpí 4-8 jedinců ze 100 000 (Harper 1992).

Příčinou HD je zvýšený počet repetitivních CAG (kodon pro glutamin) v genu *IT-15* pro huntingtin (Htt), který se nachází na 4. chromozomu. To vede k prodloužení polyglutaminového řetězce a následně ke změně struktury proteinu Htt (MacDonald 1993). Nelze určit přesnou hranici počtu CAG, která souvisí s propuknutím onemocnění. Běžně se uvádí, že rozhodujícím počtem je 36 repetitivních, ale byly popsány případy, kdy jedinci

s 39 CAG repeticemi neměli žádné známky HD (Rubinsztein et al. 1996) a naopak jedinci s 35 repeticemi trpěli HD (Barron et al. 1993). S množstvím repetitic zřejmě souvisí věk propuknutí choroby a doba přežití HD pacientů. Podle počtu repetitic nelze určit přesný věk nástupu nemoci, ale byly prokázány určité souvislosti, které nasvědčují tomu, že u pacientů s větším počtem repetitic dochází k propuknutí nemoci v nižším věku než u pacientů, kteří mají repetitic nižší počet (Stine et al. 1993). První příznaky nemoci se obvykle objevují mezi 30.-50. rokem života, k jejich projevu však může dojít i v mnohem nižším věku. Taková forma HD se nazývá juvenilní Huntingtonova choroba (JHD) (Telenius et al. 1993).

U pacientů s HD dochází k postupnému zhoršování zdravotního stavu vlivem ztráty neuronů (Vonsattel et al. 1985). Zpočátku jsou zdravě vypadající jedinci nejprve postiženi mírnými změnami chování a poruchou kognitivních funkcí, následně mimovolnými pohyby a poruchami koordinace (Novak & Tabrizi 2011). V počátcích nemoci byla u HD pacientů pozorována i ztráta hmotnosti (Djoussé et al. 2002). Projevy nemoci se v průběhu času zhoršují, postupně dochází k výrazným problémům s učením, adaptací, k depresím, poruchám spánku či ke ztrátě paměti. V poslední fázi onemocnění, což bývá zhruba 15-20 let od propuknutí nemoci, jsou pacienti většinou již upoutáni na lůžku, dochází u nich k demenci a následně ke smrti (Rosenblatt 2007).

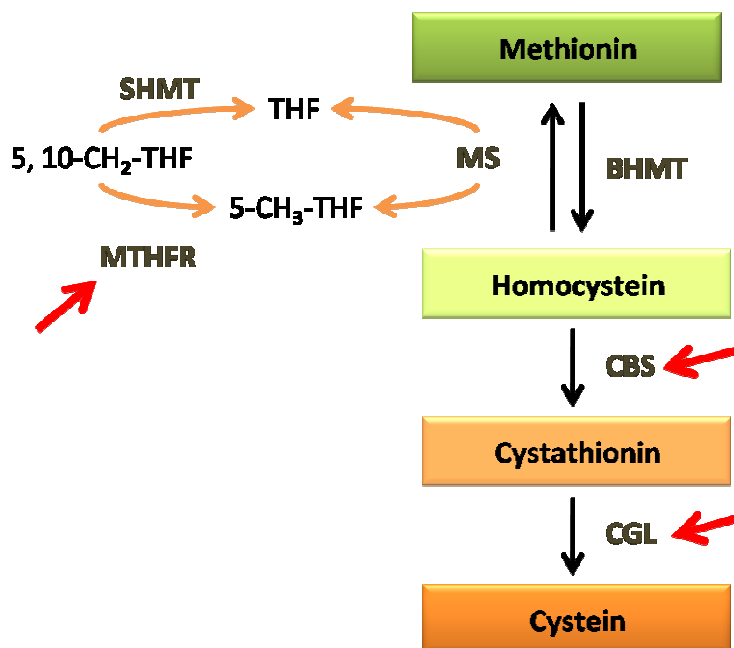
Funkce normální formy Htt zatím nebyla zcela objasněna, stejně jako přesný mechanismus, kterým způsobuje mutovaný Htt onemocnění HD. Na myším modelu bylo prokázáno, že mutace genu pro Htt vede u homozygotních jedinců k embryonální letalitě (Nasir et al. 1995). Dosavadní poznatky také naznačují, že mutovaný Htt se translokuje do buněčného jádra, což vede k vyvolání apoptotických mechanismů (Saudou et al. 1998).

Jednou z hypotéz vysvětlující patogenezi tohoto onemocnění je to, že u pacientů s HD dochází k narušení mitochondriálních funkcí. Mutovaný Htt způsobuje v mozkové tkáni poruchu mitochondriální homeostázy  $Ca^{2+}$ , která vede ke snížení mitochondriálního membránového potenciálu a defektům OXPHOS (Milakovic et al. 2006). Bylo zjištěno, že v mozkové tkáni (konkrétně v nucleus caudatus a putamen) HD pacientů je snížené množství II. a III. komplexu OXPHOS a také snížená aktivita IV. komplexu (Gu et al. 1996), což způsobuje pokles tvorby ATP (Seong et al. 2005). Velmi zajímavé bylo i zjištění, že dochází k přímé asociaci mutovaného Htt s mitochondriemi (Petrasch-Parwez et al. 2007). Některé studie poukazují na to, že mutovaný Htt může způsobovat zvýšenou aktivaci mPTP (Panov et al. 2002), což následně vede k apoptóze neuronů (Zeron et al. 2004). Existují určité náznaky toho, že v mozkové tkáni HD pacientů dochází také ke zvýšenému oxidativnímu

stresu (Browne et al. 1997). Dále se ukazuje, že mutovaný Htt může ovlivňovat fúzi a dělení mitochondrií, a tím ovlivňovat celou mitochondriální síť. Mutovaný Htt vyvolává v neuronech a fibroblastech HD pacientů fragmentaci mitochondrií, což je zřejmě způsobeno jeho interakcí s proteinem Drp1 zodpovědným za mitochondriální dělení. Mutovaný Htt totiž stimuluje aktivitu tohoto proteinu, což vede k rozpadu mitochondriální sítě (Song et al. 2011). Nejnovější zjištění navíc naznačuje, že mutovaný Htt může narušit transport proteinů do matrix a vnitřní mitochondriální membrány, což také zřejmě přispívá k patologii onemocnění (Yano et al. 2014).

### 1.5.2.2 Poruchy metabolismu sirných aminokyselin

Sekundární mitochondriální onemocnění jsou spojována s celou řadou dalších metabolických poruch. Jednou z drah, která může být narušena je metabolismus sirných aminokyselin, konkrétně převedení síry z methioninu na cystein (Obr. 6). Jedná se o několikastupňový proces, který je katalyzován mnoha enzymy. Bylo prokázáno, že mutace v genech kódujících tyto enzymy souvisí s některými onemocněními jako například homocystinurií či cystathioninurií (Barić 2009).



**Obr. 6. Zjednodušené schéma metabolismu sirných aminokyselin.** Na obrázku je znázorněna přeměna methioninu na cystein. Červené šipky označují enzymy, jejichž mutace souvisí s homocystinurií či cystathioninurií. BHMT – betain:homocystein methyltransferáza, MS – methionin syntáza, THF – tetrahydrofolát, SHMT – serin hydroxymethyltransferáza, MTHFR – methylenetetrahydrofolát reduktáza, CBS – cystathion  $\beta$ -syntáza, CGL – cystathion  $\gamma$ -lyáza (převzato a upraveno podle Brosnan & Brosnan 2006)

Homocystinurie je autozomálně recesivní dědičné metabolické onemocnění, které je většinou způsobené mutacemi v genu *CBS* pro cystathionin  $\beta$ -syntetázu, enzym, který katalyzuje přeměnu homocysteinu na cystathionin. V důsledku mutace *CBS* dochází ke snížení množství cystathioninu a cysteinu, a zároveň také k nárůstu množství homocysteinu a methioninu v moči a plazmě (Kraus et al. 1999). V některých případech může být také homocystinurie způsobená mutací enzymu účastnícího se metabolismu folátu methylenetetrahydrofolát reduktázy (*MTHFR*) (Rosenblatt et al. 1992). Mezi klinické projevy homocystinurie patří různé oční komplikace, endoteliální poruchy, osteoporóza, psychiatrická onemocnění a v některých případech může docházet u pacientů i k PMR. Na základě klinických projevů rozlišujeme 2 formy homocystinurie, a to lehkou a těžkou. Zatímco těžká forma většinou zahrnuje všechny výše zmíněné projevy, lehká forma zahrnuje převážně poruchy endoteliální.<sup>1</sup>

Cystathioninurie je autozomálně recesivní dědičné onemocnění způsobené mutací v genu *CTH* kódujícím cystathionin  $\gamma$ -lyázu (*CGL*). Tento enzym je zodpovědný za štěpení cystathioninu na cystein a  $\alpha$ -ketobutyrát. Mutace v genu *CTH* vede k hromadění cystathioninu v plazmě a jeho následnému vylučování močí. Proto narozdíl od homocystinurie nemá většinou cystathionurie tak závažné klinické projevy. Většina jedinců s mutací v genu *CTH* nemá dokonce žádné klinické projevy a onemocnění u nich mnohdy není identifikováno. Byly však popsány i případy pacientů s mutací v genu *CTH*, kteří měli mírné neurologické a somatické poruchy (Bittles & Carson 1974).

Bylo zjištěno, že u potkanů, kterým bylo prostřednictvím zvýšeného příjmu methioninu uměle navozena homocystinurie, došlo k degeneraci mitochondrií v endoteliálních buňkách aorty a k jejich následnému odumírání (Matthias et al. 1996). Další studie prokázala, že v hipokampu krysy s chemicky navozenou homocystinurií dochází ke snížení aktivity II a IV. komplexu systému OXPHOS (Streck et al. 2003). Následně bylo také zjištěno, že zvýšené množství homocysteinu vyvolává zvýšenou tvorbu ROS, což vede k oxidativnímu stresu (Tyagi et al. 2005). Tyagi s kolegy poté přišli s teorií, že zvýšené množství ROS může vést ke ztrátě mitochondriálního membránového potenciálu, což vede k uvolnění cytochromu *c* z mitochondrií a to je zřejmě příčinou následného odumírání endoteliálních buněk (Tyagi et al. 2006). Další studie prokázaly, že zvýšené množství homocysteinu narušuje homeostázu  $\text{Ca}^{2+}$  a vede ke snížené produkci ATP (Kamat et al.

---

<sup>1</sup> zdroj: [www.omim.org](http://www.omim.org)

2014). Všechna tato zjištění poukazují na to, že narušení fyziologických procesů v metabolismu sirných aminokyselin vede k sekundárním mitochondriálním defektům.

## **1.6 Diagnostika mitochondriálních onemocnění**

Mitochondriální onemocnění se projevují velkou heterogenitou klinických příznaků na úrovni různých tkání, což velice komplikuje jejich diagnostiku. Nelze vždy k určení toho, zda se u daného pacienta jedná o mitochondriální onemocnění, použít tkáň, kde dochází k největší expresi defektu. Většina postižených tkání je velmi těžko dostupná (kosterní svaly) nebo dokonce není dostupná vůbec (ledviny, játra, mozek). Běžnou praxí v diagnostice je dnes svalová biopsie, která umožňuje odběr kosterního svalstva v celkové anestezii (North 2011). I ta však může pacienta s narušenou funkcí mitochondrií velice zatěžovat. Navíc bylo prokázáno, že lokální anestetika používaná při samotné biopsii mohou inhibovat přenos elektronů v systému OXPHOS (hlavně v komplexu I), a tím ovlivnit výsledky následných analýz (Chazotte & Vanderkooi 1981). Všeobecnou snahou je proto určit příčinu klinických příznaků z některé z lépe dostupných periferních tkání, jejichž odběr pacienta zatěžuje o poznání méně. K diagnostice mitochondriálních onemocnění se proto dnes využívají například lymfocyty či kultivované kožní fibroblasty (van den Heuvel et al. 2004). Analýza kožních fibroblastů, ale může být také mnohdy poněkud zrádná. Některé poruchy systému OXPHOS, které se manifestují v kosterním svalstvu, nemají ve fibroblastech žádný projev (Thorburn et al. 2004). Proto je vždy nutné využít několik různých tkání zároveň k přesnějšímu určení daného onemocnění.

V diagnostice mitochondriálních poruch se většinou využívá kombinace klinických pozorování, zobrazovacích metod (CT, NMR, EMG) (Kirkman et al. 2008) a laboratorních vyšetření, které zahrnují biochemické, histologické a genetické přístupy. Prvním diagnostickým krokem je většinou analýza metabolitů (laktátu, organických kyselin či aminokyselin) z krve a moči. U pacientů s poruchou mitochondriálního energetického metabolismu totiž velice často dochází k tomu, že v důsledku nízkého využití pyruvátu vzroste hladina laktátu v krvi a moči (Robinson 2006). Následně se k určení diagnózy využívají různé biochemické metody, a to funkční mezi které patří například měření spotřeby kyslíku, oxidace substrátů či spektrofotometrické měření aktivity jednotlivých komplexů systému OXPHOS. Nebo proteinové, zahrnující SDS-PAGE, BN-PAGE, 2D-PAGE, gradientovou elektroforézu či western blot. Velmi užitečné je také využití optických zobrazovacích metod, jako histochemie, imunohistochemie a fluorescenční či elektronové

mikroskopie (Wong 2013). Na základě všech těchto metod se většinou vyberou kandidátní geny, které jsou následně testovány metodami genetickými jako real-time PCR či prostřednictvím sekvenování nové generace (Wong 2013b). V dnešní době se vkládají také velké naděje do celoxomového sekvenování, které by mohlo značně usnadnit diagnostiku mitochondriálních onemocnění (Wortmann et al. 2015). Tento přístup s sebou však přináší značné etické problémy.

### **1.6.1 Měření spotřeby kyslíku**

Finálním akceptorem elektronů během mitochondriální syntézy ATP prostřednictvím systému OXPHOS je molekulární kyslík. Měření jeho spotřeby mitochondriemi in vitro je principem respirometrie, jedné z metod hojně využívaných v diagnostice mitochondriálních onemocnění.

#### **1.6.1.1 Historie respirometrie**

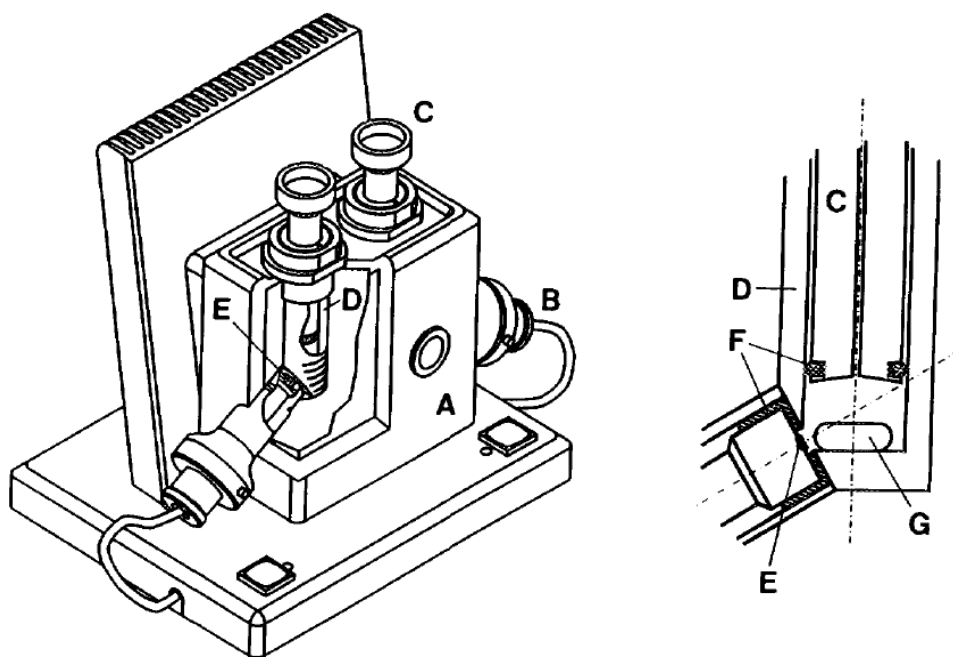
Prvním, kdo sestrojil přístroj, který umožňoval měření spotřeby kyslíku, a to na tkáňových řezech, byl na počátku 20. století Otto Warburg. Jeho přístroj měřil tlak plynu v konstatním objemu za konstatní teploty a byl v biochemii mnoho let úspěšně využíván (Oesper 1964). V roce 1955 tento přístroj nahradili Britton Chance a G. R. Williams přístrojem polarografickým, který využíval principu Clarkovy kyslíkové elektrody a umožňoval měřit respiraci izolovaných mitochondrií (Chance & Williams 1955a). V průběhu následujících let pro biochemické analýzy měření spotřeby kyslíku byly vyvinuty různé přístroje (tzv. mikrorespirometry), které využívaly takzvané polarografické kyslíkové sensory (POS z anglického polarographic oxygen sensor) (Lessler 1982). Tyto přístroje však nebyly dokonalé a během měření docházelo ke vzniku různých chyb. Pro větší přesnost měření bylo vyžadováno velké množství tkáně, což značně omezovalo jejich využití pro diagnostické účely. To vedlo E. Gnaigera k tomu, že v roce 1989 vyrobil první prototyp mnohem přesnějšího přístroje, schopného měřit spotřebu kyslíku za konstantní teploty ve dvou komorách, který byl předchůdcem dnešního přístroje Oxygraph. Následně v roce 1992 došlo k první sériové výrobě tohoto přístroje rakouskou firmou Anton Paar pod názvem Cyclobios Oxygraph<sup>2</sup> (Obr. 7). Tento přístroj umožňoval ve dvou těsně uzavřených komorách

---

<sup>2</sup> zdroj: [www.oroboros.at](http://www.oroboros.at)

měřit o poznání přesněji spotřebu kyslíku a tím snížit nároky na množství měřené tkáně, což bylo výhodné pro diagnostické účely (Haller et al. 1994).

I tento přístroj se dočkal značného zdokonalení, a to když byl v roce 2001 vyroben firmou OROBOROS první respirometr s vysokým rozlišením (HRR, z anglického high-resolution respirometry), který se nazývá Oxygraph (schéma přístroje kapitola 3.4.5). Tento přístroj již umožňuje velice přesně měřit respiraci a to v malém množství tkáně (například kosterního svalu), buněk či izolovaných mitochondrií (Gnaiger 2001). Oxygraph dnes dokáže kromě měření spotřeby kyslíku (respirometrie) měřit s využitím fluorescence (fluorometrie) produkci peroxidu vodíku, ATP, mitochondriální membránový potenciál nebo koncentraci  $\text{Ca}^{2+}$ . Dále také měřit mitochondriální membránový potenciál s využitím iontově selektivních elektrod (potenciometrie) či pomocí speciálního NO-senzoru měřit současně kinetiku NO a  $\text{O}_2$ .<sup>3</sup>



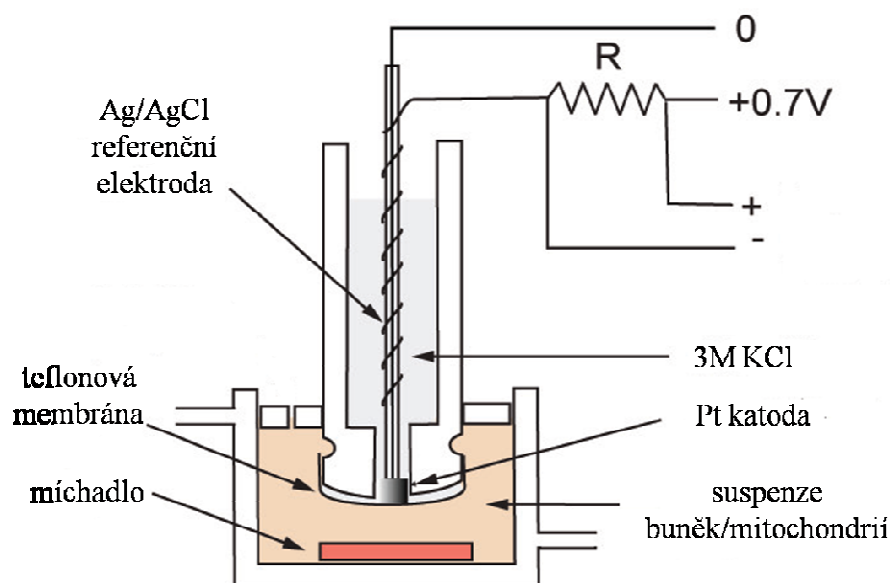
**Obr. 7. Schéma dvoukomorového přístroje Cyclobios Oxygraph.** Na levé straně je schématicky znázorněn celý přístroj, na straně pravé je detailně zobrazena jedna z jeho komor. A – izolovaný měděný blok s integrovaným termostatem Peltierova tepelného čerpadla, B – POS, C – uzávěr s titanovou injekční kanylou, D – skleněná měřící komora, E – POS katoda, F – těsnění z Vitonu, G – sklem potažené magnetické míchadlo (převzato z Haller et al. 1994).

<sup>3</sup> zdroj: [www.orooboros.at](http://www.orooboros.at)

V současné době jsou dokonce k dispozici přístroje<sup>4</sup>, prostřednictvím kterých můžeme měřit mitochondriální respiraci a glykolýzu v živých buňkách. Tyto přístroje se skládají z polovodičových senzorů, které umožňují současně měřit rychlost spotřeby kyslíku (OCR z anglického oxygen consumption rate) a extracelulární rychlost acidifikace (ECAR z anglického extracellular acidification rate). Pro měření jsou potřebná velmi malá množství tkáně, proto tyto přístroje nacházejí stále větší uplatnění v diagnostice mitochondriálních onemocnění (Ferrick et al. 2008).

### 1.6.1.2 Princip fungování přístroje Oxygraph

Přístroj Oxygraph, stejně jako kdysi přístroj Brittona Chance a G. R. Williamse, využívá principu modifikované Clarkovy kyslíkové elektrody. Tato elektroda umožňuje měření kyslíku rozpuštěného v uzavřeném systému. Původní Clarkova kyslíková elektroda se skládala z platinové katody a Ag/AgCl referenční anody obklopené roztokem elektrolytu KCl (Obr.8) (Nicholls & Ferguson 2013).



**Obr. 8. Schéma Clarkovy kyslíkové elektrody.** Kyslík je redukován na  $H_2O$  na Pt katodě zatímco na Ag/AgCl anodě dochází k oxidaci a tím vzniká proud úměrný koncentraci  $O_2$  v roztoku. Vzhledem k tomu, že redukce  $O_2$  na katodě probíhá poměrně pomalu je potřebné měřenou suspenzi neustále míchat, aby nedocházelo k vytváření vrstvy s nižší koncentrací  $O_2$  v blízkosti teflonové membrány (převzato a upraveno podle Nicholls & Ferguson 2013).

<sup>4</sup> XFp, XF<sup>c</sup>24 a XP<sup>c</sup>96 od firmy Seahorse Bioscience



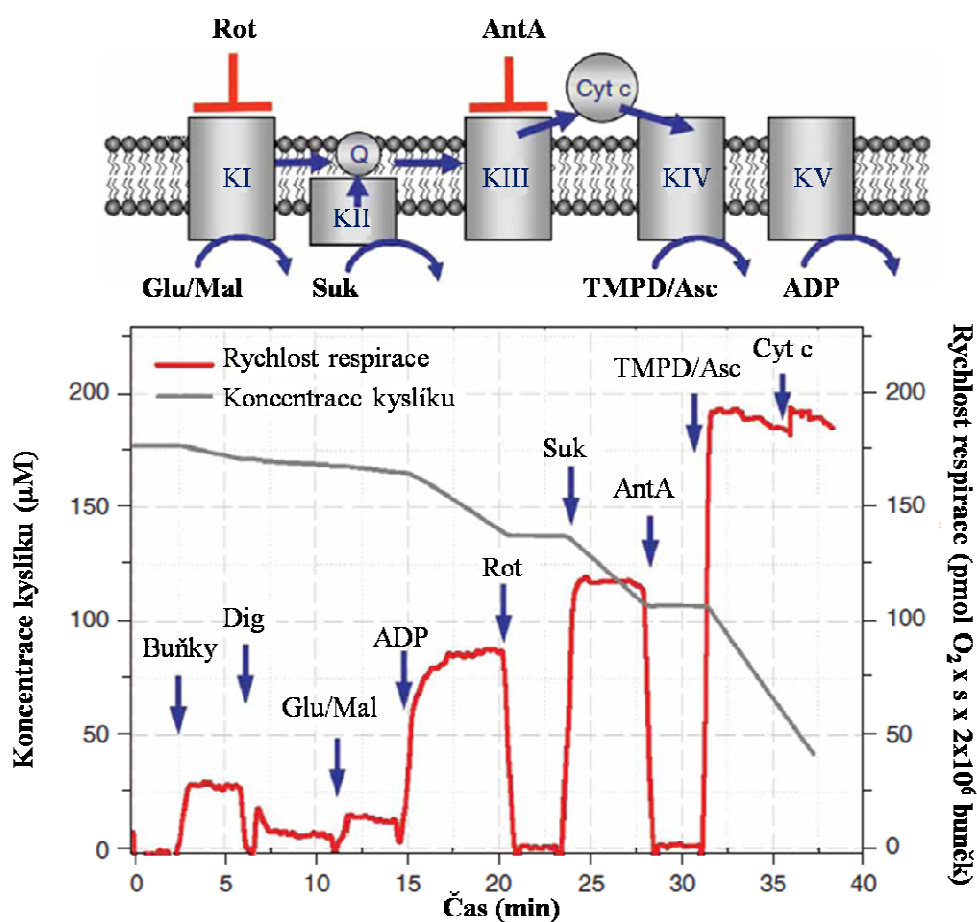
Současná elektroda v přístrojích Oxygraph se nazývá polarografický kyslíkový senzor (POS) a skládá se ze zlaté katody a Ag/AgCl anody obklopené roztokem elektrolytu KCl. Od měřeného vzorku je prostor elektrod oddělen teflonovou membránou, která je dobře propustná pro kyslík. Princip fungování elektrody spočívá v tom, že kyslík rozpuštěný v médiu difunduje skrz teflonovou membránu ke zlaté katodě, kde je redukován na vodu. Zatímco na katodě dochází k redukci O<sub>2</sub>, na anodě je oxidováno Ag, čímž vzniká proud, který je přímo úměrný parciálnímu tlaku kyslíku (pO<sub>2</sub>) v měřeném roztoku. Ten je následně, s využitím znalosti rozpustnosti kyslíku v daném médiu, přepočítán na koncentraci kyslíku (Gnaiger & Forstner 1983).

### 1.6.1.3 Respirometrická měření

Prostřednictvím přístroje Oxygraph je možné měřit respiraci svalových vláken, permeabilizovaných buněk, intaktních buněk nebo izolovaných mitochondrií. Měření spotřeby kyslíku mohou být prováděna na mitochondriích izolovaných z různých tkání. Tento přístup nám umožnil pochopit mnoho důležitých principů fungování OXPHOS a je dodnes v diagnostice mitochondriálních onemocnění hojně využíván. Přináší s sebou však určité nevýhody. Během izolace mitochondrií může dojít k ovlivnění vlastností mitochondrií či k výběru jejich určité subpopulace, což může značně ovlivnit výsledná data. Pro izolaci dostatečného množství mitochondrií je navíc potřebné relativně velké množství tkáně. Nevýhodou tohoto přístupu je také to, že po izolaci mitochondrií dochází k narušení fyziologických interakcí mezi jednotlivými mitochondriemi. Pro zachování fyziologických procesů je proto mnohem výhodnější měřit respiraci intaktních či permeabilizovaných buněk, což můžeme považovat za *in situ* přístup (Kuznetsov et al. 2008). Na rozdíl od měření izolovaných mitochondrií je pro *in situ* měření potřebné mnohem menší množství tkáně a jsou zkoumány všechny populace mitochondrií zároveň, což je vhodnější pro diagnostiku mitochondriálních onemocnění (Saks et al. 1998).

Existuje mnoho různých protokolů měření mitochondriální respirace, které nám umožňují porozumět normálním procesům systému OXPHOS, ale také procesům probíhajících při patologických změnách. Nejčastěji používané jsou takzvané SUIIT (z anglického substrate-uncoupler-inhibitor titration) protokoly, které využívají různých kombinací substrátů, rozpřahovačů a inhibitorů. Pomocí těchto protokolů je možné analyzovat jednotlivé komplexy systému OXPHOS (Pesta & Gnaiger 2012). U měřených buněk či svalových vláken je kvůli zpřístupnění substrátů mitochondriím nejprve vhodné

permeabilizovat jejich plazmatickou membránu. To lze provést pomocí vhodné koncentrace různých chemických látek (filipinu, saponinu či digitoninu), které v této membráně interagují s cholesterolem a vyvolají ztrátu membránové integrity. K permeabilizovaným buňkám lze poté přidávat jednotlivé substráty a inhibitory. Příkladem takového protokolu je přidávání glutamátu, malátu, ADP, rotenonu, sukcinátu, antimycinu A, TMPD, askorbátu a cytochromu *c* (Obr.9). Substráty používané jako zdroje elektronů pro jednotlivé komplexy dýchacího řetězce glutamát/malát (KI), sukcinát (KII), TMPD/askorbát (KIV), ADP (KV) v kombinaci se specifickými inhibitory rotenonem (KI) a antimycinem A (KIII) nám umožňují měřit respiraci jednotlivých komplexů systému OXPHOS. Přídavek cytochromu *c* poté slouží jako test neporušenosti vnější mitochondriální membrány. V případě jejího narušení totiž vnější přidání cytochromu *c* způsobí nárůst respirace (Kuznetsov et al. 2008).



**Obr. 9. Příklad protokolu pro analýzu spotřeby  $O_2$ .** Horní obrázek zobrazuje jednotlivé komplexy (KI – KV) systému OXPHOS s místy působení substrátů a inhibitorů. Spodní schéma znázorňuje respirometrický záznam buněk permeabilizovaných digitoninem v množství  $2 \times 10^6$  buněk/ml. Dig – digitonin, Glu/Mal – glutamát/malát, Rot – rotenon, Suk – sukcinát, AntA – antimycin A, Asc – askorbát, Cyt *c* – cytochrom *c*, Q – koenzym Q (převzato a upraveno podle Kuznetsov et al. 2008).

Důležitými parametry získanými na základě měření mitochondriální respirace jsou stav III, stav IV, index respirační kontroly (RCR z anglického respiratory control ratio), míra rozpřažení (UR z anglického uncouple rate) a poměr ADP/O (Li & Graham 2012). Stav III je definován jako respirace stimulovaná po přidání ADP v přítomnosti substrátu (či kombinace substrátů). Tento stav je následován stavem IV, který nastane po kompletní fosforylaci ADP na ATP (Chance & Williams 1955b). Index respirační kontroly je charakterizován jako stav III/stav IV a je ukazatelem integrity vnitřní mitochondriální membrány. Hodnoty RCR jsou ovlivněny funkčními okolnostmi OXPHOS, proto mohou sloužit jako indikátory poruch systému OXPHOS. Zatímco míra rozpřažení odráží maximální respirační kapacitu mitochondrií, poměr ADP/O vyjadřuje efektivitu fosforylace a může poukazovat na poruchy syntézy ATP či spřažení oxidace a fosforylace (Li & Graham 2012).

## 2 Cíle diplomové práce

Cílem diplomové práce bylo optimalizovat metodu vysoce citlivé polarografie pro diagnostické účely mitochondriálních funkcí v kultivovaných lidských kožních fibroblastech a následně pomocí této metody diagnostikovat poruchy systému OXPHOS.

### Díličmi cíly bylo:

- 1) Optimalizovat metodu vysoce citlivé polarografie na souboru linií získaných od věkově odlišných kontrol a vytvořit kontrolní hodnoty měřených parametrů pro analýzu pacientů s mitochondriálními defekty
- 2) Pomocí vysoce citlivé polarografie analyzovat soubor linií fibroblastů od pacientů s:
  - geneticky definovanými mitochondriálními defekty
  - podezřením na primární mitochondriální vadu se snahou identifikovat poruchu na úrovni konkrétního komplexu OXPHOS
  - nemitochondriálními onemocněními, kde se předpokládá sekundární mitochondriální dysfunkce
- 3) Charakterizovat testované linie fibroblastů s primárními a sekundárními defekty na ultrastrukturální úrovni
- 4) Testovat vliv různých podmínek kultivace fibroblastů na funkci OXPHOS

## 3 Materiál a metody

### 3.1 Materiál

Všechna měření byla prováděna na liniích kultivovaných lidských kožních fibroblastů od několika různých skupin pacientů nebo od kontrol, které byly získány po informovaném souhlasu.

#### 3.1.1 Kontrolní linie

Kontrolní soubor tvořilo 6 linií lidských kožních fibroblastů dětí (K1-K3) a dospělých (K4-K6) (Tab 3.).

**Tab 3. : Seznam kontrolních linií lidských kožních fibroblastů**

<b>Kontrola</b>	<b>Věk v době odběru fibroblastů</b>
<b>K1</b>	kojenec (do 1 roku)
<b>K2</b>	novorozenec
<b>K3</b>	kojenec (do 1 roku)
<b>K4</b>	dospělý
<b>K5</b>	27 let
<b>K6</b>	27 let

#### 3.1.2 Pacienti s primárními mitochondriálními poruchami

Testovanou skupinu tvořili pacienti, u kterých byl prokázán primární defekt OXPHOS ve svalové tkáni (P1-P7) a pacienti s klinickým podezřením na primární mitochondriální onemocnění (P8-P10) (Tab 4.).

**Tab 4. : Přehled linií od pacientů s prokázaným primárním mitochondriálním onemocněním ve svalové tkáni (P1-P7) a od pacientů s klinickým podezřením na primární mitochondriální onemocnění (P8-P10)**

Pacient	Věk v době odběru fibroblastů	Diagnóza	Klinické projevy	Biochemické nálezy ve svalu
<b>P1</b>	1 rok	mutace ve <i>SCO2</i> genu (c.[418G>A];[418G>A])	PMR, ME, mikrocefalie, porucha sluchu, LS	snížená aktivita i množství KIV, sekundárně snížená aktivita KI
<b>P2</b>	1 rok +	mutace v <i>SURF1</i> genu (c.[845_846delCT];[845_846delCT])	PMR, hypertrichóza, LA, LS	snížené množství a aktivita KIV pod 30%, snížený poměr KIV/CS
<b>P3</b>	17 let +	mutace v <i>SURF1</i> genu (c.[574C>T]/[845_846delCT])	LS, HCMP	snížená aktivita KIV pod 30%
<b>P4</b>	2 roky +	mutace v <i>SURF1</i> genu (c.[668C>T];[668C>T])	ME, LA, hypetrichóza, PMR, hypotonie	snížená aktivita KIV pod 15%, snížené množství KIV
<b>P5</b>	1 rok	mutace v <i>SURF1</i> genu (c.[312_321del10insAT];[845_846delCT])	LS, PMR, LA, ptóza	snížené aktivity KI a KIV (15%), proteinový obsah dýchacího řetězce, i poměry KIV/CS; histochemie: výrazné difúzní oslabení aktivity KIV; polarografie: snížená respirace po přidání ADP, pyruvátu a askorbátu+TMPD a výrazná aktivace po přidání FCCP

pokračování Tab 4.

Pacient	Věk v době odběru fibroblastů	Diagnóza	Klinické projevy	Biochemické nálezy ve svalu
<b>P6</b>	6 měsíců	mutace v <i>ND1</i> genu (m.[3697G>A])	LS, PMR, hypotonie, LA, epilepsie, porucha sluchu, heteroplasmie > 96%	ve svalu bez patologického nálezu (i polarografie), heteroplasmie > 93%
<b>P7</b>	2 roky	mutace v <i>ND5</i> genu (m.[13042G>A])	PMR, hypotonie, strabismus, ptóza, atrofie optiku, LA	snížené množství/aktivita KI pod 30% a KI + KIII pod 50%, slabší obsah podjednotek KI, histochemie: subsarkolemální akumulace reakčního produktu SDH (10%), COX negativní vlákna (5%), heteroplasmie > 90%
<b>P8</b>	1 rok +	podezření pro generalizovanou izolovanou/kombinovanou poruchu komplexu IV, geneticky zatím nedefinováno	leukodystrofie, šedý zákal, hypotonie, epilepsie, HCMP	snížené množství KIV
<b>P9</b>	1 rok	defekt konkrétního enzymu OXPHOS zatím nebyl upřesněn	epilepsie, kvadruspasticita	snížené množství a aktivita KIV (pod 20%) a KI+KIII, snížené množství KIV
<b>P10</b>	1 rok +	podezření pro kombinovaný defekt OXPHOS, geneticky zatím nedefinován	PMR, ptóza, hypotonie	snížená aktivita KI, KIII, KI-KIII a KIV i poměry COX/CS; hlavní změnou je výpadek histochemické aktivity KIV v asi 70% svalových vláken; ELMI: zmnóžení a zvětšení mitochondrií; polarografie: minimální respiraci po všech substrátech a bezaktivace po FCCP

*PMR*-psychomotorická retardace, *ME*-mitochondriální encefalopatie, *LS*-Leighův syndrom, *LA*-laktátová acidóza, *HCMP*-hypertrofická kardiomyopatie, *KI-IV*-komplexy dýchacího řetězce, *COX*-cytochrom c oxidáza, *CS*-citrátsyntáza, *ELMI*-elektronová mikroskopie

+ pacient zemřel

### 3.1.3 Pacienti se sekundárními mitochondriálními poruchami

Tuto skupinu tvořili pacienti s Huntingtonovou chorobou (HD) ve věku od 31 do 74 let (P11-P18) (Tab 5.) a pacienti s metabolickými poruchami ve věku 10-34 let (P19-P24) (Tab 6.).

**Tab 5. : Soubor pacientů s Huntingtonovou chorobou (P11 – P18)**

Pacient	Věk v době odběru fibroblastů	Onemocnění	Počet CAG repetic	Věk nástupu nemoci	Klinický obraz
<b>P11</b>	31 let	Huntingtonova choroba	23/44	27 let	lehká apatie a subdeprese, velmi mírná chorea
<b>P12</b>	33 let	Huntingtonova choroba	20/53	27 let	trupová choreodystonie, chorea HKK a DKK
<b>P13</b>	40 let	Huntingtonova choroba	19/48	35 let	generalizovaná chorea, iritabilita, apatie
<b>P14</b>	42 let	Huntingtonova choroba	24/42	28 let	generalizované choreatické dyskineze, dysfagie
<b>P15</b>	74 let	Huntingtonova choroba	17/40	70 let	generalizovaná chorea, apraxie chůze, dysartrie
<b>P16</b>	39 let	Huntingtonova choroba	<36/>36	neznámý	neznámý
<b>P17</b>	49 let	Huntingtonova choroba	<36/>36	neznámý	neznámý
<b>P18</b>	62 let +	Huntingtonova choroba	29/44	50 let	terminální stadium

+ pacient zemřel

**Tab 6. : Soubor pacientů s poruchou metabolismu sirných aminokyselin (P19-P24)**

Pacient	Věk v době odběru fibroblastů	Onemocnění	Defekt
<b>P19</b>	10 let	homocysteinurie	mutace v genu <i>MTHFR</i>
<b>P20</b>	11 let	homocysteinurie	mutace v genu <i>MTHFR</i>
<b>P21</b>	13 let	cystationurie	mutace v genu <i>CTH</i>
<b>P22</b>	34 let	cystationurie	mutace v genu <i>CTH</i>
<b>P23</b>	26 let	homocysteinurie	mutace v genu <i>CBS</i>
<b>P24</b>	25 let	homocysteinurie	mutace v genu <i>CBS</i>



### 3.2 Použité chemikálie

ADP	Sigma (USA)
Antimycin A	Sigma (USA)
Askorbát sodný	Sigma (USA)
Azid sodný	Penta (ČR)
BSA	Sigma (USA)
Cytochrom <i>c</i>	Sigma (USA)
Deoxycholát sodný	Sigma (USA)
Digitonin	Sigma (USA)
DMSO	Sigma (USA)
Dodecylsulfát sodný	Sigma (USA)
Durcupanová pryskyřice	Electron Microscopy Sciences (UK)
EDTA	Sigma (USA)
Ethanol (96%)	Penta (ČR)
FCCP	Sigma – Aldrich
Fenylmethylsulfonyl fluorid	Sigma (USA)
Fosforečnan draselný	Fluka (Švýcarsko)
Galaktóza	Sigma – Aldrich (USA)
Glukóza	Sigma (USA)
Gutamát sodný	Sigma (USA)
Hydroxid draselný	Penta (ČR)
Hydroxid sodný	Penta (ČR)
Chlorid draselný	Penta (ČR)
Chlorid hořečnatý	Sigma (ČR)
Chlorid sodný	Penta (ČR)
Kyselina ethylendiamintetraoctová	Sigma (USA)
Malát	Sigma (USA)
Manganistan draselný	Penta (ČR)
MitoTrackerRed	Molecular Probes (USA)
Rotenon	Sigma (USA)
Sukcinát sodný	Sigma – Aldrich (USA)
Síran měďnatý	Penta (ČR)
TMPD	Sigma (USA))

Tris	Sigma (USA)
Tris-HCl	Sigma – Aldrich (USA)
Triton X-100	Sigma (USA)
Uhličitan sodný	Penta (ČR)
Vinan sodno-draselný	Sigma – Aldrich (USA)

**Komerčně dodávané roztoky:**

<b>Antibiotický a antimykotický roztok</b> (100x konc.)	Biosera (Francie)
<b>DMEM</b> bez D-glukózy a L-glutaminu	Biochrom (Německo)
<b>DMEM</b> se stabilním L-glutaminem	Biochrom (Německo)
<b>Ethanolum benzino denaturatum</b> [roztok 96% ethanolu a 1% lékařského benzínu]	Penta (ČR)
<b>FBS</b>	Sigma (USA)
<b>FBS - dialyzované</b>	PAA (Rakousko)
<b>Folinovo reagens</b>	Penta (ČR)
<b>PBS</b> [10x koncentrovaný: 56 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,54 M NaCl, 10 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,4]	Lonza (Švýcarsko)
<b>PIC</b>	Sigma – Aldrich (USA)
<b>T + E</b> (Trypsin + EDTA roztok) [10x koncentrovaný; 0,5% (w/v) trypsinu, 0,2% (w/v) EDTA v roztoku PBS]	Biosera (Francie)

**V laboratoři připravená média a roztoky:**

<b>KCl médium</b> [80mM KCl, 10mM Tris, 3mM MgCl <sub>2</sub> , 1mM EDTA, 5mM K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O, pH 7,4]
<b>RIPA pufr</b> [50 mM Tris-HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 1 mM PMSF; 1 mM EDTA; 1% (v/v) Triton X-100; 1% (w/v) deoxycholát sodný; 0,1% (w/v) SDS; 1% (v/v) PIC]
<b>Roztok Lowry A</b> [0,4% (w/v) NaOH, 2% (w/v) Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ]
<b>Roztok Lowry B</b> [0,5% (w/v) CuSO <sub>4</sub> ]
<b>Roztok Lowry C</b> [1% (w/v) vinan sodnodraselný]

### 3.3 Použité přístroje

Analytické váhy ABT 220-50M	Kern (Německo)
Analytické váhy HA – 120M	Helago (Japonsko)
Autokláv MAC - 235EX	Sanyo (Japonsko)
Autokláv MLS – 3020U	Sanyo (Japonsko)
CCD kamera DP50	Olympus (Japonsko)
Centrifuga Mikro 200	Hettich Zentrifugen (Německo)
Centrifuga Rotanta 460R	Hettich Zentrifugen (Německo)
Centrifuga Universal 32R	Hettich Zentrifugen (Německo)
Centrifuga Universal 320R	Hettich Zentrifugen (Německo)
Laminární box Air Clean	AirClean Systems (USA)
Mikropipety (automatické pipety)	Eppendorf (Německo), Gilson (USA), Thermo Scientific (USA) Nichiryo (USA)
Mikroskop Nikon Diaphot 200	Nikon (Japonsko)
Oxygraph-2k	Oroboros (Rakousko)
pH metr 774	Metrohm (Švýcarsko)
Spektrofotometr UV-2401PC	Shimadzu (Japonsko)
Termostat TCH100	Laboratorní přístroje Praha (ČR)
Termostat Sanyo CO <sub>2</sub> incubator	Sanyo (Japonsko)
Termostat Heratherm IMC 18	Thermo Scientific (USA)
Transmisní elektronový mikroskop JEM-1200 EX	JEOL (USA)
Ultracut III	Reichert (USA)
Vortex-Genie 2	Scientific Industries (USA)
Vortex 2x <sup>3</sup>	Velp Scientifica (Itálie)

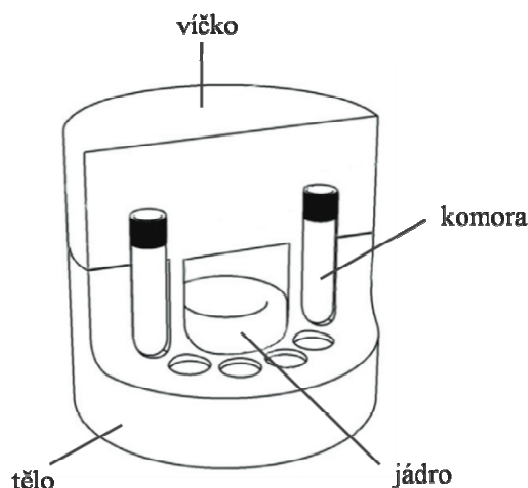
### **3.4 Metody**

#### **3.4.1 Skladování a rozmrazování buněk**

Lidské kožní fibroblasty byly skladovány při teplotě  $-196^{\circ}\text{C}$  v kryozkumavkách obsahujících 1,8ml média DMEM s 1% (w/v) ATB, 10% (w/v) iFBS a 7,5% (w/v) DMSO. Pro účely kultivace byl obsah kryozkumavky nejprve rozmražen ve  $37^{\circ}\text{C}$  (termostat Heratherm IMC 18, Thermo Scientific) a poté přenesen do kultivační lahve o ploše  $75\text{ cm}^2$ . K buňkám bylo přidáno 10ml média DMEM s 1% (w/v) ATB a 10% (w/v) iFBS. Poté byly buňky přendány do termostatu ( $37^{\circ}\text{C}$ , 5% koncentrace  $\text{CO}_2$ , termostat Sanyo $\text{CO}_2$  incubator, Sanyo). Po několika hodinách bylo toto médium (obsahující DMSO) vyměněno za 12ml média DMEM s 1% (w/v) ATB, 10% (w/v) iFBS a buňky byly dále kultivovány ( $37^{\circ}\text{C}$ , 5% koncentrace  $\text{CO}_2$ , termostat Sanyo  $\text{CO}_2$  incubator, Sanyo).

#### **3.4.2 Sklizení a zamrazování fibroblastů**

Od fibroblastů, jejichž konfluence dosahovala 70% - 80% bylo odebráno médium, kultivační plocha  $75\text{cm}^2$  byla opláchnuta 3-5ml PBS a bylo přidáno 1,5ml roztoku T+E. Poté byly buňky přendány do termostatu ( $37^{\circ}\text{C}$ , 5% koncentrace  $\text{CO}_2$ , termostat Sanyo  $\text{CO}_2$  incubator, Sanyo). Po několika minutách (maximálně do 10 minut) bylo pod mikroskopem (Nikon Diaphot 200, Nikon) kontrolováno, zda dochází k uvolňování buněk z kultivační plochy vlivem roztoku T+E. Pokud ano, bylo k buňkám přidáno 12ml média DMEM s 1% (w/v) ATB a 10% (w/v) iFBS. Obsah kultivačních lahví byl resuspendován a přendán do sterilní 15ml centrifugační zkumavky. Zároveň byly odebrány buňky na počítání v Bürkerově komůrce. Buňky ve zkumavce byly centrifugovány (300g,  $23^{\circ}\text{C}$ , 5 minut, centrifuga Universal 32R, Hettich). Sediment buněk byl resuspendován v médiu DMEM s 1% (w/v) ATB, 10% (w/v) iFBS, 7,5% (w/v) DMSO a přendán do kryozkumavek. Buňky byly zamrazovány v přibližném počtu  $10^6$  buněk v jedné kryozkumavce o objemu 2ml. Zkumavky byly ponechány 24h ve speciální zamrazovací nádobě (CoolCell®, Obr. 10) v  $-80^{\circ}\text{C}$  a poté přendány do  $-196^{\circ}\text{C}$ .



**Obr. 10.** Schéma speciální zamrazovací nádoby CoolCell® (upraveno podle [www.biocision.com](http://www.biocision.com)), ve které dochází k postupnému snižování teploty o 1°C za 1 minutu.

### 3.4.3 Kultivace fibroblastů

#### 3.4.3.1 Kultivace fibroblastů v médiu DMEM s glukózou

Kožní fibroblasty byly pěstovány v kultivačních lahvích o ploše 75 cm<sup>2</sup> ve 12ml média DMEM s 1% (w/v) ATB, 10% (w/v) iFBS, 25mM glukózou (4,5g/l) a 2mM L-glutaminem (0,580g/l) do konfluency 90% - 100%, poté byly pasážovány. Během pasážování bylo od buněk odebráno médium, kultivační plocha byla opláchnuta 3-5 ml PBS a k buňkám bylo přidáno 1,5ml roztoku T+E. Poté byly buňky přendány do termostatu (37°C, 5% koncentrace CO<sub>2</sub>, termostat SanyoCO<sub>2</sub> incubator, Sanyo). Po několika minutách bylo pod mikroskopem (Nikon Diaphot 200, Nikon) kontrolováno, zda dochází k uvolňování buněk z kultivační plochy vlivem roztoku T+E. Pokud ano, bylo k buňkám přidáno médium DMEM s 1% (w/v) ATB a 10% (w/v) iFBS, obsah kultivační lahve byl rozdělen do 2 lahví (75cm<sup>2</sup>), doplněn médiem DMEM s 1% (w/v) ATB a 10% (w/v) iFBS do celkového objemu 12ml a důkladně resuspendován. Kultivace probíhala po dobu 3-7 dnů v termostatu (37°C, 5% koncentrace CO<sub>2</sub>, termostat SanyoCO<sub>2</sub> incubator, Sanyo).

#### 3.4.3.2 Kultivace fibroblastů v médiu DMEM s galaktózou

Kožní fibroblasty byly pěstovány v kultivačních lahvích o kultivační ploše 75cm<sup>2</sup> ve 12ml média DMEM s 1% (w/v) ATB, 10% (w/v) iFBS, 25mM glukózou (4,5g/l) a 2mM

L-glutaminem (0,580g/l) do konfluency 60% - 70%. Poté bylo buňkám médium odebráno, kultivační plocha byla 3x opláchnuta 3-5ml PBS a následně bylo přidáno 12ml média DMEM s 1% (w/v) ATB bez séra, glukózy a L-glutaminu. V tomto médiu byly buňky kultivovány 6 hodin v termostatu (37°C, 5% koncentrace CO<sub>2</sub>, termostat SanyoCO<sub>2</sub> incubator, Sanyo). Následně bylo buňkám toto médium odebráno, kultivační plocha byla opláchnuta 1 x 3-5ml PBS a bylo přidáno médium DMEM s 1% (w/v) ATB, 10% (w/v) dialyzovaného FBS, 25mM (4,5g/l) galaktózou a 2mM L-glutaminem (0,580g/l). V tomto médiu byly buňky kultivovány 5 dní (37°C, 5% koncentrace CO<sub>2</sub>, termostat SanyoCO<sub>2</sub> incubator, Sanyo).

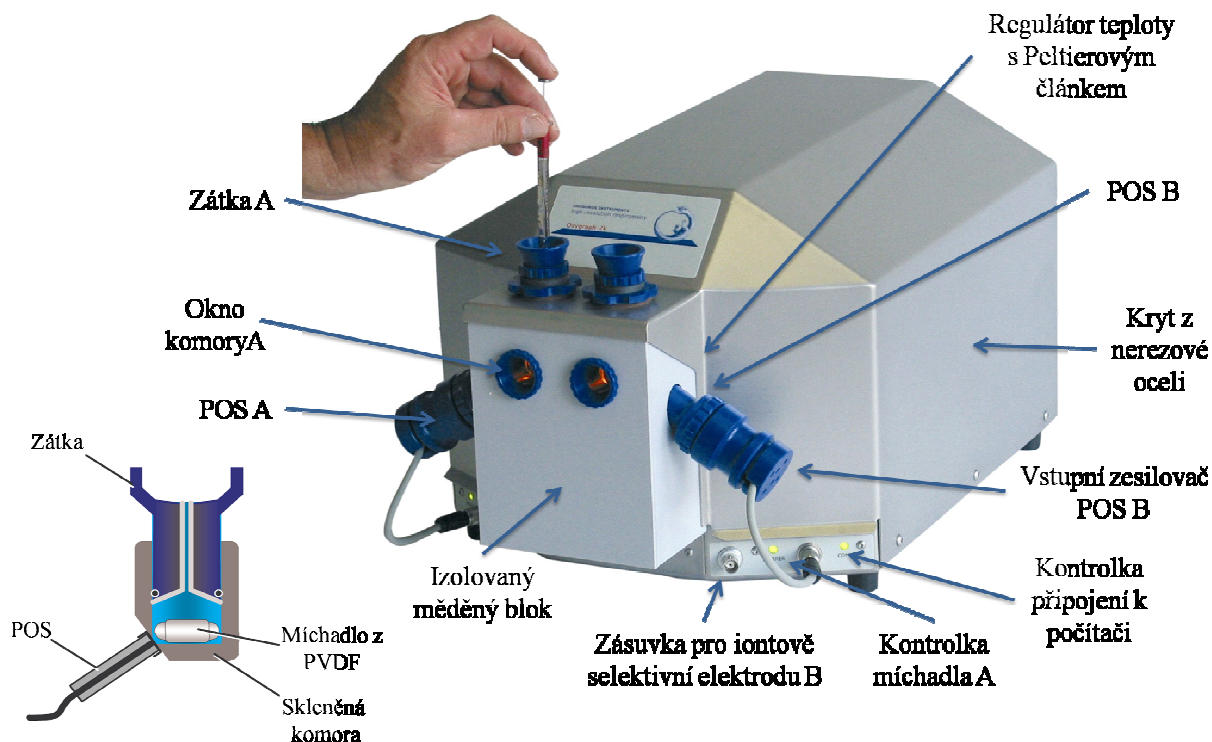
#### **3.4.4 Sklizení fibroblastů pro účely respirometrie**

Kožní fibroblasty byly napěstovány do konfluency 70% - 80% (6-8 lahví o ploše 75cm<sup>2</sup>), poté byly zkontrolovány pod mikroskopem (Nikon Diaphot 200, Nikon) a fotograficky zdokumentovány (CCD kamera DP50, Olympus). Následně bylo od buněk odebráno médium, kultivační plocha byla opláchnuta 3-5 ml PBS a bylo přidáno 1,5 ml 1% (w/v) roztoku T+E do každé lahve. Po uvolnění buněk z kultivační plochy (do 10 minut) bylo k buňkám zpět přidáno médium, ve kterém byly kultivovány. Obsah kultivačních lahví byl přenesen do 50ml centrifugační zkumavky a centrifugován (5 minut, 300g, 23°C, centrifuga Rotanta 460R, Hettich Zentrifugen). Peleta buněk byla resuspendována v 1ml ledově vychlazeného PBS, přenesena do 15ml centrifugační zkumavky, doplněna 9ml ledového PBS a centrifugována (5 minut, 300g, 4°C, Centrifuga Universal 320R, Hettich Zentrifugen). Tento proces byl ještě jednou opakován a tím rozdíl, že k peletě buněk během druhého promývání bylo přidáno 11ml ledového PBS. Z tohoto objemu byl odebrán 1ml a zjištěn počet buněk pomocí Bürkerovy komůrky. Posléze byla peleta buněk resuspendována v 50μl ledového PBS. Z tohoto objemu bylo odebráno 20μl, ve kterých byla stanovena koncentrace proteinu (podle Lowryho, 3.4.7) a zbylý objem byl použit pro měření na přístroji Oxygraph-2k (OROBOROS).

#### **3.4.5 Respirometrie**

Do obou komor přístroje Oxygraph-2k (OROBOROS) (Obr. 11) byly po důkladném promytí (96% ethanolem a destilovanou H<sub>2</sub>O) napipetovány 2ml respiračního média KCl. Pro dostatečnou saturaci O<sub>2</sub> bylo médium ponecháno v otevřených komorách po dobu 30minut (při 37°C a za stálého míchání). Následně byl z každé z komor odebrán stejný objem média,

který byl poté přidán ze suspenze sklizených fibroblastů, běžně 30 - 40 $\mu$ l o koncentraci proteinu 0,5-1,5 mg a přibližném počtu  $2 \times 10^6$  buněk na komoru.



**Obr. 11. Schéma přístroje Oxygraph-2k** od firmy OROBOROS pro měření respirace s vysokým rozlišením. Přístroj se skládá ze dvou 2ml komor (A a B), které jsou umístěny v izolovaném měděném bloku jehož stabilní teplota je regulována prostřednictvím Peltierova článku. Pomocí POS je snímána koncentrace kyslíku v každé za dvou těsně uzavřených komor. Zátka, která uzavírá komory má v sobě tenkou kapiláru jež slouží k titrování přidávaných roztoků. Obsah komor je po celou dobu měření míchán míchadly z PVDF, která jsou poháněna pulzními magnety vloženými v měděném bloku (převzato a upraveno z [www.orooboros.at](http://www.orooboros.at))

Poté byly komory uzavřeny, po stabilizaci signálu byly buňky permeabilizovány 1-3 $\mu$ l 8mM digitoninu (v závislosti na množství buněk) a byla měřena spotřeba kyslíku při 37°C. V intervalu 3-5 minut byly přidávány substráty, inhibitory a rozpřahovač v pořadí (Tab 7.). Nejprve byly přidávány glutamát a malát, které jsou substráty I. komplexu OXPHOS, poté ADP - substrát V. komplexu OXPHOS. Následně byl pomocí rotenonu inhibován I. komplex OXPHOS a byl přidán substrát II. komplexu OXPHOS, tedy sukcinát. Prostřednictvím přídavku cytochromu *c* bylo testováno, zda nedošlo k porušení vnější mitochondriální membrány. Poté byl pomocí antimycinu A inhibován III. komplex OXPHOS a byly přidány substráty IV. komplexu OXPHOS. Následně byl přidán rozpřahovač FCCP a poté byl prostřednictvím azidu sodného zainhibován IV. komplex OXPHOS.

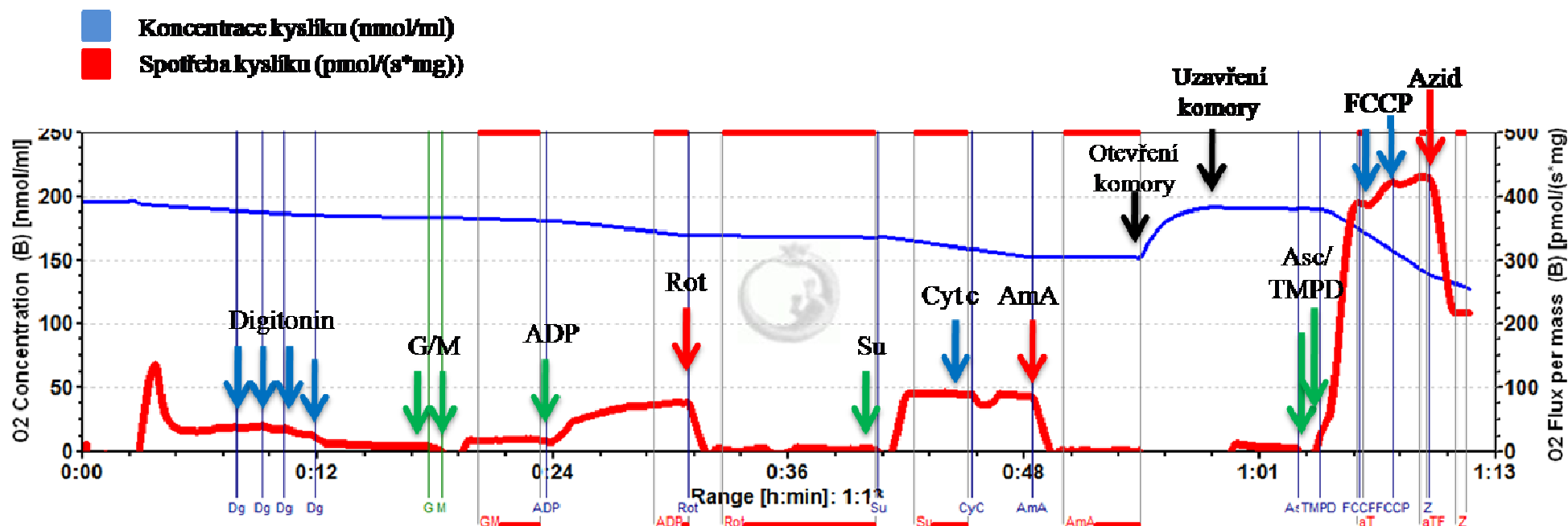
**Tab 7. : Pořadí přidávaných substrátů, inhibitorů a rozpřahovače v průběhu měření respirace lidských kožních fibroblastů na přístroji Oxygraph-2k (Oroboros)**

Pořadí	Substrát/inhibitor/ rozpřahovač	Koncentrace zásobního roztoku (rozpuštědlo)	Přidávané množství	Teplota skladování zásobních roztoků
1.	Glutamát	1M (H <sub>2</sub> O)	20μl	-20°C
2.	Malát	1M (H <sub>2</sub> O)	6μl	-20°C
3.	ADP + Mg <sup>2+</sup>	0,5M (H <sub>2</sub> O)	4μl	-80°C
4.	Rotenon	0,5mM (EtOH)	1μl	-20°C
5.	Sukcinát	1M (H <sub>2</sub> O)	20μl	-20°C
6.	Cytochrom c	2mM (H <sub>2</sub> O)	5μl	-20°C
7.	Antimycin A	1mM (EtOH)	1μl	-20°C
8.	Askorbát	0,2M (H <sub>2</sub> O)	25μl	-20°C
9.	TMPD	40mM (H <sub>2</sub> O)	45μl	-20°C
10.	FCCP	1mM (EtOH)	0,2-0,4μl	-20°C
11.	Azid sodný	4M (H <sub>2</sub> O)	5μl	-20°C

### 3.4.6 Analýzy výsledné křivky spotřeby kyslíku

Naměřená respirace byla vztažena na množství proteinu v komoře stanoveného podle Lowryho (kapitola 3.4.7.), vyhodnocena v programu DatLab5 (OROBOROS), (Obr. 12) a následně statisticky zpracována v programu Excel (Microsoft Office).





**Obr. 12. Výsledný záznam z měření spotřeby O<sub>2</sub> kultivovaných lidských kožních fibroblastů na přístroji Oxygraph-2k získaný prostřednictvím programu DatLab5 (OROBOROS). Modrá křivka zobrazuje aktuální koncentraci kyslíku v komoře, červená křivka zobrazuje spotřebu kyslíku vztahovanou na množství proteinu. Po narušení integrity vnější mitochondriální membrány přidávkem digitoninu byly v průběhu měření přidávány jednotlivé substráty, inhibitory a rozpřahovač v následujícím pořadí: glutamát (G), malát (M), ADP, rotenon (Rot), sukcinát (Su), cytochrom c (Cyt c), antimycin A (AmA), askorbát (Asc), TMPD, FCCP a azid (Z). Výsledná respirace byla vztahována na množství proteinu (v tomto případě 0,388 mg/ml). Zelené šipky znázorňují přidávané substráty (glutamát, malát, ADP, sukcinát, askorbát a TMPD), červené šipky inhibitory (rotenon, antimycin A, azid) a modré šipky další přidávané látky (digitonin, cytochrom c a FCCP). Červené úseky vymezují oblasti, ve kterých byla odečtena spotřeba O<sub>2</sub>.**

### 3.4.7 Stanovení koncentrace proteinu podle Lowryho

K 20 $\mu$ l buněčné suspenze odebrané ze sklizených fibroblastů (kapitola 3.4.4) bylo přidáno 180 $\mu$ l roztoku RIPA a byly ponechány 20 minut na ledu za občasného míchání (Vortex-Genie 2, Scientific Industries). Poté bylo ze vzorku odebráno 2 x 5 $\mu$ l a 1 x 7  $\mu$ l pro stanovení proteinu. Koncentrace proteinu ve vzorku byla odečtena ze standardní kalibrační křivky, která byla vytvořena roztokem BSA a destilovanou H<sub>2</sub>O (Tab 8.).

**Tab 8. : Objem BSA a H<sub>2</sub>O pro vytvoření standardní kalibrační křivky pro měření koncentrace proteinu podle Lowryho**

Koncentrace ( $\mu$ g)	Množství BSA ( $\mu$ l)	Množství destilované H <sub>2</sub> O ( $\mu$ l)
0	0	200
5	25	175
10	50	150
15	75	125
20	100	100
25	125	75

Ke vzorkům připraveným pro stanovení o objemu 200 $\mu$ l byl přidán 1ml roztoku vzniklého smícháním zásobních roztoků A+B+C (3.2) v poměru 48:1:1, vzorky byly zamíchány (Vortex 2x<sup>3</sup>, Velp Scientifica) a inkubovány při pokojové teplotě 15 minut. Následně bylo přidáno 100 $\mu$ l roztoku Folinova reagens, který byl čerstvě naředěn destilovanou H<sub>2</sub>O v poměru 1:1, okamžitě byly promíchány (Vortex 2x<sup>3</sup>, Velp Scientifica) a ponechány v pokojové teplotě po dobu 30 minut. Poté byla změřena absorbance při 700nm na spektrofotometru (UV-2401PC, Shimadzu).

### 3.4.8 Barvení mitochondriální sítě

Nejprve bylo na podložní sklíčka ve vícejamkových destičkách přendáno 40-50 $\mu$ l suspenze buněk v médiu DMEM s 1% (w/v) ATB a 10% (w/v) iFBS. Poté byl objem média doplněn tak, aby jeho hladina dosahovala do přibližné výšky 0,5 cm. Takto připravené buňky byly pěstovány po dobu 2-3 dnů (37°C, 5% koncentrace CO<sub>2</sub>, termostat SanyoCO<sub>2</sub> incubator, Sanyo). Následně bylo od buněk odebráno médium, kultivační plocha byla opláchnuta PBS a k buňkám bylo přidáno 500 $\mu$ l 10nM fluorescenční sondy MitoTracker Red předem naředěné

v médiu DMEM. Takto byly buňky inkubovány ve tmě 10 min (při 37°C a 5% CO<sub>2</sub>, termostat Heratherm IMC18, Thermo Scientific). Poté byl odebrán roztok, kultivační plocha byla 2x opláchnuta PBS a k buňkám bylo přidáno médium DMEM s 1% (w/v) ATB a 10% (w/v) iFBS. Sklíčko porostlé buňkami bylo pozorováno pod fluorescenčním mikroskopem (Nikon Diaphot 200, Nikon) a výsledný obraz byl snímán (CCD kamera DP50, Olympus) po excitaci 579nm.

### **3.4.9 Transmisní elektronová mikroskopie**

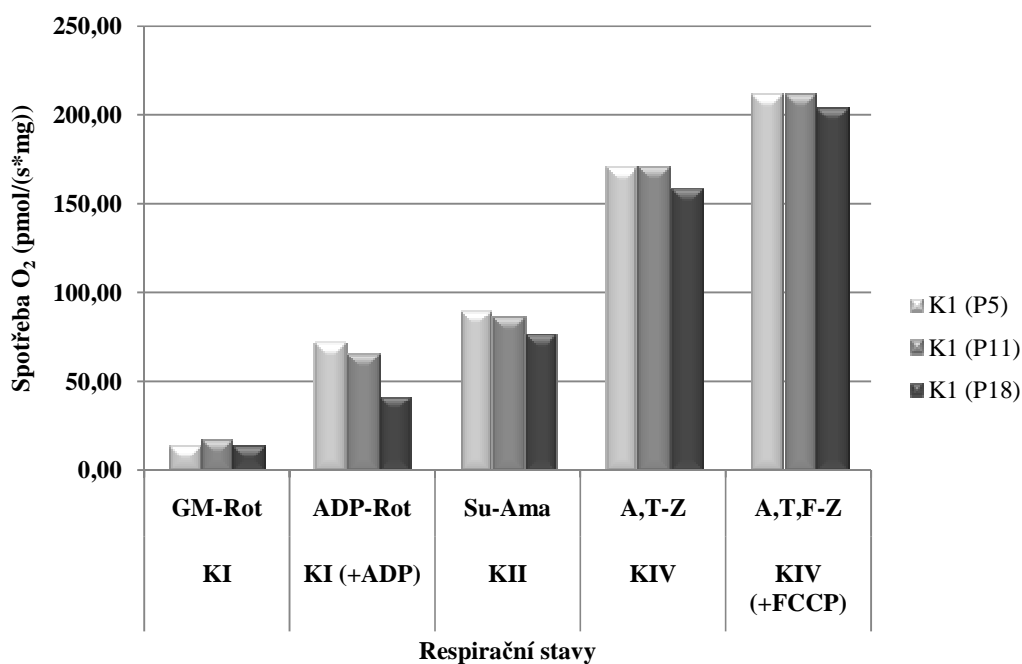
Fibroblasty v malé kultivační lahvičce (25cm<sup>2</sup>) narostlé do 70% konfluence byly fixovány čerstvě připraveným roztokem 2% (w/v) KMnO<sub>4</sub> v PBS při pokojové teplotě po dobu 15 minut. Po odstranění fixačního roztoku byly buňky 2x opláchnuty PBS. Poté byly buňky 15 minut inkubovány v 50% (w/v) a následně 70% (w/v) etanolu. Pomocí škrabky byly buňky mechanicky sklizeny, centrifugovány (stále v 70% (w/v) etanolu) a dále odvodňovány v etanolové řadě: 10 minut v 50% EtOH, 10 minut v 75% EtOH, 10 minut v 90% EtOH a následně ponechány 30 minut ve 100% EtOH. Poté byly buňky 2x inkubovány 15 minut v propylenoxidu, zality do durcupanové pryskyřice, nařezány na ultratenké řezy o tloušťce 600 - 900 Å pomocí ultramicrotomu (Ultracut III, Reichert) a dále kontrastovány pomocí 2% (w/v) citrátu olova a 3% (w/v) uranyl acetátu. Řezy byly snímány pomocí transmisního elektronového mikroskopu (JEM-1200 EX, JEOL) při zvětšení 5 000 – 40 000x. Tato metoda byla provedena ve spolupráci s Ústavem patologie 1.LF UK.

## 4 Výsledky

### 4.1 Optimalizace metody vysoce citlivé polarografie pro účely diagnostiky mitochondriálních funkcí ve fibroblastech

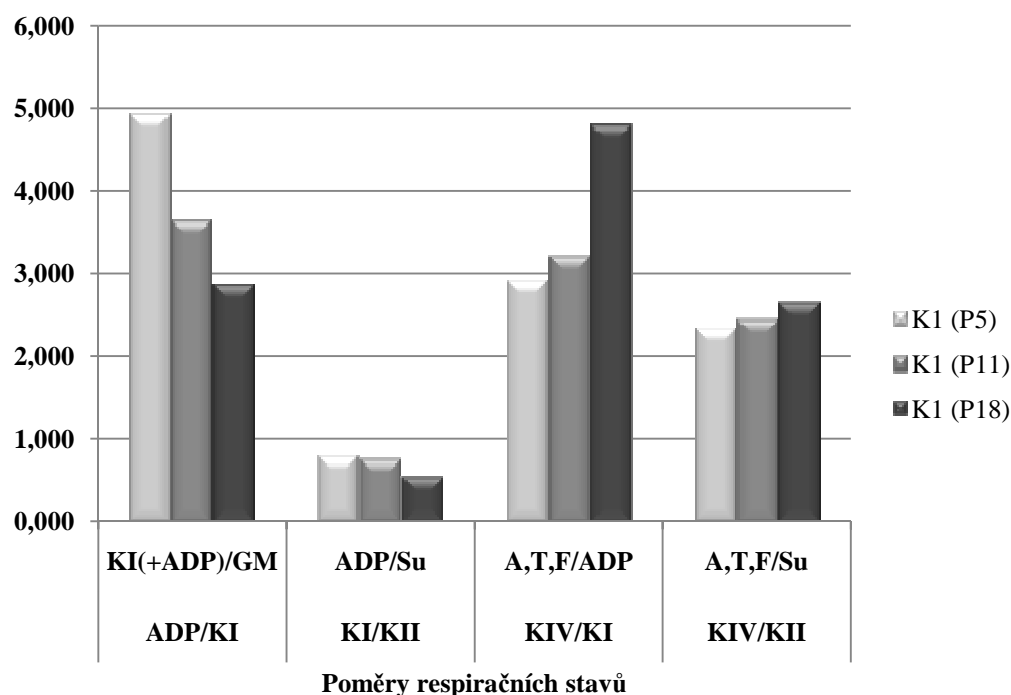
#### 4.1.1 Vliv délky kultivace na respiraci

V průběhu optimalizace metody vysoce citlivé polarografie jsme se nejprve zaměřili na to, zda délka kultivace lidských kožních fibroblastů ovlivňuje respiraci. Proto byly fibroblasty kontrolní linie dětského věku K1 kultivovány různě dlouhou dobu v médiu DMEM s glukózou a poté byla měřena jejich respirace na přístroji Oxygraph-2k po přidávání substrátů a inhibitorů jednotlivých komplexů systému OXPHOS. Měření spotřeby O<sub>2</sub> u kontrolní linie K1 probíhalo při pasážích 5 (P5), 11 (P11) a 18 (P18). Výsledné naměřené hodnoty byly normalizovány na množství proteinu (přílohy 8.1) a zaznamenány do grafu (Obr. 13).



**Obr. 13. Spotřeba O<sub>2</sub> v kultivovaných kožních fibroblastech u kontrolní linie K1 v závislosti na délce kultivace.** Výsledná respirace byla vztažena na množství proteinu (0,388–0,619 mg/ml). V průběhu měření byl postupně přidáván detergent, substráty, inhibitory a rozpřahovač pro OXPHOS v následujícím pořadí: Dg, G, M, ADP, Rot, Su, CyC, AmA, A, T, F, Z. P5–pasáž 5, P11–pasáž 11, P18–pasáž 18, KI–komplex I, KII–komplex II, KIV–komplex IV, Dg–digitonin, G–glutamát, M–malát, Rot–rotenon, Su–sukcinát, CyC–cytochrom c, Ama–antimycin A, A–askorbát, T–TMPD, F–FCCP, Z–azid. Výsledné hodnoty jsou získané z 1 měření.

Pro komplexnější pohled na respiraci byly vytvořeny poměry spotřeby O<sub>2</sub> (přílohy 8.1) jednotlivých komplexů systému OXPHOS a vyneseny do grafu (Obr. 14).



**Obr. 14. Poměry spotřeby O<sub>2</sub> v kultivovaných kožních fibroblastech kontrolní linie K1 v závislosti na délce kultivace.** Výsledná respirace byla vztažena na množství proteinu (0,388–0,619 mg/ml). V průběhu měření byl postupně přidáván detergent, substráty, inhibitory a rozpřahovač pro OXPHOS v následujícím pořadí: Dg, G, M, ADP, Rot, Su, CyC, AmA, A, T, F, Z. P5–pasáž 5, P11–pasáž 11, P18–pasáž 18, KI–komplex I, KII–komplex II, KIV–komplex IV, Dg–digitonin, G–glutamát, M–malát, Rot–rotenon, Su–sukcinát, CyC–cytochrom *c*, AmA–antimycin A, A–askorbát, T–TMPD, F–FCCP, Z–azid. Výsledné hodnoty jsou získané vždy z 1 měření.

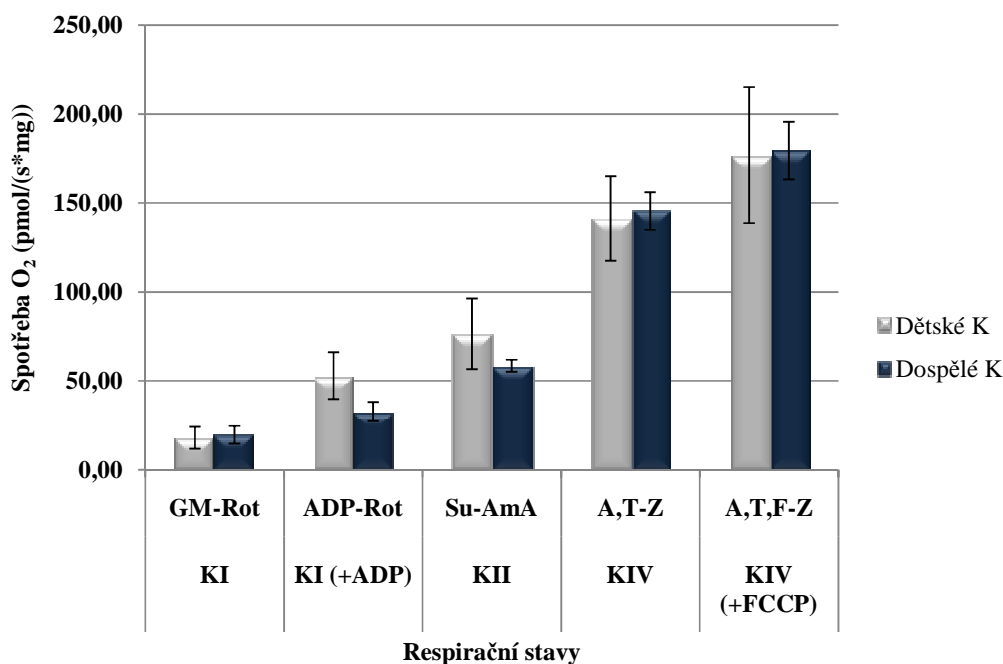
S rostoucí dobou kultivace došlo u kontrolní linie dětského věku K1 k poklesu respirace jednotlivých komplexů systému OXPHOS. Respirace K1 v pasážích P5 a P11 byla velmi podobná. K výraznějšímu poklesu respirace došlo u pasáže P18, přičemž nejvýraznější pokles spotřeby O<sub>2</sub> jsme pozorovali u této pasáže po přidání sbstrátů KI a po přidavku ADP (KI+ADP), kde došlo ke snížení respirace o 41% v porovnání s P5 a o 36% v porovnání s P11 (Obr. 13). Změny nastaly také u poměrů spotřeby O<sub>2</sub>. U pasáže P18 došlo k poklesu poměru respirace komplexu KI po přidavku ADP a před ním (KI+(ADP)/KI) a nárůstu poměru respirace komplexů KIV a KI (KIV/KI) (Obr. 14).

Z těchto výsledků vyplývá, že je potřebné měřit respiraci lidských kožních fibroblastů kultivovaných pokud možno stejnou nebo alespoň velmi podobnou dobu, abychom co nejvíce

snížili dopady doby kultivace na respiraci. V následných experimentech probíhajících ve fibroblastech nebyla překročena pasáž 15.

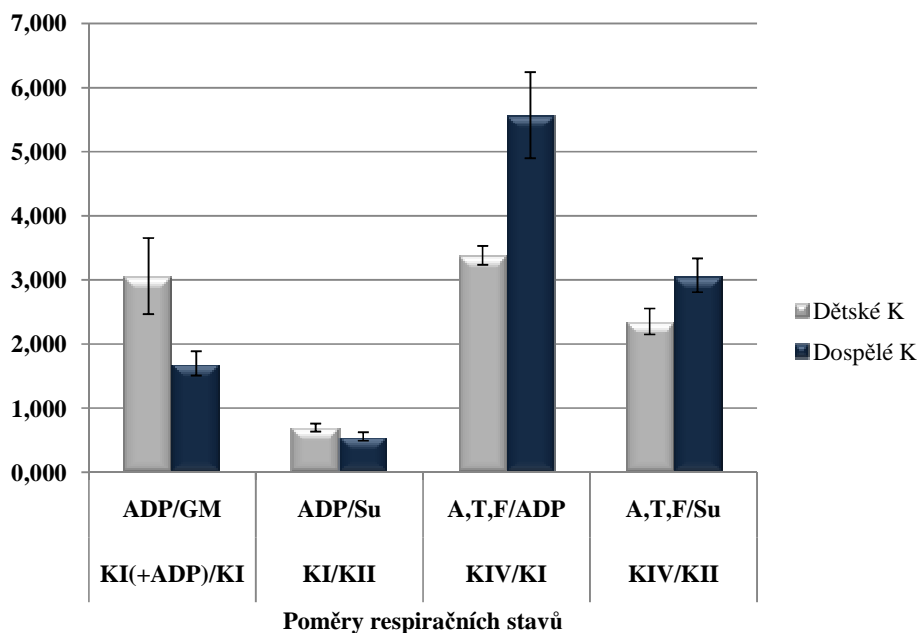
#### 4.1.2 Vliv věku na respiraci

Dále jsme se zaměřili na to, zda je spotřeba  $O_2$  ovlivňována věkem osoby v době odběru fibroblastů. Proto byly jednotlivé linie lidských kožních fibroblastů od kontrol dětského věku K1-K3 (ve věku do 1 roku) a dospělých kontrol K4-K6 (ve věku do 27 let) kultivovány v médiu DMEM s glukózou a následně byla měřena jejich respirace na přístroji Oxygraph-2k po přidávání substrátů a inhibitorů jednotlivých komplexů systému OXPHOS. Výsledné naměřené hodnoty byly normalizovány na množství proteinu (přílohy 8.2) a zaznamenány do grafu (Obr. 15).



**Obr. 15. Porovnání spotřeby  $O_2$  v kultivovaných kožních fibroblastech u kontrolních linií dětského věku K1-K3 a dospělých kontrol K4-K6.** Výsledná respirace byla vztažena na množství proteinu, (0,441–0,860 mg/ml). V průběhu měření byl postupně přidáván detergent, substráty, inhibitory a rozpřahovač pro OXPHOS v následujícím pořadí: Dg, G, M, ADP, Rot, Su, CyC, AmA, A, T, F, Z. P5–pasáž 5, P8–pasáž 8, P9–pasáž 9, P12–pasáž 12, KI–komplex I, KII–komplex II, KIV–komplex IV, Dg–digitonin, G–glutamát, M–malát, Rot–rotenon, Su–sukcinát, CyC–cytochrom c, AmA–antimycin A, A–askorbát, T–TMPD, F–FCCP, Z–azid. Výsledné hodnoty jsou průměry ze 3 měření.

Pro komplexnější pohled na respiraci byly vytvořeny poměry spotřeby O<sub>2</sub> (přílohy 8.2) jednotlivých komplexů systému OXPHOS dětských a dospělých kontrolních linií a vyneseny do grafu (Obr. 16).



**Obr. 16. Poměry spotřeby O<sub>2</sub> v kultivovaných kožních fibroblastech u kontrolních linií dětského věku K1-K3 a dospělých kontrol K4-K6.** Výsledná respirace byla vztažena na množství proteinu (0,441–0,860 mg/ml). V průběhu měření byl postupně přidáván detergent, substráty, inhibitory a rozpřahovač pro OXPHOS v následujícím pořadí: Dg, G, M, ADP, Rot, Su, CyC, Ama, A, T, F, Z. P5–pasáž 5, P8–pasáž 8, P9–pasáž 9, P12–pasáž 12, KI–komplex I, KII–komplex II, KIV–komplex IV, Dg–digitonin, G–glutamat, M–malát, , Rot–rotenon, Su–sukcinát, CyC–cytochrom c, Ama–antimycin A, A–askorbát, T–TMPD, F–FCCP, Z–azid. Výsledné hodnoty jsou průměry ze 3 měření.

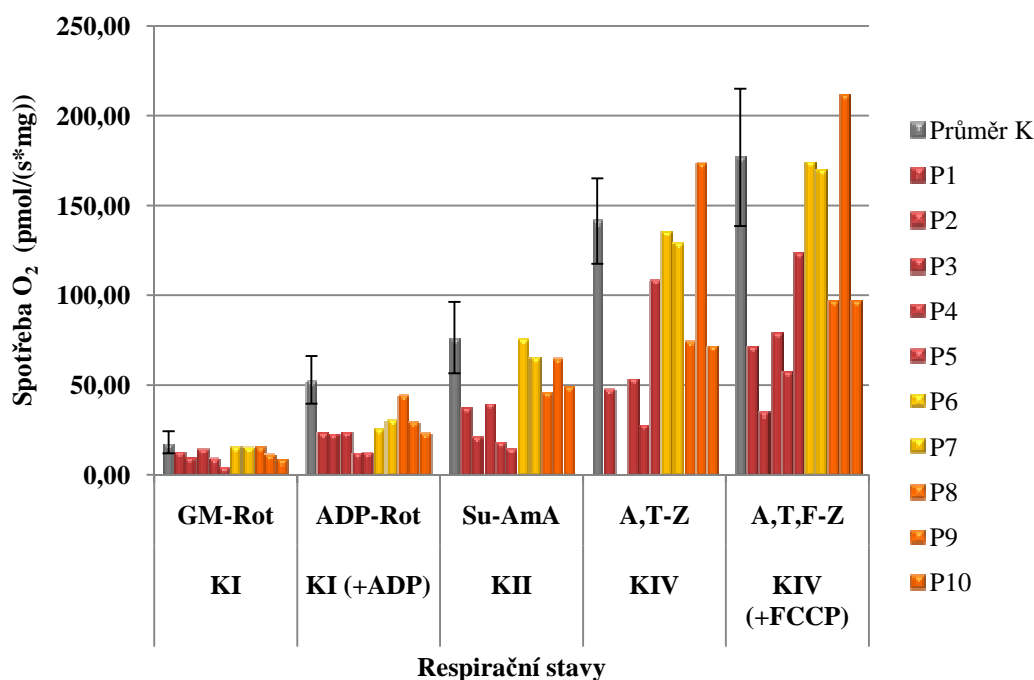
U kultivovaných kožních fibroblastů jednotlivých kontrolních skupin, tedy kontrol dětského věku (K1-K3) a dospělých (K4-K6), byly pozorovány rozdíly ve spotřebě O<sub>2</sub>. Nejvýraznější rozdíl byl u respirace po přidání substrátů KI (KI+(ADP)), kdy došlo k poklesu průměrné respirace u dospělých kontrolních linií o 38% v porovnání s průměrnou respirací kontrolních linií dětského věku (Obr. 15). Rozdíly byly pozorovány také na poměrech spotřeby O<sub>2</sub>. Nejvýraznější byl rozdíl u poměru respirace komplexu KI po přidavku ADP a před ním ((KI+(ADP)/KI), a také u poměru respirace komplexů KIV a KI (KIV/KI) (Obr. 16).

Z důvodu významných rozdílů v respiraci jednotlivých kontrolních skupin jsme v dalších měřeních pro porovnávání respirace patientských skupin se skupinami kontrolními použili vždy kontrolního soubor odpovídajícího věku.

## 4.2 Identifikace poruch OXPHOS na úrovni kultivovaných fibroblastů pomocí vysoce citlivé polarografie

### 4.2.1 Analýza spotřeby kyslíku u pacientů s primárními mitochondriálními defekty

Po zjištění optimálních podmínek byla metoda vysoce citlivé polarografie využita k identifikaci poruch mitochondriálních funkcí u pacientů s primárními mitochondriálními onemocněními. Nejprve byla měřena mitochondriální spotřeba  $O_2$  kožních fibroblastů kultivovaných v médiu DMEM s glukózou od pacientů s prokázanými primárními defekty OXPHOS ve svalové tkáni (P1-P7), následně byla metoda využita k analýze mitochondriálních funkcí u pacientů s neznámými defekty OXPHOS (P8-P10). Spotřeba  $O_2$  byla měřena na přístroji Oxygraph-2k po přidávání substrátů a inhibitorů jednotlivých komplexů systému OXPHOS. Výsledné naměřené hodnoty byly normalizovány na množství proteinu (přílohy 8.3) a zaznamenány do grafu (Obr. 17).

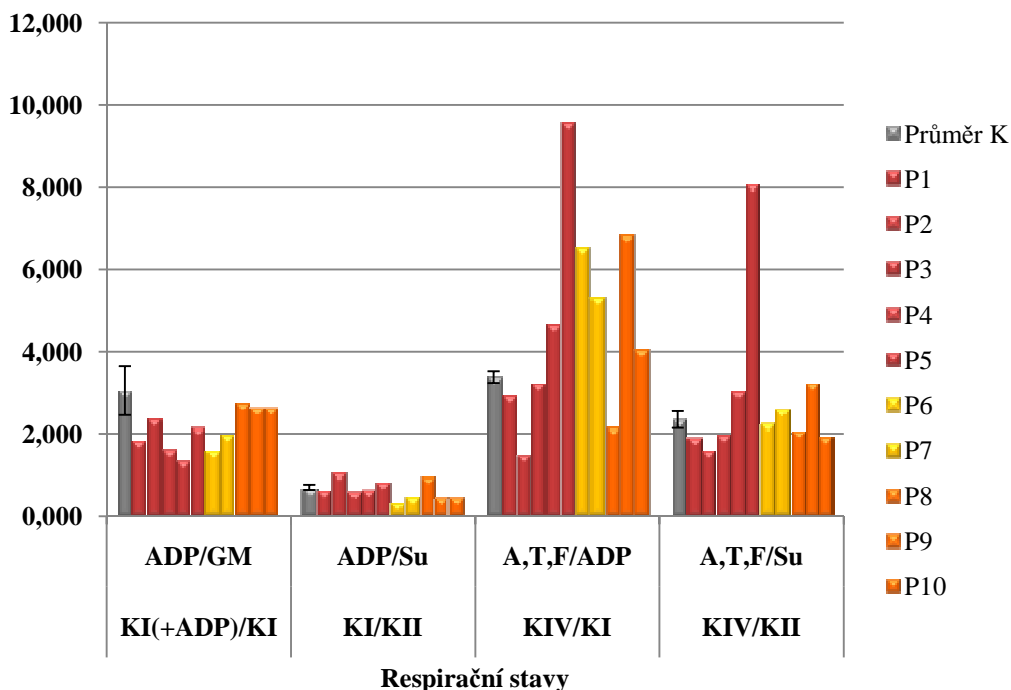


**Obr. 17. Spotřeba  $O_2$  v kožních fibroblastech pacientů P1-P10 s primárním mitochondriálním defektem OXPHOS potvrzeným ve svalové tkáni a kontrolních linií dětského věku K1-K3.**

Výsledná respirace byla vztažena na množství proteinu (0,325–0,800 mg/ml). Průměr K – průměrná respirace 3 kontrolních linií dětského věku, P1–P5 pacienti s poruchou komplexu IV, P6–P7 pacienti s poruchou komplexu I, P8–P10 pacienti s neznámou poruchou OXPHOS. V průběhu měření byly postupně přidávány detergent, substráty, inhibitory a rozpřahovač pro OXPHOS v následujícím pořadí: Dg, G, M, ADP, Rot, Su, CyC, AmA, A, T, F, Z. KI – komplex I, KII – komplex II, KIV – komplex IV, Dg – digitonin, G – glutamát, M – malát, Rot – rotenon, Su – sukcinát, CyC – cytochrom c, AmA – antimycin A, A – askorbát, T – TMPD, F – FCCP, Z – azid. Výsledné hodnoty jsou získané vždy z 1 měření.



Pro komplexnější pohled na respiraci byly vytvořeny poměry spotřeby  $O_2$  (přílohy 8.3) jednotlivých komplexů systému OXPHOS u pacientů s primárními mitochondriálními onemocněními a kontrolních linií dětského věku a vyneseny do grafu (Obr. 18).



**Obr. 18. Poměry spotřeby  $O_2$  v kultivovaných fibroblastech pacientů P1-P10 s primárním mitochondriálním defektem OXPHOS potvrzeným ve svalové tkáni a kontrolních linií dětského věku K1-K3.** Výsledná respirace byla vztažena na množství proteinu (0,325–0,800 mg/ml). Průměr K – průměrná respirace 3 kontrolních linií dětského věku, P1–P5 pacienti s poruchou komplexu IV, P6-P7 pacienti s poruchou komplexu I, P8-P10 pacienti s neznámou poruchou OXPHOS. V průběhu měření byly postupně přidávány detergent, substráty, inhibitory a rozpřahovač v následujícím pořadí: Dg, G, M, ADP, Rot, Su, CyC, AmA, A, T, F, Z. KI – komplex I, KII – komplex II, KIV – komplex IV, Dg – digitonin, G – glutamát, M – malát, Rot – rotenon, Su – sukcinát, CyC – cytochrom *c*, AmA – antimycin A, A – askorbát, T – TMPD, Z – azid. Výsledné hodnoty jsou získané vždy z 1 měření.

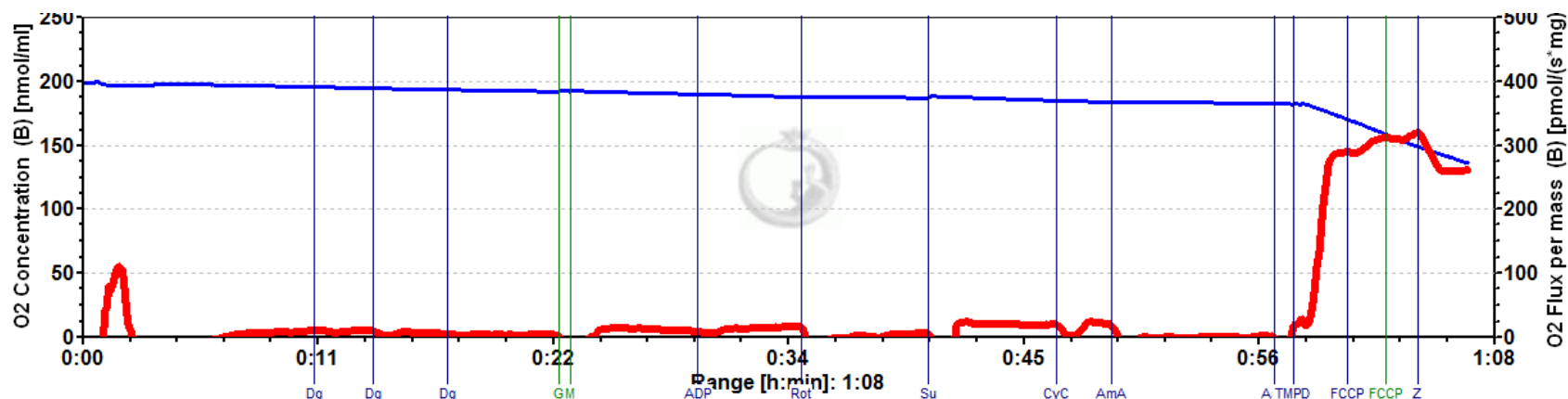
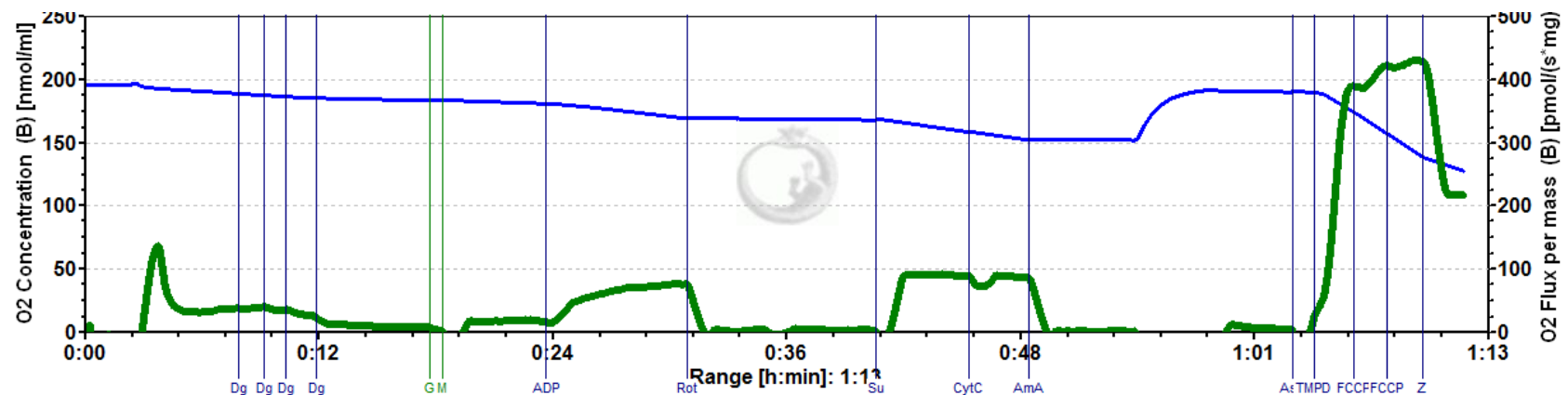
U pacientů s poruchou komplexu IV (P1-P5) byla pozorována celkově snížená respirace (Obr. 19) v porovnání s průměrnou hodnotou respirace kontrolních linií dětského věku (K1-K3). Nejvýraznější defekt v respiraci se projevil po přidání substrátů komplexu IV. U pacienta P2 byla respirace po přidání substrátů KIV dokonce snížena o 99,7% v porovnání s průměrnou hodnotou respirace kontrolních linií dětského věku (Obr. 17). Rozdíly byly patrné také na poměrech spotřeby  $O_2$ . Nejvýraznější byl u poměru respirace KI po přidavku ADP a před ním ((KI+(ADP)/KI), a také u poměru respirace KIV a KI (KIV/KI), (Obr. 18).

U pacientů s poruchou komplexu I (P6 a P7) byla pozorována výrazně snížená respirace po přidání substrátů komplexu I glutamátu a malátu (Obr. 17), zatímco respirace po přidání substrátů ostatních komplexů OXPHOS odpovídala průměrným hodnotám respirace kontrolních linií. Změny byly patrné také u poměrů spotřeby  $O_2$ , ve kterých se vyskytoval komplex I, tedy  $((KI+(ADP)/KI)$  a  $(KIV/KI)$ , (Obr. 18).

Pacient s neznámým defektem P8 vykazoval sníženou respiraci po přidání substrátu II. komplexu OXPHOS o 40% v porovnání s průměrnou hodnotou respirace kontrolních linií dětského věku a také výrazně sníženou hodnotu respirace po přidání substrátů IV. komplexu. Respirace po přidání substrátů IV. komplexu u P8 byla snížena o 48% v porovnání s průměrnou hodnotou respirace kontrolních linií Obr. 17. U tohoto pacienta byl také výrazně snížený poměr spotřeby  $O_2$  komplexů IV a I ( $KIV/KI$ ) a komplexů IV a II ( $KIV/KII$ ) Obr. 18. Tyto hodnoty mohou poukazovat na kombinovaný defekt komplexů II a IV.

Respirace dalšího z pacientů s neznámým defektem P9 byla výrazně odlišná od průměrných hodnot respirace kontrolních linií pouze po přidání substrátů I. komplexu OXPHOS a následně ADP. Hodnota respirace po přidání substrátů KI byla snížena o 36% a po následném přidání ADP o 41% v porovnání s odpovídající průměrnou hodnotou respirace kontrolních linií (Obr. 17). U tohoto pacienta došlo také, stejně jako u pacientů P6 a P7 s poruchou komplexu I, k výraznému nárůstu poměru  $KIV/KI$  (Obr. 18). Tento fakt by mohl naznačovat, že u daného pacienta je porušena funkce komplexu I.

U pacienta P10 s neznámým defektem OXPHOS byla celkově snížena respirace v porovnání s průměrnou hodnotou respirace kontrolních linií dětského věku (K1-K3), (Obr. 17). Na poměrech respirace jednotlivých komplexů jsme pozorovali pouze velice mírné změny, a to na úrovni poměrů  $KI/KII$ ,  $KIV/KI$  a  $KIV/KII$ , v porovnání s kontrolními linií (Obr. 18). Tento nálezný by mohl znamenat, že se jedná o kombinovaný defekt více komplexů OXPHOS.

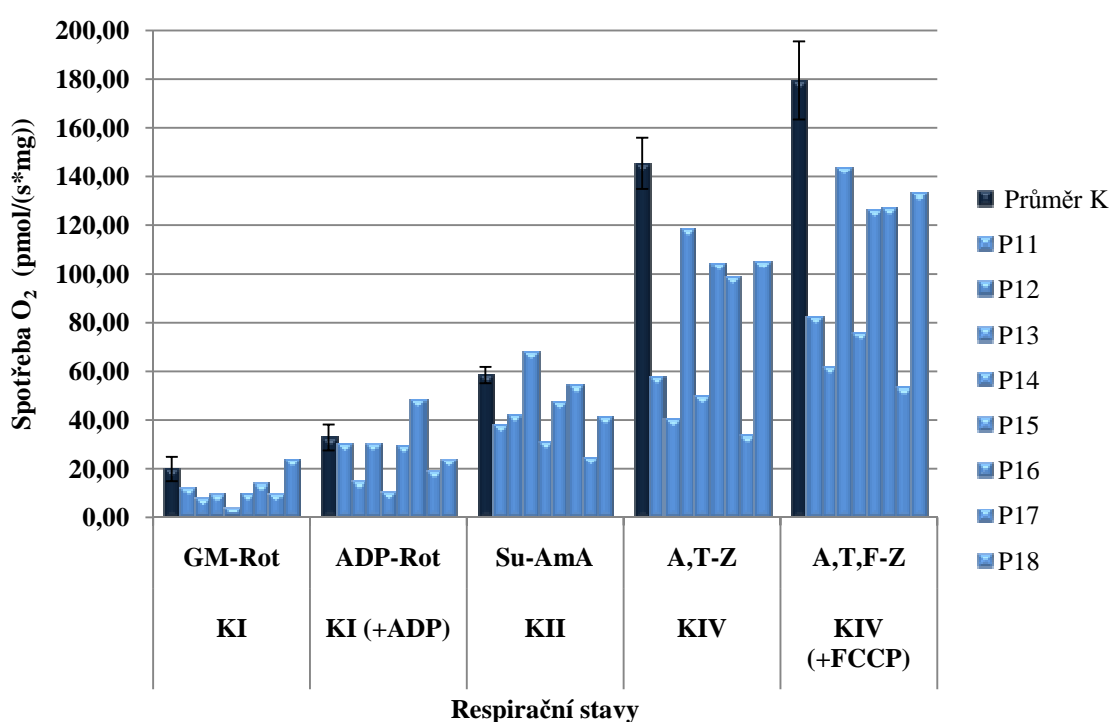


Obr. 19. Ukázka záznamu z měření spotřeby  $O_2$  v kultivovaných kožních fibroblastech kontrolní linie K1 (zelená křivka) a linie pacienta P1 (červená křivka) s prokázanou poruchou komplexu IV (mutace genu *SCO2*) na přístroji Oxygraph-2k (program DatLab5, OROBOROS). Modrá křivka zobrazuje aktuální koncentraci kyslíku v komoře, červená a zelená křivka zobrazují spotřebu kyslíku vztahovanou na množství proteinu (K1 - 0,597 mg/ml a P1 - 0,605 mg/ml). V průběhu měření byly přidávány detergent, jednotlivé substráty, inhibitory a rozpřahovač pro OXPHOS v následujícím pořadí: digitonin (Dg) glutamát (G), malát (M), ADP, rotenon (Rot), sukcinát (Su), cytochrom *c* (Cyt *c*), antimycin A (AmA), askorbát (Asc), TMPD, FCCP a azid (Z).

## 4.2.2 Analýza spotřeby kyslíku u pacientů se sekundárními mitochondriálními defekty

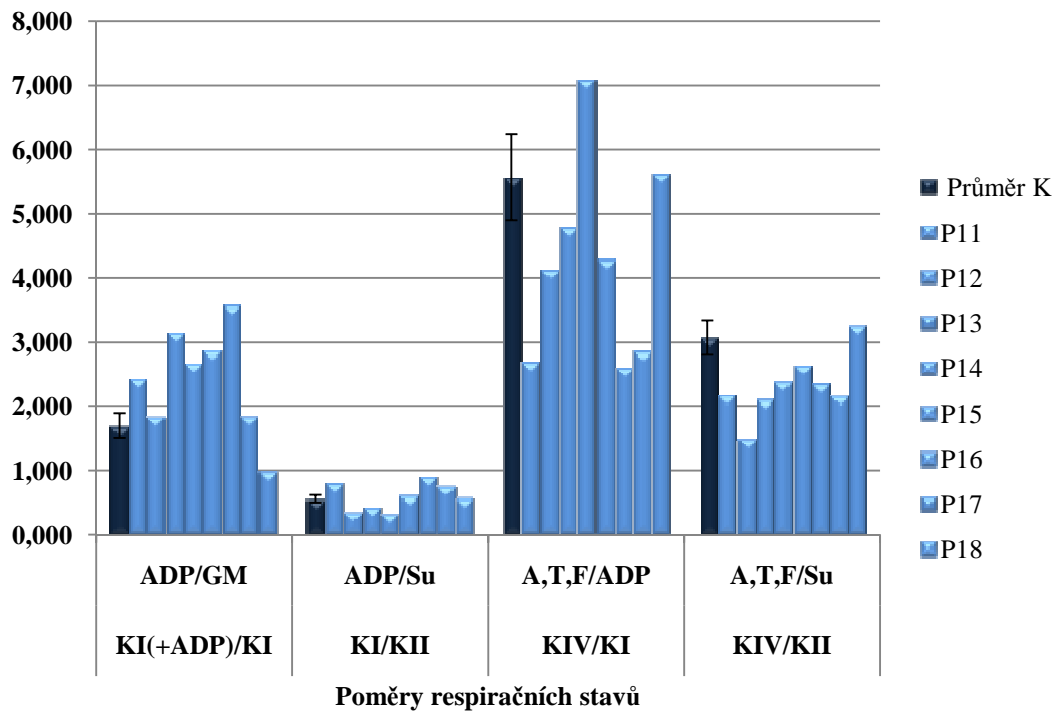
### 4.2.2.1 Pacienti s Huntingtonovou chorobou

Následně byla měřena mitochondriální spotřeba  $O_2$  lidských kožních fibroblastů kultivovaných v médiu DMEM s glukózou od pacientů, kde se předpokládala sekundární mitochondriální dysfunkce. První testovanou skupinu tvořilo 8 pacientů s Huntingtonovou chorobou (P11-P18). Spotřeba  $O_2$  byla měřena na přístroji Oxygraph-2k po přidávání substrátů a inhibitorů jednotlivých komplexů systému OXPHOS. Výsledné naměřené hodnoty byly normalizovány na množství proteinu (přílohy 8.4) a zaznamenány do grafu (Obr. 20).



**Obr. 20. Spotřeba  $O_2$  ve fibroblastech pacientů P11-P18 s Huntingtonovou chorobou a linií od dospělých kontrol K4-K6.** Výsledná respirace byla vztažena na množství proteinu (0,417–0,860 mg/ml). Průměr K – průměrná respirace 3 kontrolních linií dospělého věku, P11–P18 pacienti s Huntingtonovou chorobou. V průběhu měření byly postupně přidávány detergent, substráty, inhibitory a rozpřahovač pro OXPHOS v následujícím pořadí: Dg, G, M, ADP, Rot, Su, CyC, AmA, A, T, F, Z. KI – komplex I, KII – komplex II, KIV – komplex IV, Dg – digitonin, G – glutamát, M – malát, Rot – rotenon, Su – sukcinát, CyC – cytochrom c, AmA – antimycin A, A – askorbát, T – TMPD, Z – azid. Výsledné hodnoty jsou získané vždy z 1 měření.

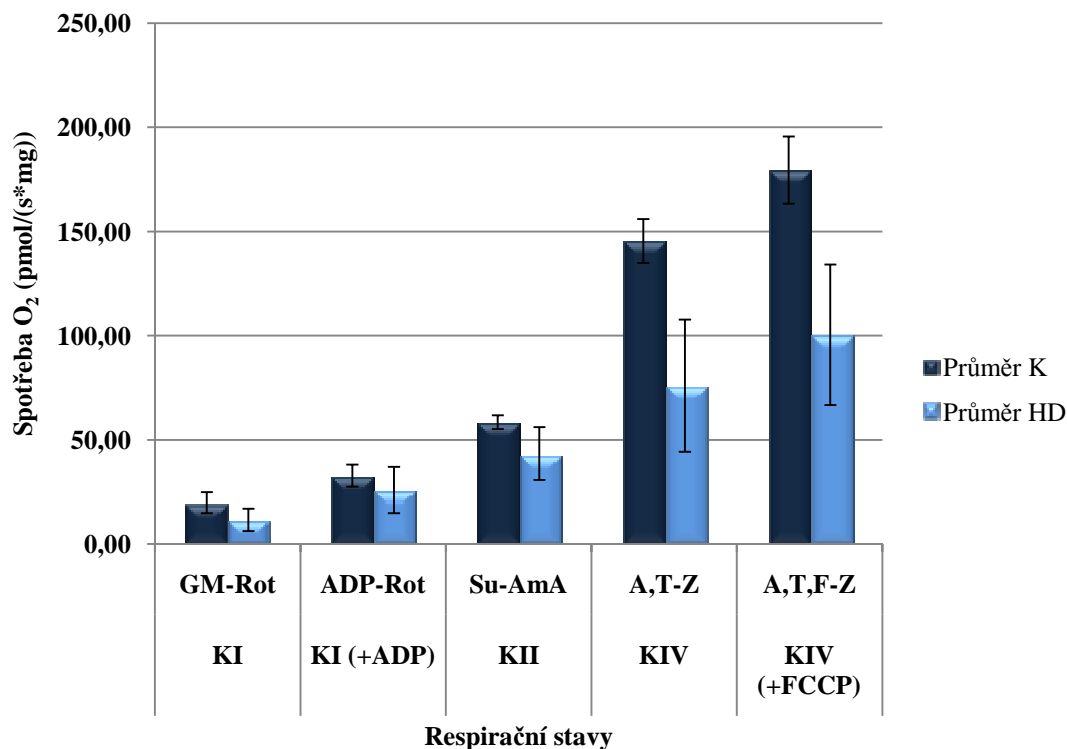
Pro komplexnější pohled na respiraci byly vytvořeny poměry spotřeby  $O_2$  (přílohy 8.4) jednotlivých komplexů systému OXPHOS u pacientů s HD a kontrolních linií dospělého věku, které byly vyneseny do grafu (Obr. 21).



**Obr. 21. Poměry spotřeby O<sub>2</sub> ve fibroblastech pacientů P11-P18 s Huntingtonovou chorobou a linií od dospělých kontrol K4-K6.** Výsledná respirace byla vztažena na množství proteinu (0,417–0,860 mg/ml). Průměr K–průměrná respirace 3 kontrolních linií dospělého věku, P11–P18 pacienti s Huntingtonovou chorobou. V průběhu měření byly postupně přidávány detergent, substráty, inhibitory a rozpřahovač pro OXPHOS v následujícím pořadí: Dg, G, M, ADP, Rot, Su, CyC, AmA, A, T, F, Z. KI–komplex I, KII–komplex II, KIV–komplex IV, Dg–digitonin, G–glutamát, M–malát, Rot–rotenon, Su–sukcinát, CyC–cytochrom c, Ama–antimycin A, A–askorbát, T–TMPD, Z–azid. Výsledné hodnoty jsou získané vždy z 1 měření.

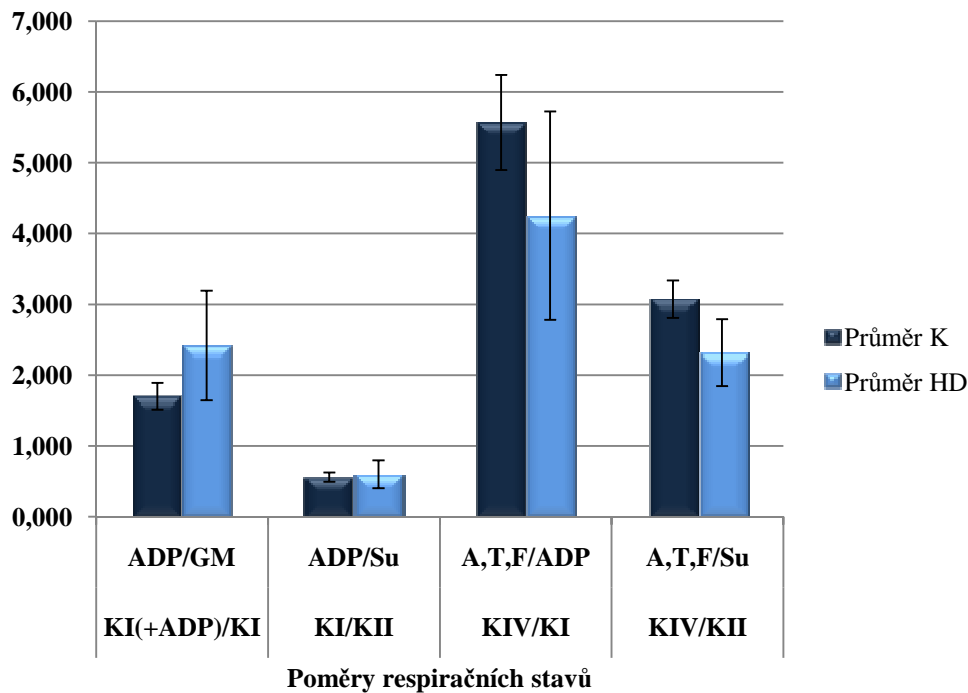
Pacienti s Huntingtonovou chorobou vykazují odlišnosti v respiraci po přidání substrátů I. komplexu (glutamátu a malátu), II. komplexu (sukcinátu) a IV. komplexu (askorbátu a TMPD) OXPHOS oproti kontrolním liniím dospělého věku (K4-K6). U 7 z 8 pacientů je snížena respirace po přidání substrátů I. komplexu, u 6 z 8 pacientů po přidání substrátu II. komplexu a u všech 8 pacientů je zároveň výrazně snížena respirace po přidání substrátů IV. komplexu OXPHOS (Obr. 20). Rozdíl je patrný také u poměrů respirace jednotlivých komplexů OXPHOS (Obr. 21), kdy u 6 z 8 pacientů došlo k poklesu poměru KIV/KI a u 7 z 8 pacientů byl snížený poměr KIV/KII.

Pro větší přehlednost byly vytvořeny grafy výsledné respirace (0) a poměrový graf (Obr. 23), které znázorňují průměrné hodnoty respirace kožních fibroblastů 8 pacientů s Huntingtonovou chorobou (P11-P18) a 3 kontrolních linií dospělého věku (K4-K6) kultivovaných v médiu DMEM s glukózou.



**Obr. 22. Průměrné hodnoty spotřeby O<sub>2</sub> ve fibroblastech pacientů P11-P18 s Huntingtonovou chorobou a linií od dospělých kontrol K4-K6.** Výsledná respirace byla vztažena na množství proteinu (0,417–0,860 mg/ml). Průměr K–průměrná respirace 3 kontrolních linií dospělého věku, Průměr HD–průměrná respirace 8 linií pacientů s Huntingtonovou chorobou. V průběhu měření byly postupně přidávány detergent, substráty, inhibitory a rozpřahovač pro OXPHOS v následujícím pořadí: Dg, G, M, ADP, Rot, Su, CyC, AmA, A, T, F, Z. KI–komplex I, KII–komplex II, KIV–komplex IV, Dg–digitonin, G–glutamát, M–malát, Rot–rotenon, Su–sukcinát, CyC–cytochrom c, AmA–antimycin A, A–askorbát, T–TMPD, Z–azid. Výsledné hodnoty jsou získané vždy z 1 měření.

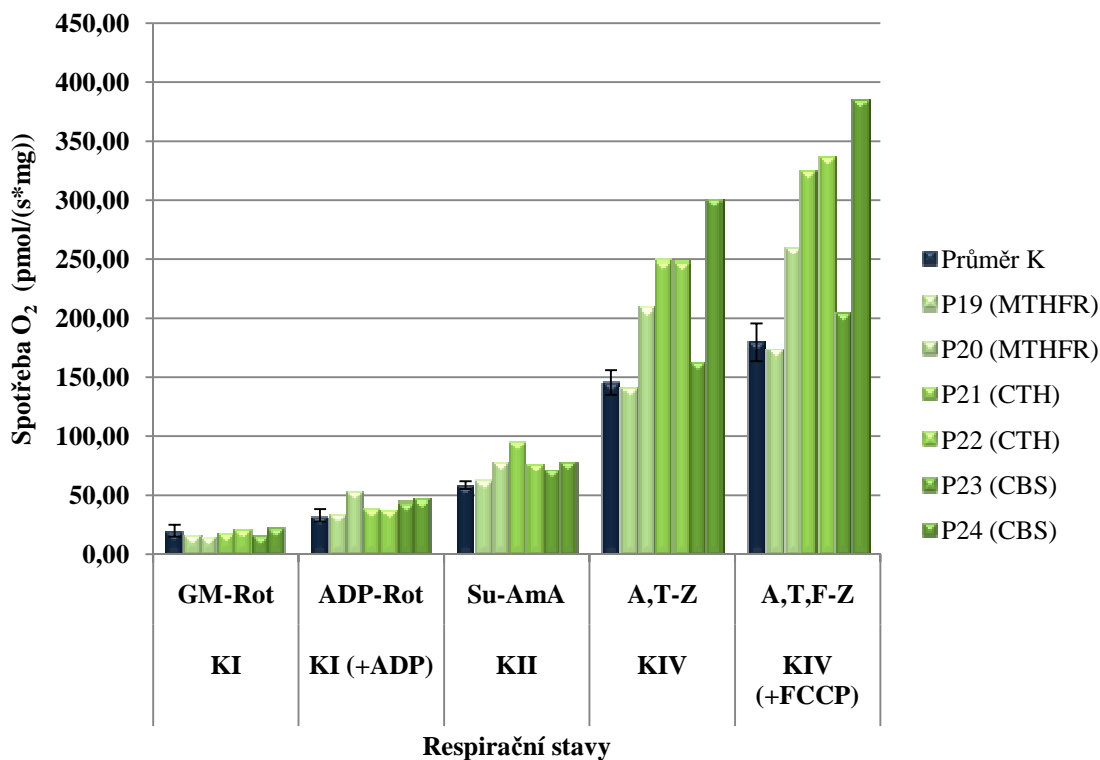
Odlišnosti v respiraci jsou patrné i při porovnání průměrných hodnot respirace po přidání substrátů a inhibitorů jednotlivých komplexů OXPHOS u linií 8 pacientů s HD (P11-P18) a 3 dospělých kontrol (K4-K6). Největší rozdíl je zřetelný po přidání substrátů komplexu IV (askorbátu a TMPD), kdy bylo detekováno snížení průměrné hodnoty respirace pacientů s HD o 48% v porovnání s průměrnou hodnotou respirace kontrolních linií (0). U poměrových grafů je patrný nejvýraznější rozdíl u pacientů s HD ve snížení poměru KIV/KI (Obr. 23).



**Obr. 23. Poměry průměrných hodnot spotřeby O<sub>2</sub> ve fibroblastech pacientů P11-P18 s Huntingtonovou chorobou a linií od dospělých kontrol K4-K6.** Výsledná respirace byla vztažena na množství proteinu (0,417–0,860 mg/ml). Průměr K–průměrná respirace 3 kontrolních linií dospělého věku, Průměr HD–průměrná respirace 8 linií pacientů s Huntingtonovou chorobou. V průběhu měření byly postupně přidávány detergent, substráty, inhibitory a rozpráhovač pro OXPHOS v následujícím pořadí: Dg, G, M, ADP, Rot, Su, CyC, AmA, A, T, F, Z. KI–komplex I, KII–komplex II, KIV–komplex IV, Dg–digitonin, G–glutamát, M–malát, Rot–rotenon, Su–sukcinát, CyC–cytochrom c, AmA–antimycin A, A–askorbát, T–TMPD, Z–azid. Výsledné hodnoty jsou získané vždy z 1 měření.

#### 4.2.2.2 Pacienti s poruchou metabolismu sirných aminokyselin

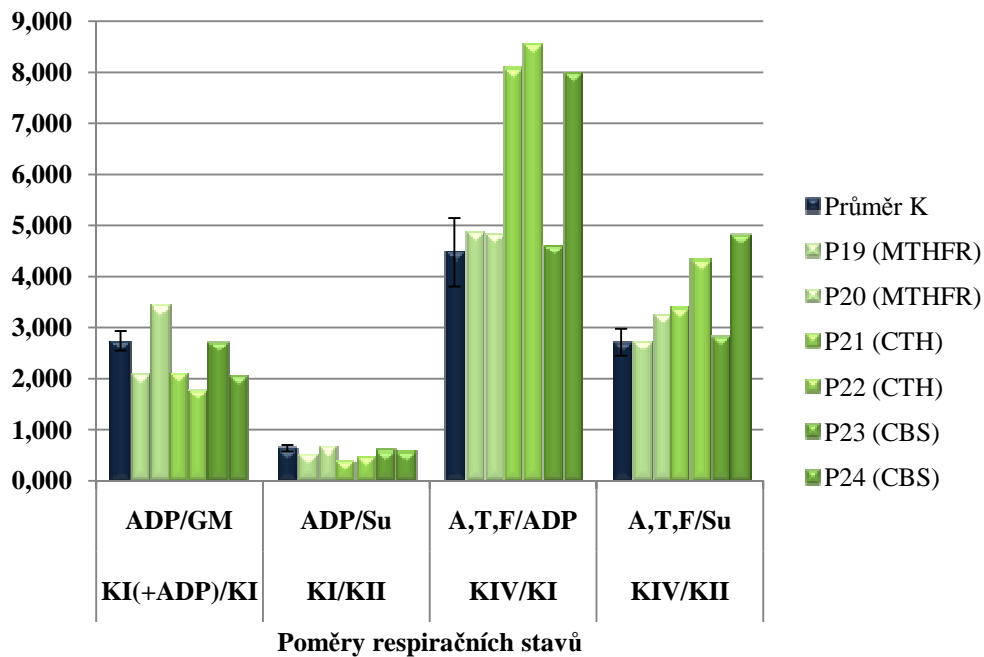
Druhou testovanou skupinu s předpokladem pro sekundární mitochondriální dysfunkci tvořili pacienti s poruchou metabolismu sirných aminokyselin způsobenou mutací genu *MTHFR* (P19 a P20), *CTH* (P21 a P22) nebo *CBS* (P23 a P24). Linie kožních fibroblastů těchto pacientů byly kultivovány v médiu DMEM s glukózou a následně byla měřena jejich respirace po přidávání substrátů a inhibitorů jednotlivých komplexů systému OXPHOS na přístroji Oxygraph-2k. Výsledné naměřené hodnoty byly normalizovány na množství proteinu (přílohy 8.5) a zaznamenány do grafu (Obr. 24).



**Obr. 24. Spotřeba O<sub>2</sub> ve fibroblastech pacientů P19-P24 s poruchou metabolismu sirných aminokyselin a linií od dospělých kontrol K4-K6.** Výsledná respirace byla vztažena na množství proteinu (0,398–0,860 mg/ml). Průměr K–průměrná respirace 3 kontrolních linií dospělého věku, P19 a P20-pacienti s mutací genu *MTHFR*, P21 a P22-pacienti s mutací genu *CTH*, P23 a P24-pacienti s mutací genu *CBS*. V průběhu měření byly postupně přidávány detergent, substráty, inhibitory a rozpřahovač pro OXPHOS v následujícím pořadí: Dg, G, M, ADP, Rot, Su, CyC, AmA, A, T, F, Z. KI–komplex I, KII–komplex II, KIV–komplex IV, Dg–digitonin, G–glutamát, M–malát, Rot–rotenon, Su–sukcinát, CyC–cytochrom *c*, AmA–antimycin A, A–askorbát, T–TMPD, Z–azid, *MTHFR*–gen pro methylenetetrahydrofolát reduktázu, *CTH*–gen pro cystathionin  $\gamma$ -lyázu, *CBS*–gen pro cystathion  $\beta$ -syntetázu. Výsledné hodnoty jsou získané vždy z 1 měření.

Pro komplexnější pohled na respiraci byly vytvořeny poměry spotřeby O<sub>2</sub> (přílohy 8.5) jednotlivých komplexů systému OXPHOS u pacientů s poruchou metabolismu sirných aminokyselin a linií dospělých kontrol, které byly vyneseny do grafu (Obr. 25).



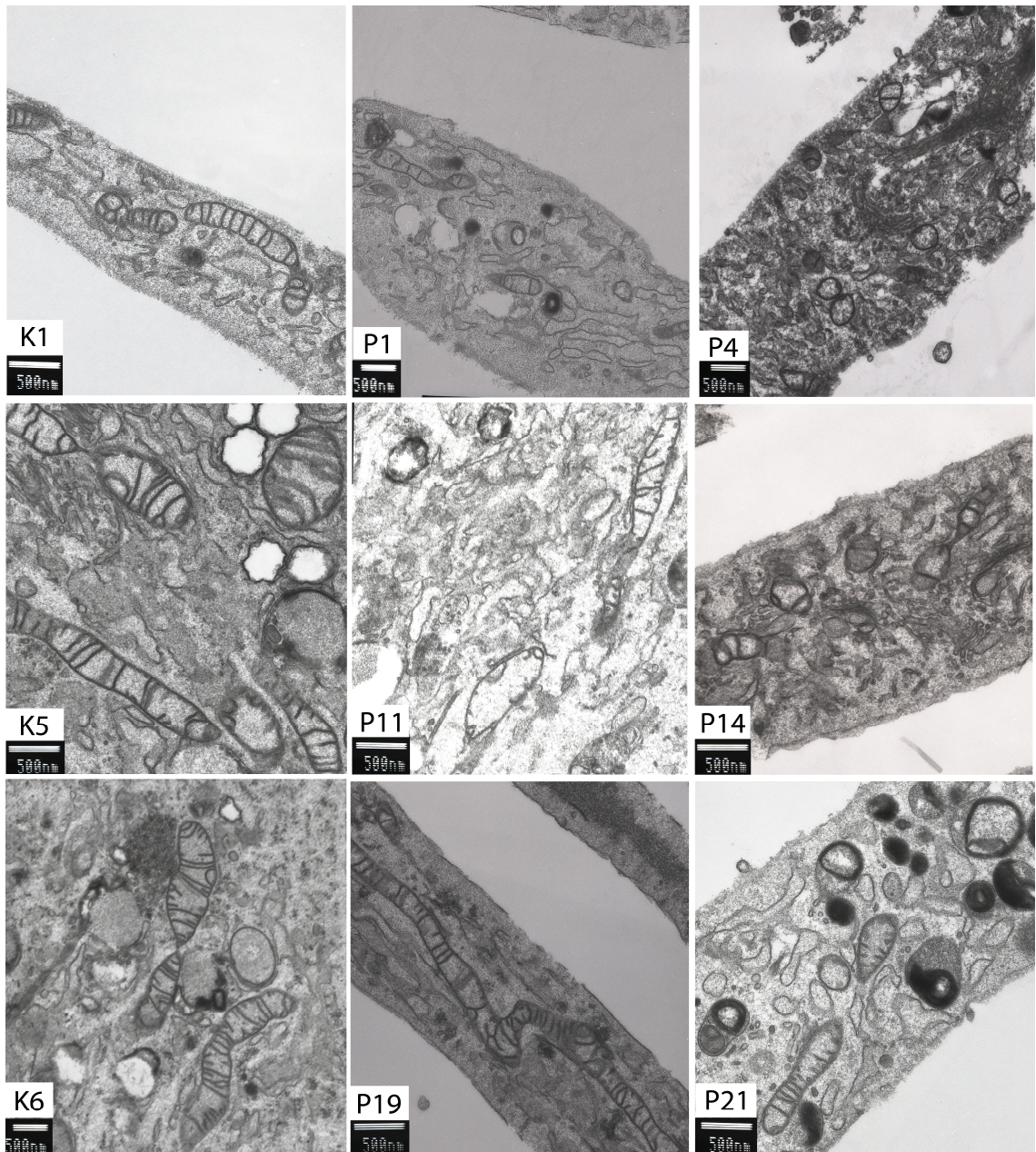


**Obr. 25. Poměry spotřeby O<sub>2</sub> ve fibroblastech pacientů P19-P24 s poruchou metabolismu sirných aminokyselin a linií dospělých kontrol K4-K6.** Výsledná respirace byla vztažena na množství proteinu (0,398–0,860 mg/ml). Průměr K–průměrná respirace 3 kontrolních linií dospělého věku, P19 a P20-pacienti s mutací genu *MTHFR*, P21 a P22-pacienti s mutací genu *CTH*, P23 a P24-pacienti s mutací genu *CBS*. V průběhu měření byly postupně přidávány detergent, substráty, inhibitory a rozpřahovač v následujícím pořadí: Dg, G, M, ADP, Rot, Su, CyC, AmA, A, T, F, Z. KI–komplex I, KII–komplex II, KIV–komplex IV, Dg–digitonin, G–glutamát, M–malát, Rot–rotenon, Su–sukcinát, CyC–cytochrom *c*, AmA–antimycin A, A–askorbát, T–TMPD, Z–azid, *MTHFR*–gen pro methylenetetrahydrofolát reduktázu, *CTH*–gen pro cystathionin  $\gamma$ -lyázu, *CBS*–gen pro cystathion  $\beta$ -syntetázu. Výsledné hodnoty jsou získané vždy z 1 měření.

U pacientů s poruchou metabolismu sirných aminokyselin jsme detekovali mírný nárůst respirace po přidání substrátů II. komplexu a výrazný nárůst respirace po přidání substrátů IV. komplexu OXPHOS. Výrazně vyšší respirace po přidání substrátů IV. komplexu v porovnání s průměrnou hodnotou respirace kontrolních linií byla detekována u 4 pacientů ze 6 (Obr. 24). Ke změnám dochází také u poměrů respirace jednotlivých komplexů, kdy u 3 pacientů ze 6 můžeme pozorovat výrazný nárůst poměru KIV/KI a u 4 pacientů ze 6 nárůst poměru KIV/KII oproti kontrolním liniím (Obr. 25).

### 4.3 Analýza ultrastruktury mitochondrií

S využitím transmisní elektronové mikroskopie (mikroskop Jeol JEM 1200EX) byla ve spolupráci s Ústavem patologie 1.LF UK vizualizována ultrastruktura mitochondrií testovaných linií lidských kožních fibroblastů pacientů a kontrol (Obr. 26).



**Obr. 26. Ultrastruktura mitochondrií v kultivovaných fibroblastech pacientů s vybranými mitochondriálními defekty a kontrol.** K1-kontrolní linie dětského věku, P1 a P4-pacienti s primárními mitochondriálními poruchami, K5 a K6-linie dospělých kontrol, P11 a P14-pacienti s Huntingtonovou chorobou, P19 a P21-pacienti s poruchou metabolismu sirných aminokyselin. Získáno na mikroskopu Jeol JEM 1200EX. Zvětšení: K6-10 000x, ostatní 15 000x.

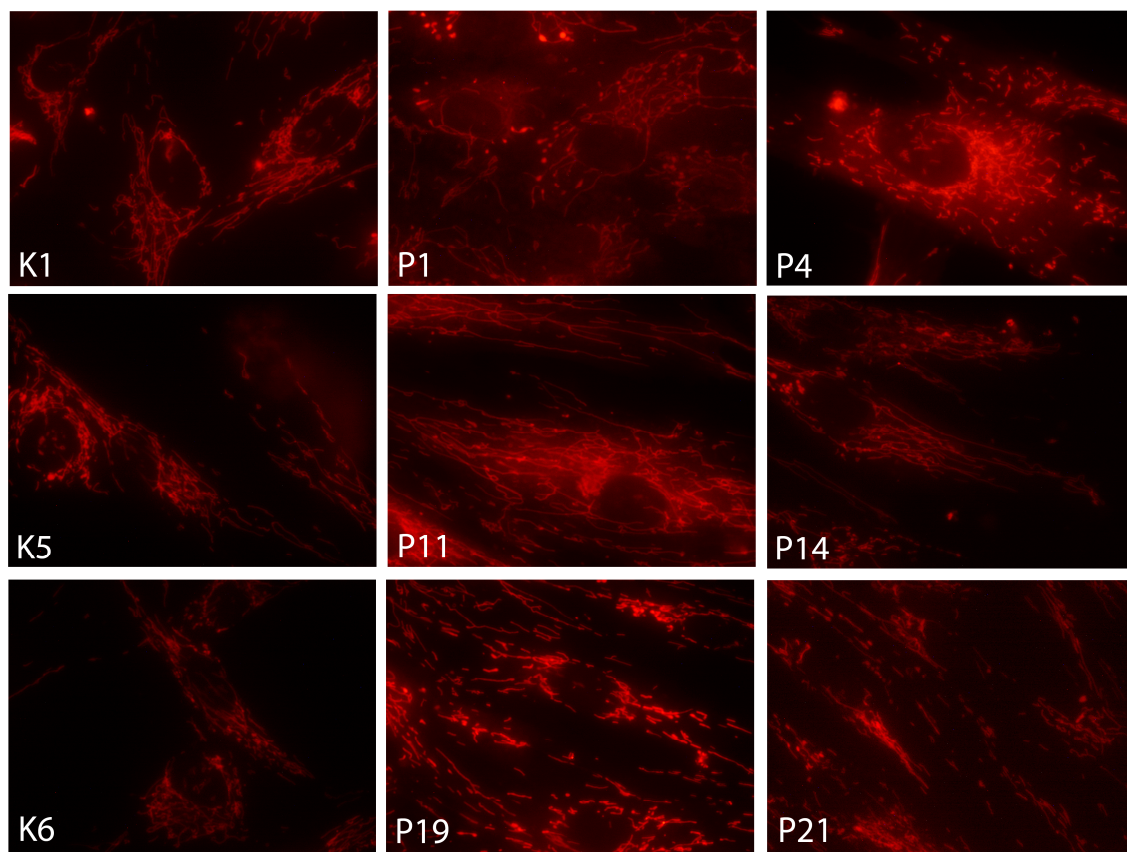
V porovnání s kontrolní linií dětského věku K1 byla pozorována u pacientů P1 a P4 s primárními mitochondriálními poruchami abnormální ultrastruktura mitochondrií, snížené množství krist a odlišný tvar („nafouklé“ mitochondrie), což je více patrné u pacienta P4.

Přesto, že HD není primární mitochondriální poruchou, u pacientů s touto chorobou (P11 a P14) byly v porovnání s dospělou kontrolní linií K5 nalezeny patologické změny

ultrastruktury mitochondrií. Mitochondrie se odlišovaly sníženým množstvím krist případně jejich délkou. U skupiny pacientů s poruchou metabolismu sirných aminokyselin byla také pozorována pozměněná ultrastruktura mitochondrií. Široké spektrum změn zahrnovalo nápadně prodloužené mitochondrie (P18), které obsahovaly kratší kristy (P21) či mitochondrie téměř bez krist a přítomnost apoptotických tělísek (P21).

#### 4.4 Struktura mitochondriální sítě

Struktura mitochondriální sítě byla nativně barvena s využitím fluorescenční barvy MitoTracker Red (Molecular Probes) ve výsledné 10nM koncentraci a následně snímána CCD kamerou DP50 (Obr. 27).



**Obr. 27. Vizualizace mitochondriální sítě ve fibroblastech pacientů s primárními a sekundárními mitochondriálními dysfunkcemi a kontrolních linií kultivovaných v médiu DMEM s glukózou.** Buněčné linie byly nativně značeny fluorescenční sondou MitoTracker Red (Molecular Probes) a následně snímány CCD kamerou DP50. K1-kontrolní linie dětského věku, P1 a P4-pacienti s primární mitochondriální poruchou, K5 a K6-dospělá kontrolní linie, P11 a P14-pacientů s Huntingtonovou chorobou, P19 a P21-pacienti s poruchou metabolismu sirných aminokyselin. Zvětšení: 600x.

Mitochondriální síť pacientů s primárními poruchami mitochondrií (P1 a P4) byla v porovnání s kontrolní linií dětského věku (K1) výrazně fragmentovaná, o poznání řidší a méně větvená. V buňkách pacientů P1 a P4 jsme místy pozorovali výrazné shluky mitochondrií, které se u kontrolní linie K1 nevyskytovaly.

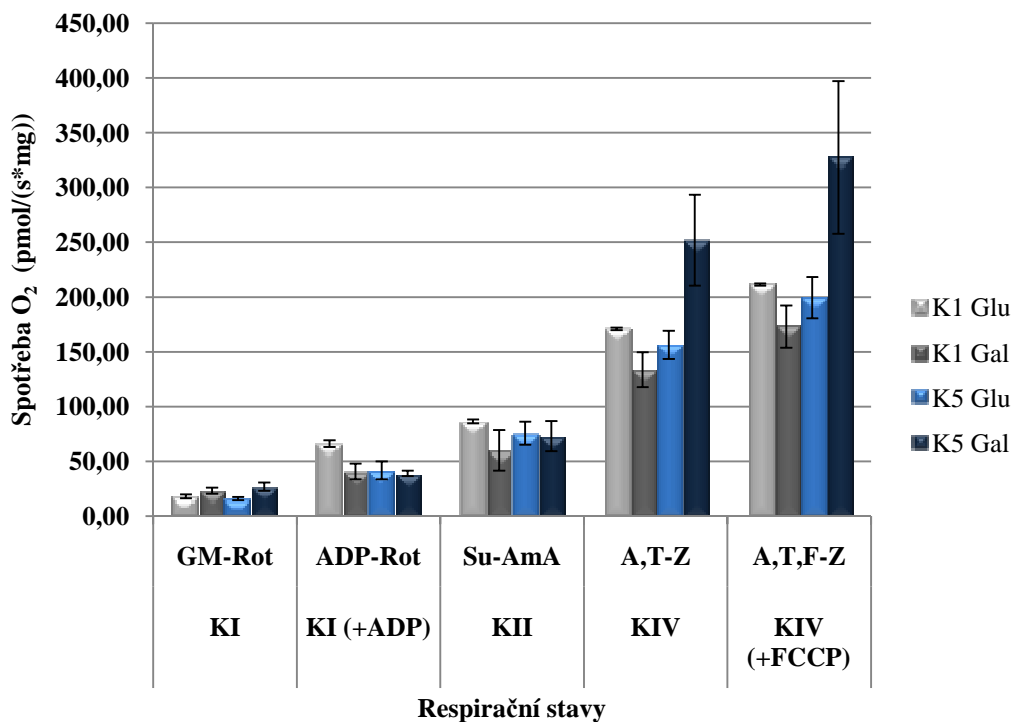
U pacientů s HD (P11 a P14) byla v porovnání s kontrolní linií dospělého věku (K5) mitochondriální síť výrazně řidší a prodloužená. U pacientů s poruchami metabolismu sirných aminokyselin (P19 a P21) jsme pozorovali výrazně fragmentovanou mitochondriální síť v porovnání s mitochondriální sítí kontroly.

#### **4.5 Testování vlivu různých podmínek kultivace na funkci OXPHOS**

##### **4.5.1 Kultivace kontrolních linií v médiu DMEM s glukózou a galaktózou**

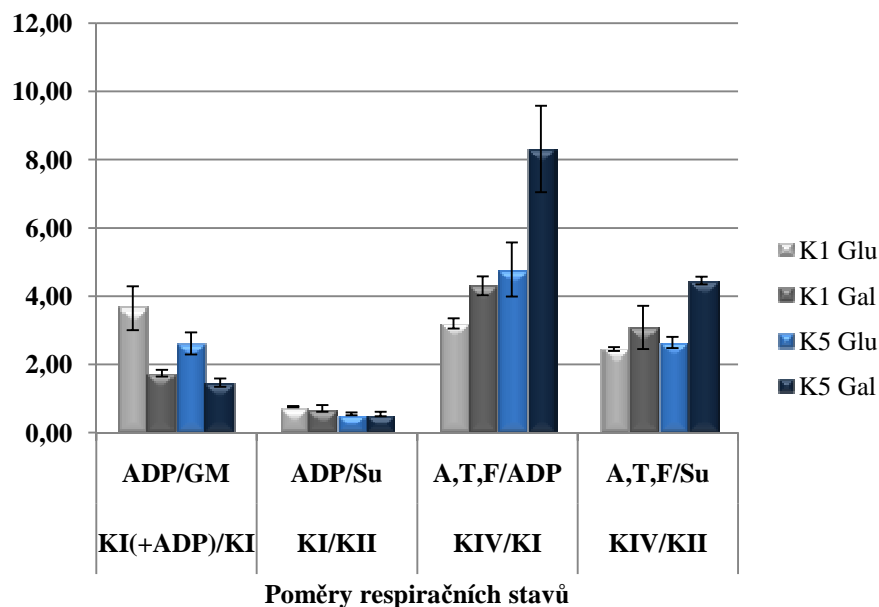
Vedle standardního média DMEM s 25mM glukózou byly jednotlivé linie lidských kožních fibroblastů kultivovány také v médiu DMEM s 25mM galaktózou a byl pozorován vliv podmínek kultivace na růst buněk (Obr. 30) a respiraci.

V médiu DMEM s glukózou (Glu) a zároveň v médiu DMEM s galaktózou (Gal) byly pěstovány nejprve kontrolní linie lidských kožních fibroblastů dětské kontroly (K1) a dospělé kontroly (K5), následně byla měřena jejich respirace po přidávání substrátů a inhibitorů jednotlivých komplexů systému OXPHOS na přístroji Oxygraph-2k. Výsledné naměřené hodnoty byly normalizovány na množství proteinu (přílohy 8.6) a zaznamenány do grafu (Obr. 28).



**Obr. 28. Spotřeba O<sub>2</sub> ve fibroblastech kontrolních linií dětí (K1) a dospělých (K5) kultivovaných v médiu DMEM s 25mM glukózou (Glu) nebo s 25mM galaktózou (Gal).** Výsledná respirace byla vztažena na množství proteinu (0,388–0,820 mg/ml). K1 Glu, K1 Gal–průměrná respirace kontrolní linie K1 dětského věku kultivované v médiu s 25mM glukózou nebo s 25mM galaktózou, K5 Glu, K5 Gal–průměrná respirace kontrolní linie K5 dospělého věku kultivované v médiu s 25mM glukózou nebo s 25mM galaktózou. V průběhu měření byly postupně přidávány detergent, substráty, inhibitory a rozpřahovač pro OXPHOS v následujícím pořadí: Dg, G, M, ADP, Rot, Su, CyC, AmA, A, T, F, Z. KI–komplex I, KII–komplex II, KIV–komplex IV, Dg–digitonin, G–glutamát, M–malát, Rot–rotenon, Su–sukcinát, CyC–cytochrom *c*, AmA–antimycin A, A–askorbát, T–TMPD, Z–azid. Výsledná hodnoty jsou vždy průměrem ze 2 měření.

Pro komplexnější pohled na respiraci byly vytvořeny poměry spotřeby O<sub>2</sub> (přílohy 8.6) jednotlivých komplexů systému OXPHOS u kontrolní linie dětí (K1) a dospělých (K5) pěstovaných v médiu DMEM s 25mM glukózou a v médiu DMEM s 25mM galaktózou, které byly vyneseny do grafu (Obr. 29).

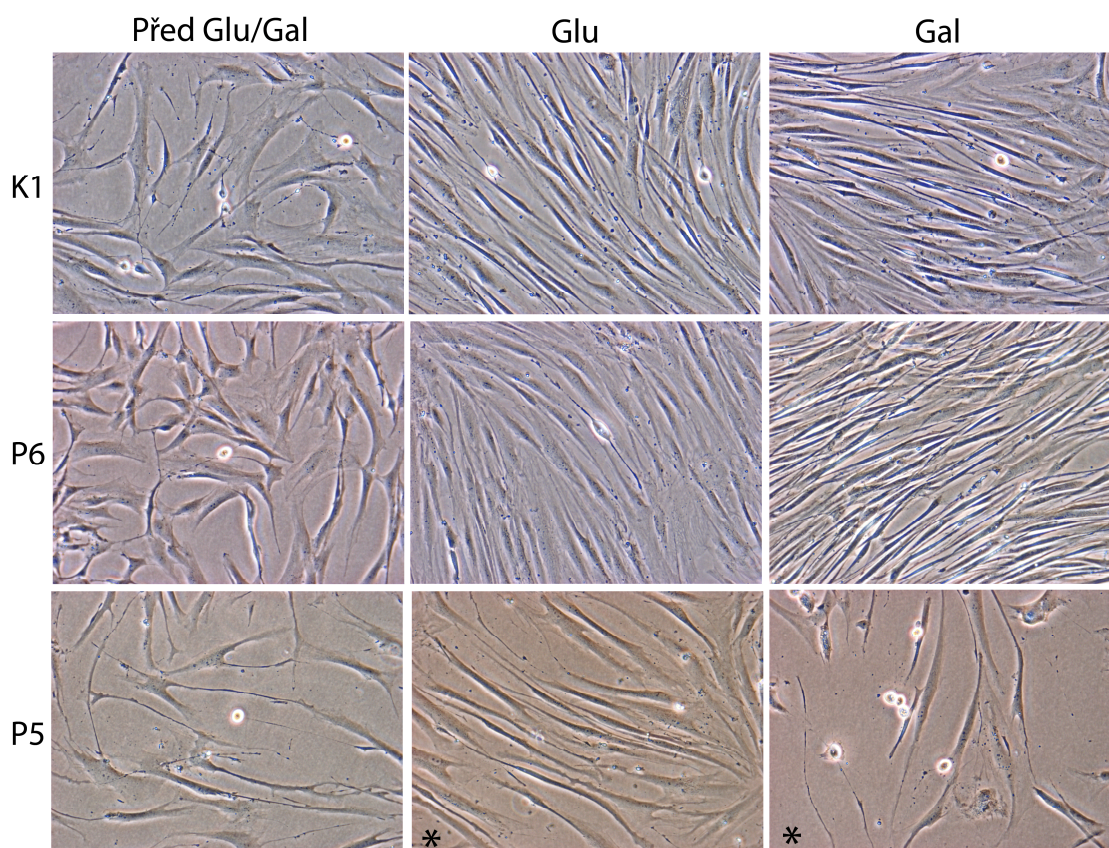


**Obr. 29. Poměry spotřeby  $O_2$  ve fibroblastech kontrolních linií dětí (K1) a dospělých (K5) kultivovaných v médiu DMEM s 25mM glukózou (Glu) nebo s 25mM galaktózou (Gal).** Výsledná respirace byla vztažena na množství proteinu (0,388–0,882 mg/ml). K1 Glu, K1 Gal–průměrná respirace kontrolní linie K1 dětského věku kultivované v médiu s 25mM glukózou nebo s 25mM galaktózou, K5 Glu, K5 Gal–průměrná respirace kontrolní linie K5 dospělého věku kultivované v médiu s 25mM glukózou nebo s 25mM galaktózou. V průběhu měření byly postupně přidávány detergent, substráty, inhibitory a rozpřahovač pro OXPHOS v následujícím pořadí: Dg, G, M, ADP, Rot, Su, CyC, AmA, A, T, F, Z. KI–komplex I, KII–komplex II, KIV–komplex IV, Dg–digitonin, G–glutamát, M–malát, Rot–rotenon, Su–sukcinát, CyC–cytochrom *c*, AmA–antimycin A, A–askorbát, T–TMPD, Z–azid. Výsledná hodnota jsou vždy průměrem ze 2 měření.

Grafu výsledné spotřeby  $O_2$  (Obr. 28) kontrolních linií dětí (K1) a dospělých (K5) kultivovaných v médiu DMEM s 25mM glukózou (Glu) nebo s 25mM galaktózou (Gal) ukazuje odlišný trend respirace v jednotlivých typech média. Zatímco u kontroly K1 dochází při kultivaci v médiu DMEM s galaktózou k poklesu respirace po přidání substrátů jednotlivých komplexů OXPHOS v porovnání s kultivací v médiu DMEM s glukózou. U kontroly K5 dochází při kultivaci v médiu DMEM s galaktózou po většině substrátů k nárůstu respirace v porovnání s kultivací k médiu DMEM s glukózou. Tyto rozdíly se však ztrácí při vytvoření poměrového grafu (Obr. 29), kde detekujeme stejné trendy poměrů respirace při kultivaci v odlišných podmínkách. Při kultivaci obou kontrolních linií v médiu DMEM s galaktózou dochází k poklesu poměrů KI(+ADP)/KI a k nárůstu poměrů KIV/KI a KIV/KII. Největší nárůst oproti kultivaci v médiu DMEM s glukózou, a to o 38%, je u podílu KIV/KI kontrolní linie K5 pěstované v médiu DMEM s galaktózou.

#### 4.5.2 Kultivace linií pacientů v médiu DMEM s glukózou a galaktózou

Stejně jako kontrolní linie, byly i linie kožních fibroblastů pacientů s primárními mitochondriálními poruchami pěstovány vedle standardního média DMEM s 25mM glukózou v médiu DMEM s 25mM galaktózou a byl pozorován vliv podmínek kultivace na růst buněk (Obr. 30) a respiraci.

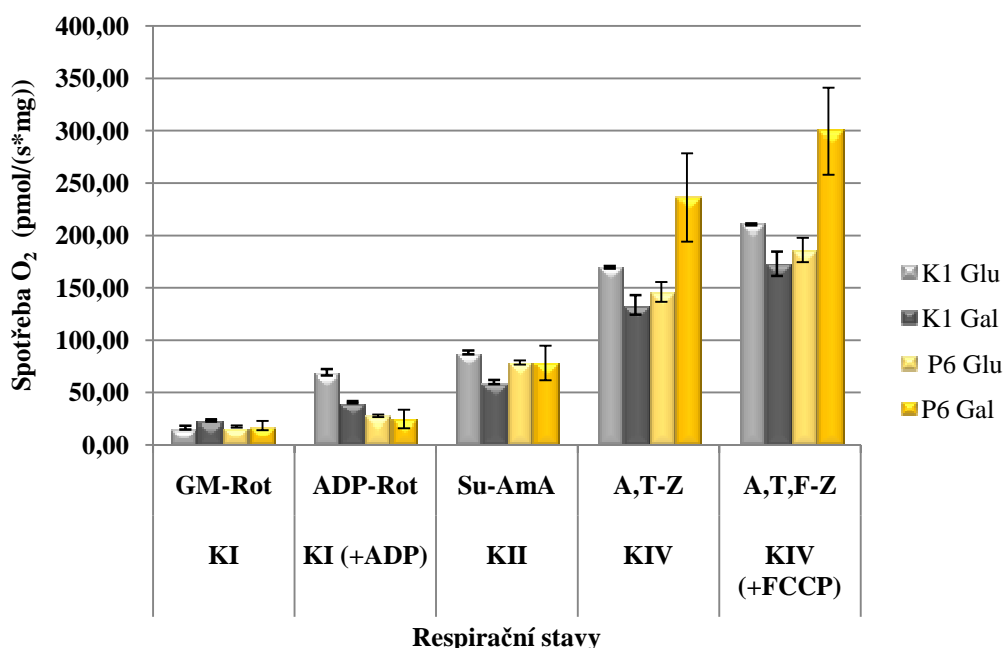


**Obr. 30. Kontrola růstu fibroblastů od pacientů a kontrol kultivovaných v médiu DMEM s 25mM glukózou (Glu) nebo s 25mM galaktózou (Gal) před měřením spotřeby kyslíku.** Jednotlivé buněčné linie byly kultivovány po dobu 5, případně 3(\*) dnů, v příslušném médiu a následně snímány CCD kamerou DP50. Kontrolní buněčná linie dětského věku K1 byla kultivována do přibližné konfluency 75% v médiu DMEM s glukózou (K1 před Glu/Gal) a pak následně po dobu 5 dnů v médiu DMEM s glukózou (K1 Glu) nebo s galaktózou (K1 Gal). Buněčná linie pacienta s primární mitochondriální poruchou komplexu I (mutací v *ND1*) P6 byla kultivována do přibližné konfluency 75% v médiu DMEM s glukózou (P6 před Glu/Gal) a pak následně po dobu 5 dnů v médiu DMEM s glukózou (P6 Glu) nebo s galaktózou (P6 Gal). Buněčná linie pacienta s primární mitochondriální poruchou komplexu IV (mutací v *SURF1*) P5 byla kultivována do přibližné konfluency 75% v médiu DMEM s glukózou (P5 před Glu/Gal) a pak následně po dobu 3 dnů (\*) v médiu DMEM s glukózou (P5 Glu) nebo s galaktózou (P5 Gal). Zvětšení: 200x.

V médiu DMEM s glukózou (Glu) a zároveň v médiu DMEM s galaktózou (Gal) byly pěstovány nejprve linie lidských kožních fibroblastů pacienta (P5) s poruchou komplexu IV

(mutací v *SURF1*). Během kultivace v médiu DMEM s galaktózou došlo u této linie po 3 dnech k odumírání buněk (Obr. 30), proto nebylo možné změřit jejich respiraci.

Následně byla v médiu DMEM s 25mM glukózou (Glu) nebo s 25mM galaktózou (Gal) pěstována linie lidských kožních fibroblastů pacienta P6 (Obr. 31) s poruchou komplexu I (mutací *NDI*). Následně byla měřena jejich respirace po přidávání substrátů a inhibitorů jednotlivých komplexů systému OXPHOS na přístroji Oxygraph-2k. Výsledné naměřené hodnoty byly normalizovány na množství proteinu (přílohy 8.7) a zaznamenány do grafu (Obr. 31).

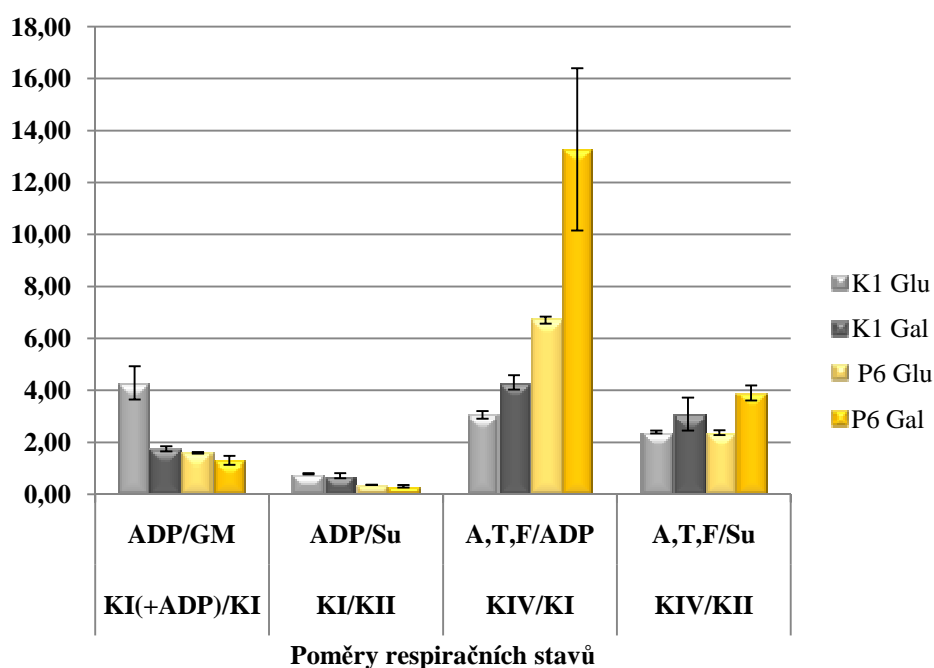


**Obr. 31. Spotřeba O<sub>2</sub> ve fibroblastech pacienta (P6) s poruchou komplexu I dýchacího řetězce a kontroly (K1) kultivovaných v médiu DMEM s 25mM glukózou (Glu) nebo s 25mM galaktózou (Gal).** Výsledná respirace byla vztažena na množství proteinu (0,388–0,820 mg/ml). K1 Glu, K1 Gal–průměrná respirace kontrolní linie K1 dětského věku kultivované v médiu s 25mM glukózou nebo s 25mM galaktózou, P6 Glu, P6 Gal–průměrná respirace linie pacienta s poruchou komplexu I (mutací v *NDI*) kultivované v médiu s 25mM glukózou nebo s 25mM galaktózou. V průběhu měření byly postupně přidávány detergent, substráty, inhibitory a rozpáhovač pro OXPHOS v následujícím pořadí: Dg, G, M, ADP, Rot, Su, CyC, AmA, A, T, F, Z. KI–komplex I, KII–komplex II, KIV–komplex IV, Dg–digitonin, G–glutamát, M–malát, Rot–rotenon, Su–sukcinát, CyC–cytochrom *c*, AmA–antimycin A, A–askorbát, T–TMPD, Z–azid. Výsledná hodnoty jsou vždy průměrem ze 2 měření.

Pro komplexnější pohled na respiraci byly vytvořeny poměry spotřeby O<sub>2</sub> (přílohy 8.7) jednotlivých komplexů systému OXPHOS linie pacienta P6 (s poruchou komplexu I, mutací



*NDI*) a kontrolní linie dětského věku (K1) pěstovaných v médiu DMEM s 25mM glukózou nebo s 25mM galaktózou, které byly vyneseny do grafu (Obr. 32).



**Obr. 32. Poměry spotřeby  $O_2$  ve fibroblastech pacienta (P6) a kontrolní linie dětského věku (K1) kultivovaných v médiu DMEM s 25mM glukózou (Glu) nebo v médiu DMEM s 25mM galaktózou (Gal).** Výsledná respirace byla vztažena na množství proteinu (0,388–0,820 mg/ml). K1 Glu, K1 Gal–průměrná respirace kontrolní linie K1 dětského věku kultivované v médiu s 25mM glukózou nebo s 25mM galaktózou, P6 Glu, P6 Gal–průměrná respirace linie pacienta s poruchou komplexu I (mutací v *NDI*) kultivované v médiu s 25mM glukózou nebo s 25mM galaktózou. V průběhu měření byly postupně přidávány detergent, substráty, inhibitory a rozpřahovač pro OXPHOS v následujícím pořadí: Dg, G, M, ADP, Rot, Su, CyC, AmA, A, T, F, Z. KI–komplex I, KII–komplex II, KIV–komplex IV, Dg–digitonin, G–glutamát, M–malát, Rot–rotenon, Su–sukcinát, CyC–cytochrom *c*, AmA–antimycin A, A–askorbát, T–TMPD, Z–azid. Výsledná hodnoty jsou vždy průměrem ze 2 měření.

V průběhu kultivace v různých médiích a i před samotným měřením jsme vizuálně kontrolovali kvalitu a množství buněk. Behem pěstování jednotlivých linií jsme pozorovali u kontrolní linie dětského věku K1 a linie pacienta P6 s poruchou komplexu I podobný růst při kultivaci v médiu DMEM s 25mM glukózou i v médiu DMEM s 25mM galaktózou.

U linie pacienta P5 s poruchou komplexu IV (mutací v *SURF1*) došlo při pěstování v médiu DMEM s galaktózou k výraznému zpomalení růstu a po třech dnech dokonce k odumírání buněk (Obr. 30). Proto nebylo možné zrealizovat měření respirace u této linie po kultivaci v médiu s galaktózou.

Při kultivaci fibroblastů pacienta P6 s poruchou komplexu I v médiu DMEM s galaktózou došlo k výraznému nárůstu respirace po přidání substrátů komplexu IV (askorbátu a TMPD), zatímco u kontrolní linie K1 došlo k poklesu respirace po přidání těchto substrátů (Obr. 31). Stejný projev jsme pozorovali i u respirace patientské linie P10 s neznámým defektem (data neuvedena).

U poměrů respirace jednotlivých komplexů systému OXPHOS (Obr. 32) došlo k velice výraznému nárůstu průměrné hodnoty poměru respirace KIV/KI, a to o 38% u patientské linie P6 pěstované v médiu DMEM s galaktózou v porovnání s kultivací stejné linie v médiu DMEM s glukózou.

#### **4.6 Aktivita komplexů dýchacího řetězce**

Pro doplnění celkového obrazu, a pro porovnání s výsledky polarografických měření, byla pracovníky Laboratoře pro studium mitochondriálních poruch pomocí spektrofotometrie změřena aktivita enzymů dýchacího řetězce. Měření byla provedena ve fibroblastech pacientů (P1-P10) s primárními poruchami mitochondrií, pacientů s HD a pacientů s poruchami metabolismu sirných aminokyselin a porovnána s kontrolními hodnotami (přílohy 8.8).

U všech 4 pacientů s poruchou komplexu IV způsobenou mutací v genu *SURF1* bylo ve fibroblastech zaznamenáno výrazné snížení aktivity komplexu KIV, u pacienta s poruchou KIV způsobenou mutací v genu *SCO2* nebyl pozorován pokles aktivity tohoto komplexu pod kontrolní hodnoty. U pacientů s poruchou komplexu I způsobenou mutací genu *ND1* jsme detekovali pokles aktivity KI+KIII, ale u pacienta s poruchou KI v důsledku mutace genu *ND5* nebyl pozorován pokles aktivity žádného z enzymů.

4 z 8 pacientů s HD měli sníženou aktivitu komplexu II a 3 z pacientů měli sníženou aktivitu KIV pod kontrolní mez. Pouze u 1 pacienta ze 6 s poruchou metabolismu sirných aminokyselin, byla snížena aktivita enzymů dýchacího řetězce. U pacienta P19 jsme detekovali sníženou aktivitu KIII, KIV a CS.

## 5 Diskuse

Spektrum mitochondriálních poruch zahrnuje širokou škálu různých projevů, které se nemusí manifestovat stejnou měrou ve všech tkáních. Nejvýraznější projevy poruch bývají u tkání s vysokou energetickou náročností (svaly, srdce či mozek). Na rozdíl od toho, v periferních tkáních, jako jsou kožní fibroblasty, se mitochondriálních poruchy nemusí vždy zcela projevit. Kožní fibroblasty jsou i přesto, z důvodu snadné dostupnosti a kultivace, vhodným modelem pro studium mitochondriálních poruch. Cílem této práce bylo identifikovat poruchy OXPHOS právě na úrovni kultivovaných lidských kožních fibroblastů.

Studie byly provedeny na kožních fibroblastech 6 kontrolních linií a 24 linií získaných od pacientů s podezřením na primární nebo sekundární defekty mitochondrií, na základě informovaného souhlasu. V kultivovaných fibroblastech byly pomocí vysoce citlivé polarografie a dalších biochemických metod analyzovány projevy primárních defektů na funkci OXPHOS.

### 5.1 Vliv doby kultivace a věku osoby v době odběru fibroblastů na respiraci

Primární buňky pěstované v kultuře neproliferují věčně, po období rychlého růstu u nich dochází ke zpomalení dělení, které nakonec zcela ustane (Hayflick 1965). Stárnutí buněk je spojováno se změnami v genové expresi, morfologii buněk (Endt et al. 2011), se zkracováním telomer (Yang 2008) a narušením mitochondriálních funkcí (Van Remmen & Richardson 2001). Pasáž, ve které se projevují změny spojené se senescencí se mohou lišit u jednotlivých typů tkání a druhů.

U lidských kožních fibroblastů se většinou uvádí, že buňky ztrácí část svých vlastností po 15. pasáži a ideální je u nich provádět pokusy v rozmezí pasáží 3-12, kdy jsou jednotlivé jejich vlastnosti zachovány (Moulin VJ 2011). Tomu odpovídají naše zjištění, kdy jsme u kontrolní linie kožních fibroblastů K1 kultivovaných v médiu DMEM s glukózou pozorovali snížení respirace po přidání substrátů všech komplexů OXPHOS po pasáži 18, zatímco respirace po přidání jednotlivých subtrátů byla velice podobná u pasáže 5 a 11.

Vliv senescence buněk se tedy odráží poklesem respirace, která je zřejmě způsobena narůstajícím oxidativním stresem. Mitochondriální dýchací řetězec je jedním z hlavních míst produkce ROS, proto mohou být mitochondrie prvním místem kde dochází k oxidativnímu poškození. Bylo prokázáno, že nárůst oxidativního stresu, spojený se strárnutím buněk, vede

k poškození mitochondriálních proteinů, lipidů a DNA, což se projevuje poklesem aktivity a respirace jednotlivých komplexů OXPHOS. Stárnutí buněk vede také ke zvýšené indukci apoptózy (Van Remmen & Richardson 2001).

Kožní fibroblasty našli své nezastupitelné místo v diagnostice mnoha metabolických onemocnění. Proto je pro nás velmi důležité co nejlépe charakterizovat jejich fyziologické vlastnosti. V posledních letech bylo provedeno mnoho studií, které se zaměřily na to, jak jsou ovlivněny funkce OXPHOS kožních fibroblastů věkem osoby, které byly odebrány. Greco s kolegy například zjistili, že u fibroblastů odebraných jedincům nad 40 let dochází ke zhoršení mitochondriálních procesů jako jsou syntéza bílkovin, spřažení oxidace a fosforylace a také k poklesu respirace. Autoři předpokládají, že za defekty OXPHOS u starších jedinců je zřejmě zodpovědný narůstající oxidativní stres (Greco et al. 2003).

U mitochondrií izolovaných z různých druhů a tkání byla v souvislosti s rostoucím věkem jedince pozorovaná snížená respirace a aktivita OXPHOS, která nejvíce postihla komplexy I, III a IV, zatímco u komplexu II nebyly pozorovány téměř žádné změny. To by mohlo souviset s tím, že komplex II jako jediný z komplexů OXPHOS neobsahuje žádné podjednotky kódované mtDNA, jejichž funkce by mohla být narušena v souvislosti s mutacemi mtDNA vznikajícími vlivem narůstajícího množství ROS (Van Remmen & Richardson 2001).

V průběhu našich měření byla také pozorována nižší respirace u kontrolních fibroblastů dospělých (ve věku 29-30 let) v porovnání s respirací fibroblastů kontrolního souboru dětí (ve věku 0-1 rok), a to na úrovni komplexů I, II a V. Z důvodu nedostatku fibroblastů kontrolních linií od jedinců starších než 30 let však nemůžeme vyloučit, že s vyšším věkem osob by mohlo dojít k výraznějšímu poklesu respirace, která by byla patrná i na úrovni ostatních komplexů. Pro eliminaci změn respirace vlivem věku jsme se rozhodli, že pro následná porovnání respirace fibroblastů pacientů je potřebné vždy použít fibroblasty od kontrolní skupiny odpovídajícího věku.

## **5.2 Identifikace poruch OXPHOS pomocí vysoce citlivé polarografie na úrovni kultivovaných fibroblastů**

Mitochondriální respirace je jednou z klíčových součástí buněčné fyziologie. U pacientů s porušenou funkcí OXPHOS dochází k narušení přenosu elektronů přes postižené komplexy dýchacího řetězce nebo narušení syntézy ATP. Tyto defekty se následně projevují mimo jiné i změnou mitochondriální spotřeby  $O_2$ , která je detekovatelná pomocí vysoce

citlivé polarografie. Respirometrická měření se většinou provádí na izolovaných mitochondriích nebo svalových vláknech (Gnaiger 2009). Naší snahou bylo pomocí této metody identifikovat poruchy OXPHOS u permabilizovaných kožních fibroblastů pacientů s primárními (P1-P10) a sekundárními (P11-P24) defekty mitochondrií.

### 5.2.1 Pacienti s primárními mitochondriálními poruchami

U pacientů s primárními defekty OXPHOS známého původu (geneticky prokázaného defektu) jsme zaznamenali změny mitochondriální respirace, které odpovídaly mutacím ovlivňující funkci daného komplexu.

U pacientů s poruchou IV. komplexu způsobenou mutací v genu *SCO2* (P1) nebo *SURF1* (P2-P5) byla pozorována snížená ADP stimulovaná respirace, a to o 54-77% v porovnání s průměrnou hodnotou respirace kontrolních linií. A také výrazně snížená respirace (o 23-99,7%) po přidavku substrátů IV. komplexu. Obdobné změny respirace po přidavku ADP a substrátů IV. komplexu již byly u kultivovaných kožních fibroblastů pacientů s mutací *SURF1* pozorovány (Pecina, Čapková, et al. 2003). *SCO2* a *SURF1* jsou geny, které kódují asemblační faktory IV. komplexu, na kterém dochází k přenosu elektronů na finální akceptor  $O_2$ . Mutací těchto genů dochází k narušení správného sestavení a následně i funkce IV. komplexu, což se evidentně projevuje i na spotřebě  $O_2$ .

Pacienti s poruchou I. komplexu způsobenou mutací v genu *ND1* (P6) nebo *ND5* (P7) vykazovali výrazně sníženou respiraci pouze po přidání substrátů I. komplexu a ADP. To odpovídá výsledkům respirace u cybridů pacientů s nejčastějšími mutacemi komplexu I (*ND1*, *ND4* a *ND5*), kde byla naměřena snížená respirace po přidání substrátů I. komplexu a ADP, zatímco respirace po přidavku substrátu II. komplexu nebyla nijak ovlivněna (Baracca et al. 2005). *ND1* a *ND5* jsou mtDNA geny, které kódují podjednotky komplexu I, jejichž mutace způsobuje narušení funkce tohoto komplexu. U našich pacientů s mutacemi I. komplexu nebylo pozorováno ovlivnění respirace dalších komplexů OXPHOS, což může být způsobeno tím, že komplex I není jediným komplexem, který přijímá elektrony z redukovaných koenzymů. Elektrony mohou být i při narušení funkce I. komplexu přenášeny z  $FADH_2$  prostřednictvím komplexu II až na komplex IV a poté na  $O_2$ .

U pacientů P8-P10 s doposud neobjasněnými defekty OXPHOS jsme detekovali sníženou respiraci po přidavku substrátů pro různé komplexy: u pacienta P8 po substrátech pro komplexy II a IV, u pacienta P9 pro komplex I a po přidání ADP a u pacienta P10 byla snížená respirace po přidavku substrátů všech analyzovaných komplexů. Tato zjištění

by mohla poukazovat na kombinované defekty více komplexů OXPHOS u pacientů P8 a P10. Zatímco u pacienta P9 by mohly znamenat defekt na úrovni komplexu I. Pro přesnější určení jednotlivých defektů jsou potřebné další analýzy.

### 5.2.2 Korelace výsledků získaných ve fibroblastech s nálezy ze svalové tkáně

U jednotlivých linií pacientů s primárními mitochondriálními defekty byly pracovníky Laboratoře pro studium mitochondriálních poruch provedeny analýzy funkcí OXPHOS ve svalové tkáni a ve fibroblastech. Tyto poznatky byly porovnány (Tab 9.) s nově získanými respirometrickými nálezy.

Výsledky získané pomocí respirometrie u pacientů P1-P4 s narušenou funkcí komplexu IV, v důsledku mutace genu *SCO2* nebo *SURF1*, odpovídají nálezům ve svalové tkáni a ostatním analýzám ve fibroblastech. Ve všech případech byly detekovány změny na úrovni komplexu IV.

Výsledky respirometrie pacienta P5 s mutací genu *SURF1*, který má také porušenou funkci a snížené množství komplexu IV, ale příliš neodpovídají nálezům ve svalu. Vysoce citlivou polarografií byla zjištěna snížená respirace ve fibroblastech tohoto pacienta po přidání substrátů KIV pouze na 77% kontrolní hodnoty, zatímco aktivita komplexu IV byla ve fibroblastech snížena pod 40%, a ve svalech dokonce pod 15%. Tato odlišnost může souviset s tkáňově specifickým projevem mutace genu *SURF1* (Stiburek et al. 2005). Ve fibroblastech pacienta s takovouto mutací proto nemusíme detekovat výrazný pokles respirace, ten by však mohl být patrný ve svalové tkáni. Rozdíl v aktivitě komplexu IV s defektem *SURF1* a respirací ve fibroblastech by mohl být způsoben různou citlivostí buněk pacientů k detergentům nebo tím, že při měření aktivity enzymů jsou překročena fyziologická množství substrátů (Pecina, Capková, et al. 2003) .

U pacientů P6 a P7 byla ve fibroblastech pomocí respirometrie úspěšně detekována porušená funkce komplexu I, i přesto, že u pacienta P6 nebyly ve svalové tkáni pozorovány žádné patologické změny, a to ani pomocí respirometrie. Rozdíly mohou být způsobeny různou mírou heteroplasmie v jednotlivých tkáních či populaci buněk (Carelli et al. 1997).

Respirometrické nálezy u pacientů s neznámými primárními defekty OXPHOS přispěly k lepší charakterizaci jejich onemocnění, kdy potvrdily nálezy ve svalech. U všech těchto třech pacientů bylo vyjádřeno podezření na kombinované defekty více komplexů zároveň.

**Tab 9. : Porovnání funkcí OXPHOS ve svalové tkáni a ve fibroblastech pacientů s primárními mitochondriálními defekty**

Pacient	Mutovaný gen	Nálezy ve svalové tkáni	Nálezy ve fibroblastech	Respirometrické nálezy ve fibroblastech
P1	SCO2	↓↓↓ aktivita a množství KIV, ↓ aktivita KI	↓ aktivita a množství KIV	respirace po přidání substrátů: ↓↓ KI + ADP, ↓↓ KII a ↓↓ KIV
P2	SURF1	↓↓↓ aktivita KIV, ↓↓↓ množství KIV	↓↓↓ aktivita KIV	respirace po přidání substrátů: ↓↓ KI a KI + ADP, ↓↓↓ KII a ↓↓↓ KIV
P3	SURF1	↓↓↓ aktivita KIV	↓↓↓ aktivita KIV	respirace po přidání substrátů: ↓↓ KI + ADP, ↓↓ KII a ↓↓ KIV
P4	SURF1	↓↓↓ aktivita KIV a ↓↓↓ množství KIV	↓↓↓ aktivita KIV	snížená respirace po přidání substrátů: ↓↓ KI, ↓↓↓ KI a ADP, ↓↓↓ KII a ↓↓↓ KIV
P5	SURF1	↓↓↓ aktivity i množství KI a KIV, polarografie: ↓↓ respirace po přidání ADP, substrátů KI a KI a výrazná aktivace po přidání FCCP	↓↓↓ aktivita KIV	respirace po přidání substrátů: ↓↓↓ KI, ↓↓↓ KI + a ADP, ↓↓↓ KII a ↓ KIV
P6	ND1	ve svalu bez patologického nálezu (i polarografie)	↓↓↓ množství KI + KIII	respirace po přidání substrátů: ↓↓ KI + ADP
P7	ND5	↓↓↓ množství a ↓↓ aktivita KI a KI + KIII	↓↓ množství KI, ↓↓↓ množství KIV	pokles respirace po přidání substrátů: ↓↓ KI + ADP
P8	neznámý	↓ množství KIV	↓↓↓ aktivita KIV	respirace po přidání substrátů: ↓ KI + ADP, ↓↓ KII a ↓↓ KIV, velmi malá aktivace po přidání FCCP
P9	neznámý	↓↓ množství a ↓↓ aktivita KIV, KI+KIII	↓ snížené množství KIV	respirace po přidání substrátů: ↓↓ KI, ↓↓ KI + ADP, ↑↑nárůst po přidání substrátů KIV
P10	neznámý	↓ aktivita KI, KIII, KI-KIII a KIV, polarografie: minimální respiraci po všech substrátech a žádná aktivace po přidání FCCP	↓ množství KI a KIV	respirace po přidání substrátů: ↓↓ KI, ↓↓ KI + ADP, ↓↓KII a ↓↓↓ KIV, velmi malá aktivace po přidání FCCP

↓↓↓ pokles na 0-35%, ↓↓ pokles na 36-70%, ↓ pokles na 71-100%, ↑ nárůst na 101-135% kontrolní hodnoty

## 5.2.3 Analýza fibroblastů pacientů se sekundárními mitochondriálními dysfunkcemi

### 5.2.3.1 Pacienti s Huntingtonovou chorobou

Výzkum Huntingtonovy choroby se provádí na různých liniích od člověka i modelových organismů. U pacientů s HD byly pozorovány sekundární změny mitochondriálních funkcí nejen v mozkové tkáni, ale i v periferních tkáních, například v trombocytech (Parker et al. 1990) či fibroblastech (Kosinski et al. 2007).

Bylo prokázáno, že mutovaný Htt ovlivňuje mitochondriální respiraci a produkci ATP (Milakovic & Johnson 2005). U linií immortalizovaných striatálních progenitorových buněk kontrolních myší a homozygotních linií exprimovaných mutovaný Htt však byla i při změně respirace zachována aktivita jednotlivých komplexů OXPHOS. Po přidání substrátů komplexů I a II bylo pozorováno snížení respirace u linií s mutovanými Htt, zatímco po přidání substrátů komplexu IV nebyly pozorovány žádné rozdíly v respiraci jednotlivých linií, ani v celkové hladině buněčného ATP (Milakovic & Johnson 2005). Pacienti s HD, kteří mají mutované obě alely jsou ale velice vzácní (Squitieri et al. 2003). Další analýzy provedené na striatálních neuronech, tentokrát heterozygotních myší produkujících mutovaný Htt, neodhalily dokonce žádné výrazné změny mitochondriální respirace (Oliveira et al. 2007).

Tyto poznatky jsou v rozporu s naším zjištěním, kdy jsme u lidských kožních fibroblastů 8 pacientů s heterozygotní mutací v genu pro Htt pozorovali pokles respirace po přidání substrátů komplexů I a II, ale zároveň i poměrně výrazný pokles respirace po přidání substrátů IV. komplexu.

Naše výsledky korelují s dosavadními poznatky o patogenezi HD. Bylo prokázáno, že ve striatálních buňkách pacientů s HD dochází k narušení funkce II. komplexu, které je způsobeno sníženou expresí dvou důležitých součástí tohoto komplexu, a to Fe-S podjednotky (Ip) a FAD podjednotky (Fp) (Benchoua et al. 2006). V autoptické mozkové tkáni pacientů s HD byla kromě II. komplexu prokázána snížená aktivita III. a IV. komplexu OXPHOS, zatímco aktivita I. komplexu nebyla v této tkáni výrazně ovlivněna (Browne et al. 1997, Gu et al. 1996). Jiné studie však prokázaly, že v trombocytech (Parker et al. 1990) a svalech (Arenas et al. 1998) pacientů s HD může docházet i k defektům na úrovni komplexu I. Příčinou by mohly být již výše zmíněné vlivy mHtt například na transport proteinů do mitochondrií, zvýšený oxidativní stres, snížený membránový potenciál, pokles exprese proteinu PGC1 $\alpha$



nebo poškození mtDNA (Costa & Scorrano 2012). Nicméně analýz mitochondriálních funkcí v kožních fibroblastech pacientů s HD je zatím velmi málo.

### 5.2.3.2 Pacienti s poruchou metabolismu sirných aminokyselin

Jedním z metabolitů v syntéze sirných aminokyselin je homocystein, který je přeměňován pomocí dvou drah, a to homocystein-methioninového cyklu na methionin nebo transsulfurační reakcí až na cystein (Coşar et al. 2014). Obou těchto drah se účastí řada enzymů. Mutace genů některých z nich jsou spojovány s onemocněními jako homocystinurie (mutace v genu *MTHFR* nebo *CBS*) a cystathionurie (mutace v genu *CTH*). Během metabolismu homocysteinu vzniká  $H_2S$ , změny jeho hladin v důsledku mutací některého z výše zmíněných enzymů zřejmě mohou přispívat k patologii onemocnění (Sen et al. 2010).

Bylo zjištěno, že narušená funkce metabolismu sirných aminokyselin se projevuje abnormalitami mitochondriálních funkcí. U endoteliálních buněk krys, kterým byla prostřednictvím stravy navozena hyperhomocysteinémie, byly pozorovány deformované mitochondrie s nižším počtem krist (Matthias et al. 1996). V mozkové tkáni potkanů s chemicky navozenou hyperhomocysteinémií navíc byla pozorována snížená aktivita komplexu II a komplexu IV (Streck et al. 2003). Pokles aktivity komplexu IV je zřejmě důsledkem zvýšeného množství  $H_2S$ , který inhibuje hemy přítomné v tomto komplexu (Di Meo et al. 2011).

Naše analýzy zahrnovaly dvojici pacientů s homocystinurií způsobenou mutací genu *MTHFR*, dvojici pacientů s mutací v genu pro cystathionin  $\beta$ -syntázu (*CBS*) a dvojici pacientů s cystathionurií způsobenou mutací genu pro cystathionin  $\gamma$ -lyáza (*CTH*). U kožních fibroblastů 3 ze 4 pacientů s mutací v genu *CBS* nebo *CTH* byla pozorována výrazně zvýšená respirace po přidání substrátů IV. komplexu a mírně zvýšená respirace po přidání substrátů II. komplexu. Zatímco pouze u 1 ze 2 linií fibroblastů pacientů s mutací v genu *MTHFR* byla pozorována pouze mírně zvýšená respirace po přidání těchto substrátů v porovnání s kontrolními hodnotami. Pokud by stejně jako v mozkové tkáni potkanů (Streck et al. 2003) i ve fibroblastech našich pacientů byla snížená aktivita komplexů II a IV, mohl by nárůst respirace znamenat snahu kompenzovat sníženou funkci těchto komplexů. Spektrofotometrická měření však pokles aktivity komplexů OXPHOS potvrdila pouze u jednoho pacienta (P19). Mírné změny v respiraci fibroblastů pacientů s mutací v genu *MTHFR* by mohly být způsobeny tím, že tento enzym se účastní odlišné dráhy přeměny homocysteinu než enzymy CBS a CGL. Tím zřejmě může docházet k nadbytku nebo

nedostatku množství  $H_2S$  v jednotlivých drahách, což se může projevit odlišnou mírou inhibice komplexu IV.

Můžeme konstatovat, že pomocí vysoce citlivé polarografie lze úspěšně identifikovat změny funkce OXPHOS na úrovni kultivovaných lidských kožních fibroblastů, a to jak u pacientů s primárními, tak i sekundárními mitochondriálními defekty.

### **5.3 Změny na úrovni ultrastruktury mitochondrií a mitochondriálních sítí**

Pro charakterizaci mitochondriálních poruch je kromě analýzy funkce a proteinového složení významný popis ultrastruktury mitochondrií a mitochondriální sítě. U pacientů s mitochondriálními poruchami totiž často bývá ovlivněna struktura a množství mitochondrií nebo procesy jejich fúze či dělení, které můžeme analyzovat prostřednictvím různých metod. Pomocí dvou z nich, a to transmisní elektronové mikroskopie a fluorescenční mikroskopie jsme analyzovali ultrastrukturu mitochondrií a strukturu mitochondriální sítě kontrolních linií a linií pacientů s primárními mitochondriálními poruchami, pacientů s HD a pacientů s poruchami metabolismu sirných aminokyselin.

S využitím transmisní elektronové mikroskopie jsme analyzovali mitochondrie ve fibroblastech pacientů s primárními poruchami mitochondrií, kde byly detekovány abnormální mitochondrie, které měly snížené množství krist a odlišný tvar v porovnání s kontrolními liniemi dětského věku. Stejně nálezy byly pozorovány ve svalových vláknech pacientů s mutací *SURF1*, kde byly také nalezeny výrazně zvětšené nebo prodloužené mitochondrie s narušenou strukturou krist (Pronicki et al. 2008).

Také u fibroblastů pacientů se sekundárními mitochondriálními poruchami byly detekovány změny mitochondriální ultrastruktury v porovnání s kontrolními liniemi. U pacientů s HD zahrnovaly abnormality mitochondrií snížené množství krist nebo jejich zkrácenou délku. Což odpovídá studiím mitochondrií pacientů s HD, které měly pozměněný tvar, často byly zaoblené nebo zvětšené a měly narušenou strukturu krist (Kosinski et al. 2007, Sidiropoulos et al. 2012). V lymfoblastech HD pacientů byly také pozorovány výrazně fragmentované mitochondrie s pozměněnými kristami (Song et al. 2011).

U pacientů s poruchou metabolismu sirných aminokyselin jsme pozorovali široké spektrum změn s převahou nápadně prodloužených mitochondrií s kratšími kristami nebo téměř bez krist a přítomnost apoptotických tělísek. Naše pozorování odpovídají zjištěním

u pacientů s homocystinurií, kde byly detekovány zvětšené mitochondrie s nepravidelnou vnější membránou (Mack et al. 2001).

Narušení fyziologických procesů patientských mitochondrií má tedy zřejmě dopad také na ultrastrukturu mitochondrií, a to převážně na tvar mitochondrií, ale i na množství či tvar krist. Změny stuktury krist v mitochondriích pacientů zřejmě souvisí s poklesem funkce nebo množství proteinu Opa1, který je hlavním proteinem zodpovědným za organizaci vnitřní mitochondriální membrány, a tedy i krist (Olichon et al. 2003).

Mitochondrie jsou velmi dynamické struktury, které tvoří v buňce rozsáhlou síť. U zdravých buněk jsou mitochondrie rovnoměrně distribuovány v objemu celé buňky, a to díky rovnováze mezi mitochondriálním dělením a fúzí. Rovnoměrná distribuce mitochondrií v buňkách zajišťuje dostupnost energie (ATP). Narušený vzhled mitochondriální sítě proto může poukazovat na patologické změny buněk způsobené nerovnováhou mezi těmito procesy (Shaw & Nunnari 2002).

Pomocí fluorescenční mikroskopie a fluorescenční barvy MitoTracker Red (Molecular Probes) jsme analyzovali strukturu mitochondriální sítě ve fibroblastech pacientů s jednotlivými typy onemocnění a u kontrol. U pacientů s primárními poruchami mitochondrií jsme detekovali řidší, méně větvenou a výrazně fragmentovanou mitochondriální síť v porovnání s kontrolními liniemi. Což odpovídá nálezům u pacientů s poruchou komplexu I, kde byla také pozorována fragmentovaná mitochondriální síť (Koopman et al. 2005).

U pacientů s HD byla ve většině případů mitochondriální síť řidší, a to zřejmě v důsledku sníženého množství mitochondrií, a také výrazně prodloužených struktur, v porovnání s kontrolními liniemi. Což je poněkud v rozporu s tím, že ve striatálních neuronech pacientů s HD byly pozorovány, kromě sníženého množství mitochondrií, abnormality mitochondriální dynamiky projevující se naopak rozpadem mitochondriální sítě (Kim et al. 2010). Za rozpadem mitochondriální sítě zřejmě stojí zvýšená aktivita proteinu Drp1 (zodpovědného za dělení mitochondrií) a zároveň snížená aktivita proteinů vnější mitochondriální membrány mitofusinu-1 (Kim et al. 2010) a mitofusinu-2, které zprostředkovávají fúzi mitochondrií (Wang et al. 2009). Bylo prokázáno, že mHtt je schopen interagovat s proteinem Drp1, což stimuluje jeho aktivitu a vede k rozpadu mitochondriální sítě (Song et al. 2011). V případě našich pacientů mohla být nerovnáha v těchto procesech výrazně posunuta ve prospěch fúze, což se projevilo prodlouženou mitochondriální sítí

U pacientů s poruchou metabolismu sirných aminokyselin jsme detekovali mitochondriální síť výrazně řidší a fragmentovanou, což odpovídá tomu, že u pacientů s tímto onemocněním je narušena funkce mitochondrií. V dostupné literatuře zatím nebyla popsána obdobná pozorování mitochondriální sítě u těchto pacientů. U pacientů s mutací v genu MTHFR však byl detekován zvýšený výskyt MAMs, což by mohlo naznačovat, že v patologii onemocnění hraje určitou roli kontakt endoplazmatického retikula a mitochondrií (Martínez-Pizarro et al., 2014).

#### **5.4 Testování vlivu různých podmínek kultivace na funkci OXPHOS**

Kožní fibroblasty kultivované v médiu s vysokou koncentrací glukózy získávají ATP pro růst a metabolismus převážně prostřednictvím glykolýzy, kdy je glukóza anaerobně přeměňována na pyruvát a laktát. Při vyčerpání glukózy v médiu dochází u buněk k získávání energie oxidativní fosforylací (McKay et al. 1983). Tato dráha je v médiu s nadměrným množstvím glukózy blokována (Wojtczak 1996). Pro běžnou kultivaci kožních fibroblastů se většinou používá právě médium s vysokým obsahem glukózy (25mM), což vede u buněk k získávání energie hlavně prostřednictvím glykolýzy.

Bylo pozorováno, že buňky pacientů s narušeným mitochondriálním metabolismem, v důsledku poškozené funkce OXPHOS, při nepřítomnosti glukózy v médiu příliš neprospívají a některé dokonce umírají (McKay et al. 1983). Což bylo dříve využíváno k detekci pacientů s defekty OXPHOS. Při kultivaci fibroblastů od pacientů s některými typy poruch mitochondriálního metabolismu (například pacientů s poruchou IV. komplexu projevujícího se Leighovým syndromem) v médiu DMEM s galaktózou docházelo k odumírání buněk (Robinson 1996). Za těchto kultivačních podmínek jsme také u fibroblastů pacientů s poruchou IV. komplexu pozorovali výrazný pokles růstu, který byl po 3 dnech následován odumíráním buněk.

U různých buněčných typů byl při kultivaci v médiu s galaktózou pozorován výrazný nárůst množství (diplomová práce, Kedrová 2014), aktivity a respirace jednotlivých komplexů OXPHOS, což je zřejmě způsobeno tvorbou ATP výhradně prostřednictvím OXPHOS (Marroquin et al. 2007, Aguer et al. 2011). Ve snaze charakterizovat porušenou funkci OXPHOS u našich pacientů s primárními defekty mitochondrií jsme se rozhodli pro kultivaci jednotlivých linií fibroblastů kromě standardního média DMEM s 25mM glukózou, také v médiu DMEM s 25mM galaktózou, kde jsme u buněk očekávali prohloubení rozdílu

ve spotřebě O<sub>2</sub> mezi pacientem a kontrolou. Naše zjištění pro nás však byla velice překvapivá. U kontrolní linie pěstované v médiu s galaktózou jsme detekovali sníženou respiraci v porovnání s respirací při kultivaci v médiu obsahujícím glukózu. Zároveň jsme ale pozorovali výrazný nárůst respirace po přidání substrátů pro IV. komplex u fibroblastů pacienta (P6) s narušenou funkcí komplexu I (mutace v genu *NDI*) a u pacienta (P10) s neznámým defektem (data neuvedena) při kultivaci v médiu, kde byla glukóza nahrazena galaktózou.

Nenaplnění našich očekávání může být způsobeno tím, že poruchy způsobené mutací mtDNA, právě jako například mutace v genu *NDI*, nemusí být touto metodou detekovány (Robinson 1996). Dalším možným vysvětlením může být vysoká koncentrace galaktózy (25mM) použitá pro kultivaci buněk. Pro následná použití v diagnostice pacientů s porušenou funkcí OXPHOS je potřeba metodu ještě zoptimalizovat.

## 6 Souhrn

V diplomové práci byl na úrovni kultivovaných lidských kožních fibroblastů pomocí vysoce citlivé polarografie a dalších biochemických metod analyzován dopad porušené funkce OXPHOS u pacientů s primárními a sekundárními mitochondriálními poruchami.

- 1) Metoda vysoce citlivé polarografie byla optimalizována pro diagnostické účely ve fibroblastech. Na základě analýzy souboru kontrolních linií získaných od dětí ve věku do 1 roku (K1-K3) a dospělých ve věku do 30 let (K4-K6) byly zjištěny kontrolní hodnoty měřených parametrů pro analýzu pacientů s mitochondriálními defekty. Bylo prokázáno, že vyšší doba kultivace a věk osoby, které byly odebrány fibroblasty, má vliv na respiraci.
- 2) Pomocí vysoce citlivé polarografie byly charakterizovány poruchy OXPHOS v kultivovaných fibroblastech 10 pacientů s primárními mitochondriálními poruchami.
  - U pacientů s poruchou IV. komplexu způsobenou mutací genu *SCO2* nebo *SURF1* byla výrazně snížena spotřeba kyslíku po přidavku substrátů IV. komplexu a také snížena respirace s po přidání substrátů komplexu I a ADP. Nález potvrzuje funkční defekt komplexu IV ve fibroblastech v souladu s diagnózou.
  - U pacientů s poruchou I. komplexu způsobenou mutací genu *ND1* nebo *ND5* byla detekována snížena respirace pouze po přidání substrátů komplexu I a ADP. Nález potvrzuje ve fibroblastech funkční defekt komplexu I dýchacího řetězce v souladu s diagnózou. U P6 s mutací v *ND1* byl prokázán tkáňově specifický defekt exprimovaný ve fibroblastech a ve svalu.
  - U 3 pacientů s doposud neobjasněnými defekty OXPHOS byla zjištěna snížena respirace po přidavku substrátů různých komplexů OXPHOS, svědčící u pacienta P8 pro sníženou funkci komplexu II a IV, u pacienta P9 I. komplexu a u pacienta P10 pro kombinovaný deficit OXPHOS.
- 3) Pomocí vysoce citlivé polarografie byly nalezeny sekundární poruchy OXPHOS v kultivovaných fibroblastech pacientů s nemitochondriálními onemocněními.

- V souboru 8 pacientů s Huntingtonovou chorobou byla naměřena snížená respirace po přidání substrátů komplexů I, II a IV.
  - U pacientů s poruchou metabolismu sirných aminokyselin byla u 3 ze 4 pacientů s mutací genu pro CBS nebo CGL pozorována výrazně zvýšená respirace po přidání substrátů IV. komplexu a mírně zvýšená respirace po přidání substrátů II. komplexu a pouze u 1 ze 2 pacientů s mutací v genu *MTHFR* byla pozorovaná mírně zvýšená respirace po přidání těchto substrátů.
- 4) U všech testovaných skupin pacientů byly pomocí transmisní elektronové a fluorescenční mikroskopie nalezeny patologické změny ultrastruktury mitochondrií a mitochondriálních sítí. Nejvýraznější nálezy byly u pacientů s primárními defekty komplexu IV, které se projevíly sníženým množstvím krist a fragmentací mitochondriální sítě.
- 5) U pacientů s primárními mitochondriálními poruchami byl testován dopad přítomnosti různých živin v průběhu kultivace na míru spotřeby kyslíku. U linie s poruchou ND1 se nepodařilo prokázat předpoklad, že kultivace v přítomnosti galaktózy povede k výraznějšímu rozdílu v respiraci ve srovnání s růstem v médiu s glukózou oproti kontrolní linii (z důvodu nedostatečné funkce OXPHOS). Pro tento typ analýz bude třeba hledat jiné kultivační podmínky.

Závěrem lze konstatovat, že metoda vysoce citlivé polarografie byla s úspěchem aplikována na analýzu funkce OXPHOS v kultivovaných fibroblastech. Rozšíří tak paletu metod, využívaných k diagnostice mitochondriálních onemocnění se zvláštním významem pro případy tkáňově specifických mitochondriálních defektů a pro kriticky nemocné pacienty.

## 7 Seznam použité literatury

- Aguer, C. et al., 2011. Galactose enhances oxidative metabolism and reveals mitochondrial dysfunction in human primary muscle cells. *PLoS one*, 6(12), s.e28536.
- Amchenkova, A.A. et al., 1988. Coupling membranes as energy-transmitting cables. I. Filamentous mitochondria in fibroblasts and mitochondrial clusters in cardiomyocytes. *The Journal of cell biology*, 107(2), s.481–95.
- Anderson, S. et al., 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290(5806), s.457–65.
- Antonicka, H., Leary, S.C., et al., 2003. Mutations in COX10 result in a defect in mitochondrial heme A biosynthesis and account for multiple, early-onset clinical phenotypes associated with isolated COX deficiency. *Human molecular genetics*, 12(20), s.2693–702.
- Antonicka, H., Mattman, A., et al., 2003. Mutations in COX15 produce a defect in the mitochondrial heme biosynthetic pathway, causing early-onset fatal hypertrophic cardiomyopathy. *American journal of human genetics*, 72(1), s.101–14.
- Arenas, J. et al., 1998. Complex I defect in muscle from patients with Huntington's disease. *Annals of neurology*, 43(3), s.397–400.
- Baracca, A. et al., 2005. Severe impairment of complex I-driven adenosine triphosphate synthesis in leber hereditary optic neuropathy cybrids. *Archives of neurology*, 62(5), s.730–6.
- Baradaran, R. et al., 2013. Crystal structure of the entire respiratory complex I. *Nature*, 494(7438), s.443–8.
- Barić, I., 2009. Inherited disorders in the conversion of methionine to homocysteine. *Journal of inherited metabolic disease*, 32(4), s.459–71.
- Barron, L.H. et al., 1993. A study of the Huntington's disease associated trinucleotide repeat in the Scottish population. *Journal of medical genetics*, 30(12), s.1003–7.
- Bates, G.P., 2005. History of genetic disease: the molecular genetics of Huntington disease - a history. *Nature reviews. Genetics*, 6(10), s.766–73.
- Benchoua, A. et al., 2006. Involvement of mitochondrial complex II defects in neuronal death produced by N-terminus fragment of mutated huntingtin. *Molecular biology of the cell*, 17(4), s.1652–63.
- Bianchi, C. et al., 2004. The mitochondrial respiratory chain is partially organized in a supercomplex assembly: kinetic evidence using flux control analysis. *The Journal of biological chemistry*, 279(35), s.36562–9.
- Bittles, A.H. & Carson, N.A., 1974. Cystathionase deficiency in fibroblast cultures from a patient with primary cystathioninuria. *Journal of medical genetics*, 11(2), s.121–2.
- Boyer, P.D., 1997. The ATP synthase--a splendid molecular machine. *Annual review of biochemistry*, 66, s.717–49.



- Brandt, U., 2006. Energy converting NADH:quinone oxidoreductase (complex I). *Annual review of biochemistry*, 75, s.69–92.
- Brenner, D. & Mak, T.W., 2009. Mitochondrial cell death effectors. *Current opinion in cell biology*, 21(6), s.871–7.
- Brosnan, J.T. & Brosnan, M.E., 2006. The sulfur-containing amino acids: an overview. *The Journal of nutrition*, 136(6 Suppl), s.1636S–1640S.
- Browne, S.E. et al., 1997. Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia. *Annals of neurology*, 41(5), s.646–53.
- Brzezinski, P. & Gennis, R.B., 2008. Cytochrome c oxidase: exciting progress and remaining mysteries. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 40(5), s.521–31.
- Carelli, V. et al., 1997. Leber's hereditary optic neuropathy: biochemical effect of 11778/ND4 and 3460/ND1 mutations and correlation with the mitochondrial genotype. *Neurology*, 48(6), s.1623–32.
- Coşar, A. et al., 2014. Folate and homocysteine metabolisms and their roles in the biochemical basis of neuropsychiatry. *Turkish journal of medical sciences*, 44(1), s.1–9.
- Costa, V. & Scorrano, L., 2012. Shaping the role of mitochondria in the pathogenesis of Huntington's disease. *The EMBO journal*, 31(8), s.1853–64.
- Crofts, A.R., 2004. The cytochrome bc1 complex: function in the context of structure. *Annual review of physiology*, 66, s.689–733.
- Crofts, A.R. et al., 2008. The Q-cycle reviewed: How well does a monomeric mechanism of the bc(1) complex account for the function of a dimeric complex? *Biochimica et biophysica acta*, 1777(7-8), s.1001–19.
- Davies, K.M. et al., 2011. Macromolecular organization of ATP synthase and complex I in whole mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(34), s.14121–6.
- Djoussé, L. et al., 2002. Weight loss in early stage of Huntington's disease. *Neurology*, 59(9), s.1325–30.
- Dudkina, N. V et al., 2005. Structure of dimeric ATP synthase from mitochondria: an angular association of monomers induces the strong curvature of the inner membrane. *FEBS letters*, 579(25), s.5769–72.
- Duchen, M.R. & Szabadkai, G., 2010. Roles of mitochondria in human disease. *Essays in biochemistry*, 47, s.115–37.
- Endt, H. et al., 2011. Detailed analysis of DNA repair and senescence marker kinetics over the life span of a human fibroblast cell line. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 66(4), s.367–75.
- Fassone, E. & Rahman, S., 2012. Complex I deficiency: clinical features, biochemistry and molecular genetics. *Journal of medical genetics*, 49(9), s.578–90.

- Ferrick, D.A., Neilson, A. & Beeson, C., 2008. Advances in measuring cellular bioenergetics using extracellular flux. *Drug discovery today*, 13(5-6), s.268–74.
- Gnaiger, E., 2001. Bioenergetics at low oxygen: dependence of respiration and phosphorylation on oxygen and adenosine diphosphate supply. *Respiration physiology*, 128(3), s.277–97.
- Gnaiger, E., 2009. Capacity of oxidative phosphorylation in human skeletal muscle: new perspectives of mitochondrial physiology. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 41(10), s.1837–45.
- Gnaiger, E. & Forstner, H., 1983. Polarographic Oxygen Sensors. Aquatic and Physiological Applications. Berlin — Heidelberg — New York, Springer Verlag, 1983, 142 Abb., 370 S., Preis 118,—DM. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, 12(4), s.410–410.
- Granata, S. et al., 2009. Mitochondrial dysregulation and oxidative stress in patients with chronic kidney disease. *BMC genomics*, 10(1), s.388.
- Greco, M. et al., 2003. Marked aging-related decline in efficiency of oxidative phosphorylation in human skin fibroblasts. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17(12), s.1706–8.
- Gu, M. et al., 1996. Mitochondrial defect in Huntington's disease caudate nucleus. *Annals of neurology*, 39(3), s.385–9.
- Haller, T., Ortner, M. & Gnaiger, E., 1994. A respirometer for investigating oxidative cell metabolism: toward optimization of respiratory studies. *Analytical biochemistry*, 218(2), s.338–42.
- Harper, P.S., 1992. The epidemiology of Huntington's disease. *Human genetics*, 89(4), s.365–76.
- Hayflick, L., 1965. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Experimental cell research*, 37, s.614–36.
- Van den Heuvel, L.P., Smeitink, J.A. & Rodenburg, R.J.T., 2004. Biochemical examination of fibroblasts in the diagnosis and research of oxidative phosphorylation (OXPHOS) defects. *Mitochondrion*, 4(5-6), s.395–401.
- Holt, I.J., Harding, A.E. & Morgan-Hughes, J.A., 1988. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature*, 331(6158), s.717–9.
- Howell, N. et al., 1991. Leber hereditary optic neuropathy: identification of the same mitochondrial ND1 mutation in six pedigrees. *American journal of human genetics*, 49(5), s.939–50.
- Chaban, Y., Boekema, E.J. & Dudkina, N. V, 2014. Structures of mitochondrial oxidative phosphorylation supercomplexes and mechanisms for their stabilisation. *Biochimica et biophysica acta*, 1837(4), s.418–26.
- Chance, B. & Williams, G.R., 1955a. A simple and rapid assay of oxidative phosphorylation. *Nature*, 175(4469), s.1120–1.
- Chance, B. & Williams, G.R., 1955b. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I. Kinetics of oxygen utilization. *The Journal of biological chemistry*, 217(1), s.383–93.

- Chazotte, B. & Vanderkooi, G., 1981. Multiple sites of inhibition of mitochondrial electron transport by local anesthetics. *Biochimica et biophysica acta*, 636(2), s.153–61.
- Iverson, T.M., 2013. Catalytic mechanisms of complex II enzymes: a structural perspective. *Biochimica et biophysica acta*, 1827(5), s.648–57.
- Jaksch, M. et al., 2000. Mutations in SCO2 are associated with a distinct form of hypertrophic cardiomyopathy and cytochrome c oxidase deficiency. *Human molecular genetics*, 9(5), s.795–801.
- Kamat, P.K. et al., 2014. Hydrogen Sulfide Epigenetically Attenuates Homocysteine-Induced Mitochondrial Toxicity Mediated through NMDA Receptor in Mouse Brain Endothelial (bEnd3) Cells. *Journal of cellular physiology*.
- Kedrová K., Dopad izolovaného deficitu  $F_1F_0$ -ATP syntázy na ostatní komplexy oxidační fosforylace v kožních fibroblastech v závislosti na podmínkách; *Diplomová práce*; Univerzita Karlova v Praze; Přírodovědecká fakulta; 2014
- Kim, J. et al., 2010. Mitochondrial loss, dysfunction and altered dynamics in Huntington's disease. *Human molecular genetics*, 19(20), s.3919–35.
- Kirby, D.M. et al., 2004. Mutations of the mitochondrial ND1 gene as a cause of MELAS. *Journal of medical genetics*, 41(10), s.784–9.
- Kirby, D.M. et al., 1999. Respiratory chain complex I deficiency: an underdiagnosed energy generation disorder. *Neurology*, 52(6), s.1255–64.
- Kirkman, M.A., Yu-Wai-Man, P. & Chinnery, P.F., 2008. The clinical spectrum of mitochondrial genetic disorders. *Clinical medicine (London, England)*, 8(6), s.601–6.
- Koopman, W.J.H. et al., 2005. Mitochondrial network complexity and pathological decrease in complex I activity are tightly correlated in isolated human complex I deficiency. *American journal of physiology. Cell physiology*, 289(4), s.C881–90.
- Kosinski, C.M. et al., 2007. Myopathy as a first symptom of Huntington's disease in a Marathon runner. *Movement Disorders*, 22(11), s.1637–1640.
- Kraus, J.P. et al., 1999. Cystathionine beta-synthase mutations in homocystinuria. *Human mutation*, 13(5), s.362–75.
- Kroemer, G., Mariño, G. & Levine, B., 2010. Autophagy and the integrated stress response. *Molecular cell*, 40(2), s.280–93.
- Kuznetsov, A. V et al., 2008. Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nature protocols*, 3(6), s.965–976.
- Lee, C. et al., 2015. The Mitochondrial-Derived Peptide MOTS-c Promotes Metabolic Homeostasis and Reduces Obesity and Insulin Resistance. *Cell Metabolism*, 21(3), s.443–454.
- Lee, C., Yen, K. & Cohen, P., 2013. Humanin: a harbinger of mitochondrial-derived peptides? *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 24(5), s.222–8.

- Lee, H.-C. & Wei, Y.-H., 2005. Mitochondrial biogenesis and mitochondrial DNA maintenance of mammalian cells under oxidative stress. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 37(4), s.822–34.
- Legros, F., 2004. Organization and dynamics of human mitochondrial DNA. *Journal of Cell Science*, 117(13), s.2653–2662.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L. & Cox, M.M., 2005. *Lehninger Principles of Biochemistry*,
- Lessler, M.A., 1982. Adaptation of polarographic oxygen sensors for biochemical assays. *Methods of biochemical analysis*, 28, s.175–99.
- Li, Z. & Graham, B.H., 2012. Measurement of mitochondrial oxygen consumption using a Clark electrode. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 837, s.63–72.
- Lodish, H. & Berk, a, 2008. Molecular cell biology. *Perspective*.
- Loeffen, J.L. et al., 2000. Isolated complex I deficiency in children: clinical, biochemical and genetic aspects. *Human mutation*, 15(2), s.123–34.
- Luft, R. et al., 1962. A case of severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: a correlated clinical, biochemical, and morphological study. *The Journal of clinical investigation*, 41, s.1776–804.
- MacDonald, M., 1993. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell*, 72(6), s.971–983.
- Mack, C.L. et al., 2001. Early speech delay and hepatitis as presenting signs of homocystinuria. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 33(2), s.221–3.
- Margulis, L., 1975. Symbiotic theory of the origin of eukaryotic organelles; criteria for proof. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, (29), s.21–38.
- Marroquin, L.D. et al., 2007. Circumventing the Crabtree effect: replacing media glucose with galactose increases susceptibility of HepG2 cells to mitochondrial toxicants. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 97(2), s.539–47.
- Martin, W., 1998. Gene Transfer from Organelles to the Nucleus: How Much, What Happens, and Why? *PLANT PHYSIOLOGY*, 118(1), s.9–17.
- Martínez-Pizzaro, A. et al., 2014. Perturbation of mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes and mitophagy in homocystinuria patients with genetic remethylation defects. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, SSIEM 2014 Annual Symposium: Abstracts, 37 (Suppl 1), s.27-S185
- Massa, V. et al., 2008. Severe infantile encephalomyopathy caused by a mutation in COX6B1, a nucleus-encoded subunit of cytochrome c oxidase. *American journal of human genetics*, 82(6), s.1281–9.
- Matthias, D. et al., 1996. Homocysteine induced arteriosclerosis-like alterations of the aorta in normotensive and hypertensive rats following application of high doses of methionine. *Atherosclerosis*, 122(2), s.201–16.

- Mattiazzi, M. et al., 2004. The mtDNA T8993G (NARP) mutation results in an impairment of oxidative phosphorylation that can be improved by antioxidants. *Human molecular genetics*, 13(8), s.869–79.
- McKay, N.D. et al., 1983. Glucose transport and metabolism in cultured human skin fibroblasts. *Biochimica et biophysica acta*, 762(2), s.198–204.
- 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), s.331–41.
- Di Meo, I. et al., 2011. Chronic exposure to sulfide causes accelerated degradation of cytochrome c oxidase in ethylmalonic encephalopathy. *Antioxidants & redox signaling*, 15(2), s.353–62.
- Milakovic, T. & Johnson, G.V.W., 2005. Mitochondrial respiration and ATP production are significantly impaired in striatal cells expressing mutant huntingtin. *The Journal of biological chemistry*, 280(35), s.30773–82.
- Milakovic, T., Quintanilla, R.A. & Johnson, G.V.W., 2006. Mutant huntingtin expression induces mitochondrial calcium handling defects in clonal striatal cells: functional consequences. *The Journal of biological chemistry*, 281(46), s.34785–95.
- Mitchell, P., 1961. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*, 191, s.144–8.
- Moulin VJ, M.D.L.-L.A.L.S. and G.H., 2011. *Regenerative Medicine and Tissue Engineering - Cells and Biomaterials* D. Eberli, ed., InTech.
- Nasir, J. et al., 1995. Targeted disruption of the Huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes. *Cell*, 81(5), s.811–23. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7774020> [Viděno březem 15, 2015].
- Nass, M.M., 1969. Mitochondrial DNA. I. Intramitochondrial distribution and structural relations of single- and double-length circular DNA. *Journal of molecular biology*, 42(3), s.521–8.
- Nass, M.M. & Nass, S., 1963. Intramitochondrial fibers with DNA characteristics. I. Fixation and electron staining reactions. *The Journal of cell biology*, 19, s.593–611.
- Nesbitt, V. et al., 2012. The clinical spectrum of the m.10191T>C mutation in complex I-deficient Leigh syndrome. *Developmental medicine and child neurology*, 54(6), s.500–6.
- Nicholls, D.G. & Ferguson, S.J., 2013. *Bioenergetics 4th*, Elsevier.
- North, K.N., 2011. Clinical approach to the diagnosis of congenital myopathies. *Seminars in pediatric neurology*, 18(4), s.216–20.
- Novak, M.J.U. & Tabrizi, S.J., 2011. *Huntington's disease: clinical presentation and treatment.*, Elsevier.
- Oesper, P., 1964. The history of the Warburg apparatus: Some reminiscences on its use. *Journal of Chemical Education*, 41(6), s.294.

- Olichon, A. et al., 2003. Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, 278(10), s.7743–6.
- Oliveira, J.M.A. et al., 2007. Mitochondrial dysfunction in Huntington's disease: the bioenergetics of isolated and in situ mitochondria from transgenic mice. *Journal of neurochemistry*, 101(1), s.241–9.
- Panov, A. V et al., 2002. Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines. *Nature neuroscience*, 5(8), s.731–6.
- Papadopoulou, L.C. et al., 1999. Fatal infantile cardioencephalomyopathy with COX deficiency and mutations in SCO2, a COX assembly gene. *Nature genetics*, 23(3), s.333–7.
- Parker, W.D. et al., 1990. Evidence for a defect in NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) in Huntington's disease. *Neurology*, 40(8), s.1231–4.
- Pecina, P., Čapková, M., et al., 2003. Functional alteration of cytochrome c oxidase by SURF1 mutations in Leigh syndrome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1639(1), s.53–63.
- Pecina, P., Capková, M., et al., 2003. Functional alteration of cytochrome c oxidase by SURF1 mutations in Leigh syndrome. *Biochimica et biophysica acta*, 1639(1), s.53–63.
- Pesta, D. & Gnaiger, E., 2012. High-resolution respirometry: OXPHOS protocols for human cells and permeabilized fibers from small biopsies of human muscle. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 810, s.25–58.
- Petrascch-Parwez, E. et al., 2007. Cellular and subcellular localization of Huntingtin [corrected] aggregates in the brain of a rat transgenic for Huntington disease. *The Journal of comparative neurology*, 501(5), s.716–30.
- Pronicki, M. et al., 2008. Light and electron microscopy characteristics of the muscle of patients with SURF1 gene mutations associated with Leigh disease. *Journal of clinical pathology*, 61(4), s.460–6.
- Van Remmen, H. & Richardson, A., 2001. Oxidative damage to mitochondria and aging. *Experimental gerontology*, 36(7), s.957–68.
- Rizzuto, R. et al., 2012. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 13(9), s.566–78.
- Robinson, B.H., 2006. Lactic acidemia and mitochondrial disease. *Molecular genetics and metabolism*, 89(1-2), s.3–13.
- Robinson, B.H., 1996. Use of fibroblast and lymphoblast cultures for detection of respiratory chain defects. *Methods in enzymology*, 264, s.454–64.
- Rosenblatt, A., 2007. Neuropsychiatry of Huntington's disease. *Dialogues in clinical neuroscience*, 9(2), s.191–7.

- Rosenblatt, D.S. et al., 1992. Methylenetetrahydrofolate reductase (MR) deficiency: thermolability of residual MR activity, methionine synthase activity, and methylcobalamin levels in cultured fibroblasts. *Biochemical medicine and metabolic biology*, 47(3), s.221–5.
- Rossignol, R. et al., 2003. Mitochondrial threshold effects. *The Biochemical journal*, 370(Pt 3), s.751–62.
- Rubinsztein, D.C. et al., 1996. Phenotypic characterization of individuals with 30-40 CAG repeats in the Huntington disease (HD) gene reveals HD cases with 36 repeats and apparently normal elderly individuals with 36-39 repeats. *American journal of human genetics*, 59(1), s.16–22.
- Saks, V.A. et al., 1998. Permeabilized cell and skinned fiber techniques in studies of mitochondrial function in vivo. *Molecular and cellular biochemistry*, 184(1-2), s.81–100.
- Saudou, F. et al., 1998. Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. *Cell*, 95(1), s.55–66.
- Sazanov, L.A. & Walker, J.E., 2000. Cryo-electron crystallography of two sub-complexes of bovine complex I reveals the relationship between the membrane and peripheral arms. *Journal of molecular biology*, 302(2), s.455–64.
- Sen, U. et al., 2010. Homocysteine to hydrogen sulfide or hypertension. *Cell biochemistry and biophysics*, 57(2-3), s.49–58.
- Seong, I.S. et al., 2005. HD CAG repeat implicates a dominant property of huntingtin in mitochondrial energy metabolism. *Human molecular genetics*, 14(19), s.2871–80.
- Shadel, G.S. & Clayton, D.A., 1997. Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Annual review of biochemistry*, 66, s.409–35.
- Shaw, J.M. & Nunnari, J., 2002. Mitochondrial dynamics and division in budding yeast. *Trends in cell biology*, 12(4), s.178–84.
- Shoubridge, E.A., 2001. Cytochrome c oxidase deficiency. *American journal of medical genetics*, 106(1), s.46–52.
- Schägger, H., 2001. Respiratory chain supercomplexes. *IUBMB life*, 52(3-5), s.119–28.
- Schägger, H. et al., 2004. Significance of respirasomes for the assembly/stability of human respiratory chain complex I. *The Journal of biological chemistry*, 279(35), s.36349–53.
- Schapira, A.H. V, 2012. Mitochondrial diseases. *The Lancet*, 379(9828), s.1825–1834.
- Scheffler, I.E., 2007. *Mitochondria*
- Sidiropoulos, C., LeWitt, P. & Hashimoto, K., 2012. Abnormal apocrine secretory cell mitochondria in a Huntington disease patient. *Journal of the neurological sciences*, 323(1-2), s.261–3.
- Song, W. et al., 2011. Mutant huntingtin binds the mitochondrial fission GTPase dynamin-related protein-1 and increases its enzymatic activity. *Nature medicine*, 17(3), s.377–82.
- Squitieri, F. et al., 2003. Homozygosity for CAG mutation in Huntington disease is associated with a more severe clinical course. *Brain : a journal of neurology*, 126(Pt 4), s.946–55.

- Stiburek, L. et al., 2005. Tissue-specific cytochrome c oxidase assembly defects due to mutations in SCO2 and SURF1. *The Biochemical journal*, 392(Pt 3), s.625–32.
- Stine, O.C. et al., 1993. Correlation between the onset age of Huntington's disease and length of the trinucleotide repeat in IT-15. *Human molecular genetics*, 2(10), s.1547–9.
- Streck, E.L. et al., 2003. Impairment of energy metabolism in hippocampus of rats subjected to chemically-induced hyperhomocysteinemia. *Biochimica et biophysica acta*, 1637(3), s.187–92.
- Taylor, R.W. et al., 2002. Leigh disease associated with a novel mitochondrial DNA ND5 mutation. *European journal of human genetics : EJHG*, 10(2), s.141–4.
- Telenius, H. et al., 1993. Molecular analysis of juvenile Huntington disease: the major influence on (CAG)<sub>n</sub> repeat length is the sex of the affected parent. *Human molecular genetics*, 2(10), s.1535–40.
- Thorburn, D.R., 2004. Mitochondrial disorders: prevalence, myths and advances. *Journal of inherited metabolic disease*, 27(3), s.349–62.
- Thorburn, D.R., Chow, C.W. & Kirby, D.M., 2004. Respiratory chain enzyme analysis in muscle and liver. *Mitochondrion*, 4(5-6), s.363–75.
- Tiranti, V. et al., 1998. Mutations of SURF-1 in Leigh disease associated with cytochrome c oxidase deficiency. *American journal of human genetics*, 63, s.1609–1621.
- Tyagi, N. et al., 2005. Mechanisms of homocysteine-induced oxidative stress. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 289(6), s.H2649–56.
- Tyagi, N. et al., 2006. Mitochondrial mechanism of microvascular endothelial cells apoptosis in hyperhomocysteinemia. *Journal of cellular biochemistry*, 98(5), s.1150–62.
- Valnot, I., von Kleist-Retzow, J.C., et al., 2000. A mutation in the human heme A:farnesyltransferase gene (COX10) causes cytochrome c oxidase deficiency. *Human molecular genetics*, 9(8), s.1245–9.
- Valnot, I., Osmond, S., et al., 2000. Mutations of the SCO1 gene in mitochondrial cytochrome c oxidase deficiency with neonatal-onset hepatic failure and encephalopathy. *American journal of human genetics*, 67(5), s.1104–9.
- Vinothkumar, K.R., Zhu, J. & Hirst, J., 2014. Architecture of mammalian respiratory complex I. *Nature*, 515(7525), s.80–84.
- Vonsattel, J.P. et al., 1985. Neuropathological classification of Huntington's disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 44(6), s.559–77.
- Wallace, D.C., 1999. Mitochondrial Diseases in Man and Mouse. *Science*, 283(5407), s.1482–1488.
- Wallace, D.C. et al., 1988. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science (New York, N.Y.)*, 242(4884), s.1427–30.
- Wang, H. et al., 2009. Effects of overexpression of huntingtin proteins on mitochondrial integrity. *Human molecular genetics*, 18(4), s.737–52.



- Watt, I.N. et al., 2010. Bioenergetic cost of making an adenosine triphosphate molecule in animal mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(39), s.16823–7.
- Wilson, D.F., 2013. Regulation of cellular metabolism: programming and maintaining metabolic homeostasis. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 115(11), s.1583–8.
- Winge, D.R., 2012. Sealing the mitochondrial respirasome. *Molecular and cellular biology*, 32(14), s.2647–52.
- Wojtczak, L., 1996. The Crabtree effect: a new look at the old problem. *Acta biochimica Polonica*, 43(2), s.361–8.
- Wong, L.-J.C., 2013a. Mitochondrial Disorders Caused by Nuclear Genes | Springer. *Springer*.
- Wong, L.-J.C., 2013b. Next generation molecular diagnosis of mitochondrial disorders. *Mitochondrion*, 13(4), s.379–87.
- Wortmann, S.B. et al., 2015. Whole exome sequencing of suspected mitochondrial patients in clinical practice. *Journal of inherited metabolic disease*.
- Yang, Q., 2008. Cellular senescence, telomere recombination and maintenance. *Cytogenetic and genome research*, 122(3-4), s.211–8.
- Yano, H. et al., 2014. Inhibition of mitochondrial protein import by mutant huntingtin. *Nature neuroscience*, 17(6), s.822–31.
- Zalman, L.S., Nikaido, H. & Kagawa, Y., 1980. Mitochondrial outer membrane contains a protein producing nonspecific diffusion channels. *The Journal of biological chemistry*, 255(5), s.1771–4.
- Zeron, M.M. et al., 2004. Potentiation of NMDA receptor-mediated excitotoxicity linked with intrinsic apoptotic pathway in YAC transgenic mouse model of Huntington's disease. *Molecular and cellular neurosciences*, 25(3), s.469–79.

### **Internetové zdroje:**

[www.mitomap.org](http://www.mitomap.org)

[www.biocision.com](http://www.biocision.com)

[www.oroboros.at](http://www.oroboros.at)

[www.omim.org](http://www.omim.org)

## 8 Přílohy

### 8.1 Hodnoty respirace kontrolní linie K1 v pasážích P5, P11 a P18

Kontrola	Pasáž	Věk	Hodnota	Jednotka	GM	ADP	Rot	Su	Ama	A,T	A,T,F	Z
K1	P5	kojenec do 1 r.	O2 Flux per mass (B)	pmol/(s*mg)	17,55	75,05	2,91	90,23	0,37	387,55	428,60	217,23
K1	P11	kojenec do 1 r.	O2 Flux per mass (B)	pmol/(s*mg)	20,59	68,50	2,48	88,91	2,60	313,69	354,29	142,88
K1	P18	kojenec do 1 r.	O2 Flux per mass (B)	pmol/(s*mg)	15,25	43,03	0,49	77,65	0,50	279,19	324,67	120,02

Kontrola	Pasáž	Věk	KI	KI (+ADP)	KII	KIV	KIV (+FCCP)	KI(+ADP)/KI	KI/KII	KIV/KI	KIV/KII
			GM-Rot	ADP-Rot	Su-Ama	A,T-Z	A,T,F-Z	ADP/GM	ADP/Su	A,T,F/ADP	A,T,F/Su
K1	P5	kojenec do 1 r.	14,64	72,14	89,86	170,32	211,37	4,928	0,803	2,930	2,352
K1	P11	kojenec do 1 r.	18,11	66,02	86,31	170,81	211,41	3,645	0,765	3,202	2,449
K1	P18	kojenec do 1 r.	14,76	42,54	77,15	159,17	204,65	2,882	0,551	4,811	2,653

### 8.2 Hodnoty respirace kontrolních linií dětí (K1-K3) a dospělých (K4-K6)

#### Dětské kontroly

Kontrola	Pasáž	Věk	Hodnota	Jednotka	GM	ADP	Rot	Su	AmA	A,T	A,T,F	Z
K1	P11	kojenec do 1 r.	O2 Flux per mass (B)	pmol/(s*mg)	20,59	68,50	2,48	88,91	2,60	313,69	354,29	142,88
K2	P9	novorozenec	O2 Flux per mass (A)	pmol/(s*mg)	27,65	59,80	1,94	97,10	2,84	275,36	330,53	135,02
K3	P16	kojenec do 1 r.	O2 Flux per mass (B)	pmol/(s*mg)	13,32	37,45	2,76	49,50	0,87	345,22	356,04	232,50

pokračování 8.2

Dětské kontroly			KI	KI (+ADP)	KII	KIV	KIV (+FCCP)	KI(+ADP)/KI	KI/KII	KIV/KI	KIV/KII
Kontrola	Pasáž	Věk	GM-Rot	ADP-Rot	Su-AmA	A,T-Z	A,T,F-Z	ADP/GM	ADP/Su	A,T,F/ADP	A,T,F/Su
<b>K1</b>	P12	kojenec do 1 r.	18,11	66,02	86,31	170,81	211,41	3,645	0,765	3,202	2,449
<b>K2</b>	P8	novorozenec	25,71	57,86	94,27	140,33	195,51	2,251	0,614	3,379	2,074
<b>K3</b>	P9	kojenec do 1 r.	10,56	34,69	48,63	112,72	123,54	3,285	0,713	3,561	2,540
		<b>Průměr</b>	<b>18,13</b>	<b>52,86</b>	<b>76,40</b>	<b>141,29</b>	<b>176,82</b>	<b>3,060</b>	<b>0,697</b>	<b>3,381</b>	<b>2,355</b>
		<b>Sm. odchylka</b>	6,184	13,270	19,905	23,725	38,230	0,591	0,063	0,147	0,202

#### Dospělé kontroly

Kontrola	Pasáž	Věk	Hodnota	Jednotka	GM	ADP	Rot	Su	AmA	A,T	A,T,F	Z
<b>K4</b>	P12	dospělá	O2 Flux per mass (B)	pmol/(s*mg)	28,87	41,61	4,30	66,43	3,85	195,10	216,90	40,73
<b>K5</b>	P8	29 let	O2 Flux per mass (B)	pmol/(s*mg)	12,98	25,43	0,04	54,88	0,45	268,87	299,74	138,16
<b>K6</b>	P9	29 let	O2 Flux per mass (B)	pmol/(s*mg)	22,59	36,23	0,53	58,84	0,46	282,24	331,60	131,01

#### Dospělé kontroly

Dospělé kontroly			KI	KI (+ADP)	KII	KIV	KIV (+FCCP)	KI(+ADP)/KI	KI/KII	KIV/KI	KIV/KII
Kontrola	Pasáž	Věk	GM-Rot	ADP-Rot	Su-AmA	A,T-Z	A,T,F-Z	ADP/GM	ADP/Su	A,T,F/ADP	A,T,F/Su
<b>K4</b>	P12	dospělá	24,57	37,32	62,57	154,37	176,17	1,519	0,596	4,721	2,815
<b>K5</b>	P8	29 let	12,94	25,39	54,43	130,70	161,57	1,962	0,467	6,363	2,968
<b>K6</b>	P9	29 let	22,06	35,70	58,38	151,23	200,59	1,618	0,612	5,619	3,436
		<b>Průměr</b>	<b>19,86</b>	<b>32,80</b>	<b>58,46</b>	<b>145,43</b>	<b>179,44</b>	<b>1,700</b>	<b>0,558</b>	<b>5,568</b>	<b>3,073</b>
		<b>Sm. odchylka</b>	4,997	5,280	3,324	10,495	16,096	0,190	0,065	0,671	0,264

### 8.3 Hodnoty respirace pacientů (P1-P10) s primárními mitochondriálními poruchami

Pacienti	Pasáž	Věk	Hodnota	Jednotka	GM	ADP	Rot	Su	AmA	A,T	A,T,F	Z
P1	P4	1 rok	O2 Flux per mass (B)	pmol/(s*mg)	14,56	25,77	1,45	39,82	2,30	161,22	184,81	113,06
P2	P4	2 roky	O2 Flux per mass (B)	pmol/(s*mg)	14,84	28,23	5,08	24,24	2,74	237,93	272,05	237,47
P3	P5	17 let	O2 Flux per mass (B)	pmol/(s*mg)	16,49	25,91	1,58	43,22	3,48	276,26	301,20	222,44
P4	P4	2 roky	O2 Flux per mass (B)	pmol/(s*mg)	12,08	15,30	2,78	19,28	0,26	287,91	317,24	259,17
P5	P11	2 roky	O2 Flux per mass (B)	pmol/(s*mg)	6,29	13,28	0,31	15,54	0,18	320,92	335,63	211,74
P6	P9	6 měsíců	O2 Flux per mass (B)	pmol/(s*mg)	16,44	26,60	0,01	76,98	0,32	291,27	329,15	154,66
P7	P4	2 roky	O2 Flux per mass (B)	pmol/(s*mg)	17,40	33,29	1,24	68,74	3,16	236,03	276,30	106,24
P8	P5	2 roky	O2 Flux per mass (B)	pmol/(s*mg)	17,74	46,10	1,37	48,47	2,01	395,27	417,60	321,10
P9	P7	2 roky	O2 Flux per mass (B)	pmol/(s*mg)	13,38	32,66	1,68	65,10	0,04	298,99	337,40	125,33
P10	P6	1 rok	O2 Flux per mass (B)	pmol/(s*mg)	10,94	25,80	1,86	50,28	0,28	253,65	278,69	181,21

Pacient	Pasáž	Věk	KI	KI (+ADP)	KII	KIV	KIV (+FCCP)	KI(+ADP)/KI	KI/KII	KIV/KI	KIV/KII
			GM-Rot	ADP-Rot	Su-AmA	A,T-Z	A,T,F-Z	ADP/GM	ADP/Su	A,T,F/ADP	A,T,F/Su
P1	P4	1 rok	13,11	24,32	37,52	48,16	71,75	1,855	0,648	2,951	1,913
P2	P4	2 roky	9,76	23,15	21,50	0,46	34,58	2,372	1,077	1,494	1,608
P3	P5	17 let	14,91	24,33	39,74	53,82	78,76	1,632	0,612	3,237	1,982
P4	P4	2 roky	9,30	12,52	19,02	28,74	58,07	1,346	0,658	4,638	3,052
P5	P11	2 roky	5,98	12,97	15,36	109,18	123,89	2,170	0,844	9,555	8,067
P6	P9	6 měsíců	16,43	26,59	76,66	136,61	174,49	1,619	0,347	6,563	2,276
P7	P4	2 roky	16,15	32,05	65,58	129,79	170,06	1,984	0,489	5,306	2,593
P8	P5	2 roky	16,37	44,73	46,46	74,17	96,50	2,732	0,963	2,157	2,077
P9	P7	2 roky	11,70	30,98	65,05	173,66	212,07	2,648	0,476	6,845	3,260
P10	P6	1 rok	9,09	23,95	50,01	72,44	97,48	2,635	0,479	4,071	1,949

#### 8.4 Hodnoty respirace pacientů (P11-P18) s Huntingtonovou chorobou

Pacient	Pasáž	Věk	Hodnota	Jednotka	GM	ADP	Rot	Su	AmA	A,T	A,T,F	Z
P11	P4	31 let	O2 Flux per mass (B)	pmol/(s*mg)	14,91	32,77	2,34	38,93	1,16	265,66	289,91	207,99
P12	P5	34 let	O2 Flux per mass (B)	pmol/(s*mg)	10,18	17,05	2,05	45,41	3,73	241,25	262,84	201,07
P13	P5	39 let	O2 Flux per mass (B)	pmol/(s*mg)	10,99	31,54	1,40	69,44	1,11	298,64	324,08	180,04
P14	P9	42 let	O2 Flux per mass (A)	pmol/(s*mg)	4,08	10,75	0,12	31,55	0,04	217,48	242,94	167,66
P15	P10	34 let	O2 Flux per mass (B)	pmol/(s*mg)	11,00	30,28	0,73	50,54	2,66	290,60	313,30	186,45
P16	P7	39 let	O2 Flux per mass (B)	pmol/(s*mg)	14,10	49,26	0,34	54,64	0,52	210,69	239,40	112,06
P17	P11	49 let	O2 Flux per mass (B)	pmol/(s*mg)	11,07	19,67	0,88	24,95	0,15	162,53	181,95	128,71
P18	P9	64 let	O2 Flux per mass (B)	pmol/(s*mg)	31,71	31,48	7,80	45,84	4,93	260,16	287,97	154,92

Pacient	Pasáž	Věk	KI	KI (+ADP)	KII	KIV	KIV (+FCCP)	KI(+ADP)/KI	KI/KII	KIV/KI	KIV/KII
			GM-Rot	ADP-Rot	Su-AmA	A,T-Z	A,T,F-Z	ADP/GM	ADP/Su	A,T,F/ADP	A,T,F/Su
P11	P4	31 let	12,57	30,43	37,77	57,67	81,92	2,421	0,806	2,692	2,169
P12	P5	34 let	8,13	15,00	41,68	40,17	61,77	1,845	0,360	4,118	1,482
P13	P5	39 let	9,59	30,14	68,34	118,60	144,04	3,142	0,441	4,779	2,108
P14	P9	42 let	3,96	10,63	31,51	49,82	75,28	2,684	0,337	7,082	2,389
P15	P10	34 let	10,27	29,55	47,87	104,15	126,85	2,876	0,617	4,293	2,650
P16	P7	39 let	13,76	48,92	54,12	98,64	127,35	3,556	0,904	2,603	2,353
P17	P11	49 let	10,19	18,79	24,81	33,82	53,24	1,844	0,757	2,834	2,146
P18	P9	64 let	23,92	23,68	40,91	105,24	133,06	0,990	0,579	5,618	3,252
<b>Průměr</b>			<b>11,55</b>	<b>25,89</b>	<b>43,38</b>	<b>76,01</b>	<b>100,44</b>	<b>2,420</b>	<b>0,600</b>	<b>4,252</b>	<b>2,319</b>
<b>Sm. odchylka</b>			<b>5,426</b>	<b>11,120</b>	<b>12,672</b>	<b>31,738</b>	<b>33,700</b>	<b>0,774</b>	<b>0,198</b>	<b>1,472</b>	<b>0,472</b>

### 8.5 Hodnoty respirace pacientů (P19-P24) s poruchou metabolismu siřných aminokyselin

Pacient	Pasáž	Věk	Hodnota	Jednotka	GM	ADP	Rot	Su	AmA	A,T	A,T,F	Z
<b>P19 (MTHFR)</b>	P5	10 let	O2 Flux per mass (B)	pmol/(s*mg)	17,00	35,66	0,05	63,70	0,14	282,06	314,23	140,57
<b>P20 (MTHFR)</b>	P6	11 let	O2 Flux per mass (B)	pmol/(s*mg)	15,77	54,04	0,00	80,32	0,51	417,26	467,67	207,18
<b>P21 (CTH)</b>	P5	13 let	O2 Flux per mass (B)	pmol/(s*mg)	19,91	41,19	1,01	98,37	2,75	387,53	464,01	138,58
<b>P22 (CTH)</b>	P5	34 let	O2 Flux per mass (B)	pmol/(s*mg)	22,14	39,33	0,13	78,37	0,93	456,71	544,37	208,78
<b>P23 (CBS)</b>	P6	26 let	O2 Flux per mass (B)	pmol/(s*mg)	16,51	44,63	0,00	73,55	1,09	335,01	376,06	171,66
<b>P24 (CBS)</b>	P3	25 let	O2 Flux per mass (B)	pmol/(s*mg)	23,64	48,50	0,41	80,80	0,95	379,13	463,01	77,87

Pacient	Pasáž	Věk	KI	KI(+ADP)	KII	KIV	KIV (+FCCP)	KI(+ADP)/KI	KI/KII	KIV/KI	KIV/KII
			GM-Rot	ADP-Rot	Su-AmA	A,T-Z	A,T,F-Z	ADP/GM	ADP/Su	A,T,F/ADP	A,T,F/Su
<b>P19 (MTHFR)</b>	P5	10 let	16,95	35,61	63,56	141,49	173,66	2,101	0,560	4,876	2,732
<b>P20 (MTHFR)</b>	P6	11 let	15,77	54,04	79,80	210,08	260,49	3,427	0,677	4,820	3,264
<b>P21 (CTH)</b>	P5	13 let	18,90	40,18	95,62	248,95	325,43	2,126	0,420	8,098	3,403
<b>P22 (CTH)</b>	P5	34 let	22,01	39,20	77,44	247,93	335,59	1,781	0,506	8,560	4,334
<b>P23 (CBS)</b>	P6	26 let	16,51	44,63	72,46	163,35	204,40	2,704	0,616	4,579	2,821
<b>P24 (CBS)</b>	P3	25 let	23,23	48,09	79,86	301,26	385,14	2,070	0,602	8,009	4,823
		<b>Průměr</b>	<b>18,90</b>	<b>43,63</b>	<b>78,12</b>	<b>218,84</b>	<b>280,79</b>	<b>2,368</b>	<b>0,564</b>	<b>6,491</b>	<b>3,563</b>
		<b>Sm. odchylka</b>	<b>2,82</b>	<b>6,12</b>	<b>9,63</b>	<b>54,29</b>	<b>74,84</b>	<b>0,547</b>	<b>0,083</b>	<b>1,743</b>	<b>0,768</b>

## 8.6 Hodnoty respirace kontrolních linií kultivovaných v médiu DMEM s glukózou nebo galaktózou

### Dětská kontrola

Kontrola	Pasáž	Věk	Hodnota	Jednotka	GM	ADP	Rot	Su	AmA	A,T	A,T,F	Z
K1 Glu	P5	kojenec do 1 r.	O2 Flux per mass (B)	pmol/(s*mg)	17,55	75,05	2,91	90,23	0,37	387,55	428,60	217,23
K1 Glu	P11	kojenec do 1 r.	O2 Flux per mass (B)	pmol/(s*mg)	20,59	68,50	2,48	88,91	2,60	313,69	354,29	142,88

### Dětská kontrola

Kontrola	Pasáž	Věk	GI	GI (+ADP)	GII	GIV	GIV (+FCCP)	GI(+ADP)/GI	GI/GII	GIV/GI	GIV/GII
Kontrola	Pasáž	Věk	GM-Rot	ADP-Rot	Su-AmA	A,T-Z	A,T,F-Z	ADP/GM	ADP/Su	A,T,F/ADP	A,T,F/Su
K1 Glu	P5	kojenec do 1 r.	14,64	72,14	89,86	170,32	211,37	4,928	0,803	2,930	2,352
K1 Glu	P11	kojenec do 1 r.	18,11	66,02	86,31	170,81	211,41	3,645	0,765	3,202	2,449
		<b>Průměr K1 Glu</b>	<b>18,11</b>	<b>66,02</b>	<b>86,31</b>	<b>170,81</b>	<b>211,41</b>	<b>3,65</b>	<b>0,76</b>	<b>3,20</b>	<b>2,45</b>
		<b>Sm. odchylka</b>	<b>1,74</b>	<b>3,06</b>	<b>1,77</b>	<b>0,24</b>	<b>0,02</b>	<b>0,641</b>	<b>0,019</b>	<b>0,136</b>	<b>0,049</b>

### Dětská kontrola

Kontrola	Pasáž	Věk	Hodnota	Jednotka	GM	ADP	Rot	Su	AmA	A,T	A,T,F	Z
K1 Gal	P7	kojenec do 1 r.	O2 Flux per mass (B)	pmol/(s*mg)	28,21	49,99	2,20	79,74	1,32	279,58	322,27	129,97
K1 Gal	P9	kojenec do 1 r.	O2 Flux per mass (B)	pmol/(s*mg)	21,76	34,87	1,35	42,25	0,94	223,61	259,55	106,00

### Dětská kontrola

Kontrola	Pasáž	Věk	GI	GI (+ADP)	GII	GIV	GIV (+FCCP)	GI(+ADP)/GI	GI/GII	GIV/GI	GIV/GII
Kontrola	Pasáž	Věk	GM-Rot	ADP-Rot	Su-AmA	A,T-Z	A,T,F-Z	ADP/GM	ADP/Su	A,T,F/ADP	A,T,F/Su
K1 Gal	P7	kojenec do 1 r.	26,01	47,79	78,43	149,61	192,31	1,837	0,609	4,024	2,452
K1 Gal	P9	kojenec do 1 r.	20,41	33,52	41,31	117,61	153,55	1,642	0,811	4,581	3,717
		<b>Průměr K1 Gal</b>	<b>23,21</b>	<b>40,65</b>	<b>59,87</b>	<b>133,61</b>	<b>172,93</b>	<b>1,740</b>	<b>0,710</b>	<b>4,303</b>	<b>3,085</b>
		<b>Sm. odchylka</b>	<b>2,80</b>	<b>7,13</b>	<b>18,56</b>	<b>16,00</b>	<b>19,38</b>	<b>0,098</b>	<b>0,101</b>	<b>0,278</b>	<b>0,632</b>

pokračování 8.6

**Dospělá kontrola**

Kontrola	Pasáž	Věk	Hodnota	Jednotka	GM	ADP	Rot	Su	AmA	A,T	A,T,F	Z
K5 Glu	P8	29 let	O2 Flux per mass (B)	pmol/(s*mg)	12,98	25,43	0,04	54,88	0,45	268,87	299,74	138,16
K5 Glu	P12	29 let	O2 Flux per mass (B)	pmol/(s*mg)	13,01	41,75	0,04	76,22	0,72	325,42	368,40	169,09

**Dospělá kontrola**

Kontrola	Pasáž	Věk	KI	KI (+ADP)	KII	KIV	KIV (+FCCP)	KI(+ADP)/KI	KI/KII	KIV/KI	KIV/KII
			GM-Rot	ADP-Rot	Su-AmA	A,T-Z	A,T,F-Z	ADP/GM	ADP/Su	A,T,F/ADP	A,T,F/Su
K5 Glu	P8	29 let	12,94	25,39	54,43	130,70	161,57	1,962	0,467	6,363	2,968
K5 Glu	P12	29 let	12,97	41,71	75,49	156,33	199,31	3,217	0,553	4,778	2,640
<b>Průměr K5 Glu</b>			<b>12,97</b>	<b>41,71</b>	<b>75,49</b>	<b>156,33</b>	<b>199,31</b>	<b>3,217</b>	<b>0,553</b>	<b>4,778</b>	<b>2,640</b>
<b>Sm. odchylka</b>			<b>0,01</b>	<b>8,16</b>	<b>10,53</b>	<b>12,81</b>	<b>18,87</b>	<b>0,627</b>	<b>0,043</b>	<b>0,792</b>	<b>0,164</b>

**Dospělá kontrola**

Kontrola	Pasáž	Věk	Hodnota	Jednotka	GM	ADP	Rot	Su	AmA	A,T	A,T,F	Z
K5 Gal	P10	29 let	O2 Flux per mass (B)	pmol/(s*mg)	24,64	38,14	1,55	60,64	1,36	301,79	349,16	91,42
K5 Gal	P15	29 let	O2 Flux per mass (B)	pmol/(s*mg)	30,96	41,67	0,22	87,40	0,59	495,82	599,74	202,65

**Dospělá kontrola**

Kontrola	Pasáž	Věk	KI	KI (+ADP)	KII	KIV	KIV (+FCCP)	KI(+ADP)/KI	KI/KII	KIV/KI	KIV/KII
			GM-Rot	ADP-Rot	Su-AmA	A,T-Z	A,T,F-Z	ADP/GM	ADP/Su	A,T,F/ADP	A,T,F/Su
K5 Gal	P10	29 let	23,09	36,59	59,28	210,37	257,74	1,585	0,617	7,044	4,348
K5 Gal	P15	29 let	30,74	41,45	86,81	293,17	397,09	1,348	0,478	9,579	4,574
<b>Průměr K5 Gal</b>			<b>26,92</b>	<b>39,02</b>	<b>73,05</b>	<b>251,77</b>	<b>327,42</b>	<b>1,467</b>	<b>0,547</b>	<b>8,312</b>	<b>4,461</b>
<b>Sm. odchylka</b>			<b>3,83</b>	<b>2,43</b>	<b>13,76</b>	<b>41,40</b>	<b>69,67</b>	<b>0,118</b>	<b>0,070</b>	<b>1,268</b>	<b>0,113</b>



## 8.7 Hodnoty respirace linií pacienta P6 kultivovaných v médiu DMEM s glukózou nebo galaktózou

### Pacient P6

Pacient	Pasáž	Věk	Hodnota	Jednotka	GM	ADP	Rot	Su	AmA	A,T	A,T,F	Z
P6 Glu	P9	6 měsíců	O2 Flux per mass (A)	pmol/(s*mg)	19,13	29,47	0,56	77,20	0,79	301,86	344,24	146,55
P6 Glu	P9	6 měsíců	O2 Flux per mass (A)	pmol/(s*mg)	16,44	26,60	0,01	76,98	0,32	291,27	329,15	154,66

### Pacient P6

Pacient	Pasáž	Věk	GI	GI (+ADP)	GII	GIV	GIV (+FCCP)	GI(+ADP)/GI	GI/GII	GIV/GI	GIV/GII
			GM-Rot	ADP-Rot	Su-AmA	A,T-Z	A,T,F-Z	ADP/GM	ADP/Su	A,T,F/ADP	A,T,F/Su
P6 Glu	P9	6 měsíců	18,57	28,91	76,41	155,31	197,69	1,557	0,378	6,837	2,587
P6 Glu	P9	6 měsíců	16,43	26,59	76,66	136,61	174,49	1,619	0,347	6,563	2,276
<b>Průměr P6 Glu</b>			<b>17,50</b>	<b>27,75</b>	<b>76,53</b>	<b>145,96</b>	<b>186,09</b>	<b>1,588</b>	<b>0,363</b>	<b>6,700</b>	<b>2,432</b>
<b>Sm. odchylka</b>			<b>1,07</b>	<b>1,16</b>	<b>0,12</b>	<b>9,35</b>	<b>11,60</b>	<b>0,031</b>	<b>0,016</b>	<b>0,137</b>	<b>0,155</b>

### Pacient P6

Pacient	Pasáž	Věk	Hodnota	Jednotka	GM	ADP	Rot	Su	AmA	A,T	A,T,F	Z
P6 Gal	P11	6 měsíců	O2 Flux per mass (A)	pmol/(s*mg)	23,15	33,97	0,37	96,26	1,79	315,92	378,75	37,78
P6 Gal	P15	6 měsíců	O2 Flux per mass (A)	pmol/(s*mg)	15,20	16,95	1,23	62,29	0,63	374,74	438,47	180,76

### Pacient P6

Pacient	Pasáž	Věk	GI	GI (+ADP)	GII	GIV	GIV (+FCCP)	GI(+ADP)/GI	GI/GII	GIV/GI	GIV/GII
			GM-Rot	ADP-Rot	Su-AmA	A,T-Z	A,T,F-Z	ADP/GM	ADP/Su	A,T,F/ADP	A,T,F/Su
P6 Gal	P11	6 měsíců	22,79	33,61	94,47	278,15	340,97	1,475	0,356	10,146	3,609
P6 Gal	P15	6 měsíců	13,97	15,72	61,66	193,97	257,70	1,125	0,255	16,395	4,179
<b>Průměr P6 Gal</b>			<b>18,38</b>	<b>24,66</b>	<b>78,07</b>	<b>236,06</b>	<b>299,34</b>	<b>1,300</b>	<b>0,305</b>	<b>13,270</b>	<b>3,894</b>
<b>Sm. odchylka</b>			<b>4,41</b>	<b>8,94</b>	<b>16,40</b>	<b>42,09</b>	<b>41,63</b>	<b>0,175</b>	<b>0,050</b>	<b>3,124</b>	<b>0,285</b>

## 8.8 Aktivita komplexů dýchacího řetězce

Aktivita enzymů dýchacího řetězce ve fibroblastech pacientů s primárními mitochondriálními onemocněními (P1-P10)

Pacient	Mutovaný gen	Enzym (nmol/(min*mg))					
		KI	KII	KI+III	KIV	CS	KIV/CS
P1	<i>SCO2</i>	59	18	23	20	51	0,39
P2	<i>SURF1</i>	-	-	-	<b>2</b>	47	<b>0,04</b>
P3	<i>SURF1</i>	42	13	33	<b>10</b>	59	<b>0,17</b>
P4	<i>SURF1</i>	-	-	-	<b>6</b>	54	<b>0,11</b>
P5	<i>SURF1</i>	51	15	-	<b>6</b>	47	<b>0,13</b>
P6	<i>ND1</i>	48	14	<b>9</b>	27	41	0,66
P7	<i>ND5</i>	37	23	14	35	74	0,47
P8	neznámý	29	7	-	<b>9</b>	31	0,29
P9	neznámý	37	10	-	<b>15</b>	37	0,41
P10	neznámý	30	12	-	21	52	0,40
<b>Kontrolní hodnoty</b>		15-50	5-15	10-30	18-40	25-70	0,28 - 0,55

Aktivita enzymů dýchacího řetězce ve fibroblastech pacientů s Huntingtonovou chorobou (P11-P18)

Pacient	Onemocnění	Enzym (nmol/(min*mg))					
		KI	KII	KIII	KIV	CS	KIV/CS
P11	HD	31	<b>9</b>	-	<b>11</b>	23	0,49
P12	HD	29	<b>5</b>	-	15	26	0,60
P13	HD	28	15	-	59	98	0,60
P14	HD	16	15	-	12	29	0,41
P15	HD	87	<b>6</b>	-	<b>8</b>	21	0,40
P16	HD	31	<b>10</b>	-	16	23	0,72
P17	HD	74	18	-	<b>9</b>	26	0,36
P18	HD	44	19	13	40	68	0,59
<b>Kontrolní hodnoty</b>		15-50	11-20	10-20	11-26	21-50	0,30 - 1,55

Aktivita enzymů dýchacího řetězce ve fibroblastech pacientů s poruchami metabolismu sirných aminokyselin (P19-P24)

Pacient	Mutovaný gen	Enzym (nmol/(min*mg))					
		KI	KII	KIII	KIV	CS	KIV/CS
<b>P19</b>	<i>MTHFR</i>	20	20	<b>9</b>	<b>16</b>	<b>43</b>	0,37
<b>P20</b>	<i>MTHFR</i>	27	28	17	29	70	0,42
<b>P21</b>	<i>CTH</i>	48	33	22	33	76	0,43
<b>P22</b>	<i>CTH</i>	81	27	16	34	76	0,45
<b>P23</b>	<i>CBS</i>	33	26	12	30	73	0,41
<b>P24</b>	<i>CBS</i>	87	35	26	34	66	0,51
<b>Kontrolní hodnoty</b>		15-50	5-15	10-30	18-40	45-70	0,28 - 0,55

## 8.9 Seznam prezentací na mezinárodních konferencích, kde byly použity výsledky diplomové práce

1. Rodinová M., Spáčilová J., Kratochvílová H., Sládková J., Marková M., Tesařová M., Mačáková M., Bohuslavová B., Juhásová J., Klempíř J., Lišková I., Hansíková H., Motlík J., Zeman J.: **Mitochondrial disturbances in peripheral tissues of patients with Huntington's disease and minipig model transgenic for the N-terminal part of human mutated huntingtin.** *EUROMIT 2014, 15-19 June, Tampere, Finland.*
2. Hansíková H, Rodinová M, Spáčilová J, Kratochvílová H, Sládková J, Marková M, Mačáková M, Bohuslavová B, Ellederová Z, Juhásová J, Lišková I, Klempíř J, Roth J, Motlík J, Zeman J. **Non-neural mitochondrial impairment in Huntington's disease patients and minipigs transgenic for the N-terminal part of human mutated huntingtin, 2014, JNNP, 85, suppl.1, A20-A21**  
*European Huntington's disease Network, 8th plenary Meeting, 19-21 September 2014, Hesperia Tower Convention Center, Barcelona, Spain ( poster)*
3. Kratochvílová H, Rodinová M, Spáčilová J, Ondrušková N, Marková M, Daňhelovská T, Valeková I, Hůlková H, Tesařová M, Juhásová J, Ellederová Z, Zeman J, Motlík J, Hansíková H. **Mitochondrial disturbances in fibroblasts of minipigs transgenic for the N-terminal part of human mutated huntingtin.** *Proceedings of the Opening Conference, COST Action BM1308, Sharing Advances on Large Animal Models, Gene Center, LMU Munich, December 15-17, 2014, P15*
4. Rodinová M., Marková M., Spáčilová J., Kratochvílová H., Hansíková H., Klempíř J., Lišková I., Zeman J. **Mitochondriální změny v kultivovaných kožních fibroblastech v souboru 15 pacientů s Huntingtonovou chorobou.** *30. pracovní dny: Dědičné metabolické poruchy, 20.-22. května 2015, Hotel Vista, Dolní Morava, Česká republika*