

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie



**Bc. Tereza Daňhelovská**

**Kapacita mitochondriálního energetického metabolismu  
v kultivovaných kožních fibroblastech**

Mitochondrial energy generating capacity in cultured skin fibroblasts

**Diplomová práce**

Vedoucí práce: Ing. Markéta Tesařová, Ph.D.

Praha, 2016

Laboratoř pro studium mitochondriálních poruch

Klinika dětského a dorostového lékařství 1. LF UK a VFN

Ke Karlovu 2, Praha 2

**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, 2. 5. 2016

Bc. Tereza Daňhelovská

Podpis

## **Poděkování**

Velmi ráda bych na tomto místě poděkovala své školitelce Ing. Markétě Tesařové, Ph.D. za pomoc a cenné rady nejen během sepisování práce, ale i během celého mého dosavadního působení v Laboratoři pro studium mitochondriálních poruch.

Dále bych moc ráda poděkovala vedoucí laboratoře, RNDr. Haně Hansíkové, CSc., za naučení celé metody „oxidace substrátu“, za nespočet konzultací jednotlivých výsledků, konzultací během sepisování práce a za přátelskou atmosféru, která v laboratoři panuje.

Nemůžu však zapomenout ani na celý kolektiv Laboratoře pro studium mitochondriálních poruch. Děkuji za vytvoření přátelské a pohodové atmosféry, za pomoc a mnoho cenných rad, které mi byly poskytnuty.

Nakonec bych ráda poděkovala své rodině a kamarádům za podporu v průběhu celého mého studia.

Práce byla podpořena následujícími granty a výzkumnými projekty: IGA MZ ČR IGA NT14156, GAČR 14-36804G, SVV 260256/2016 a RVO-VFN64165.

## Abstrakt

Mitochondriální onemocnění patří, se svojí incidencí 1:5000 živě narozených dětí, k jednomu z nejčastějších metabolických poruch. Jedná se o klinicky heterogenní skupinu chorob způsobenou mutacemi ve více než 250 genech. Diagnostika pacientů s podezřením na mitochondriální onemocnění obnáší celou řadu biochemických analýz. Jednou z nich je i analýza kapacity mitochondriálního energetického metabolismu (KMEM). Jedná se o sledování oxidace  $^{14}\text{C}$  značených substrátů pyruvátu, malátu a sukcinátu v sérii 10 inkubací, které obsahují různé donory a akceptory acetyl-CoA a inhibitory Krebsova cyklu. Výsledky analýzy KMEM nám podávají široké spektrum informací o mitochondriálním energetickém metabolismu daného jedince v konkrétní tkáni. V rámci diagnostiky pacientů s podezřením na mitochondriální onemocnění je KMEM stanovována v kosterním svalu. Cílem práce je optimalizovat metodu analýzy KMEM pro její využití v kultivovaných kožních fibroblastech. Celkem byla analýza KMEM v kultivovaných kožních fibroblastech provedena u 23 pacientů s primárním deficitem systému oxidativní fosforylace (OXPHOS), u 7 pacientů se sekundárním deficitem OXPHOS a u 15 kontrolních linií. Výsledky analýzy KMEM v kultivovaných kožních fibroblastech byly následně porovnány s výsledky spektrofotometrického měření aktivit jednotlivých komplexů OXPHOS ve fibroblastech a u vybraných pacientů s výsledky polarografie ve fibroblastech a s výsledky analýzy KMEM ve svalové tkáni. Výsledky ukázaly, že analýza KMEM je citlivější na detekci disbalance MEM oproti spektrofotometrii avšak sama o sobě není dostatečným nástrojem k diagnostice mitochondriálních poruch. K přesnější lokalizaci deficitu systému OXPHOS je nezbytná kombinace více biochemických metod.

**Klíčová slova:** kapacita mitochondriálního energetického metabolismu, kultivované kožní fibroblasty, mitochondrie, mitochondriální energetický metabolismus, mitochondriální onemocnění, systém oxidativní fosforylace

## **Abstract**

Mitochondrial disorders, with incidence 1:5000 live births children, are one of the most common metabolic diseases. Clinically, it is heterogeneous group of disorders caused by mutations in more than 250 genes. Diagnostic of patients with suspected mitochondrial disorder relies on broad spectrum of biochemical analysis. One of them is a measurement of Mitochondrial Energy Generating Capacity (MEGC). The principle of MEGC analysis is measuring oxidations rate of  $^{14}\text{C}$  – labeled substrates in 10 different incubations. These incubations contain  $[1-^{14}\text{C}]$ pyruvate,  $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ malate or  $[1,4-^{14}\text{C}]$ succinate, donors and acceptors of Acetyl-CoA and inhibitors of TCA cycle. The results of MEGC analysis provide a variety of information about mitochondrial energy metabolism (MEM) of individual in particular tissue. In diagnostic of patients with suspected mitochondrial disorder is MEGC routinely determined in skeletal muscle. The aim of this study is to optimize MEGC analysis for its use in cultures skin fibroblasts. In sum, MEGC analysis was performed in 23 patients with primary deficiency of oxidative phosphorylation (OXPHOS), in 7 patients with secondary deficiency of OXPHOS and in 15 controls cell lines. The results of MEGC in cultured skin fibroblasts were then compared with results of spectrophotometric measurement of activity OXPHOS enzymes in fibroblasts and with selected patients the results of MEGC were compared with results of polarography in fibroblasts and with results of MEGC in skeletal muscle. In conclusion, MEGC analysis is more sensitive to detect disruption of MEM compared with spectrophotometry but only MEGC analysis is not sufficient for diagnostic of mitochondrial disorders. For more precise localization of OXPHOS deficiency, data obtained by several biochemical methods are necessary.

**Key words:** mitochondrial energy generating capacity, cultured skin fibroblasts, mitochondrion, mitochondrial energy metabolism, mitochondrial disorders, system of oxidative phosphorylation

# Obsah

1. Seznam zkratk	1
2. Teoretický úvod	6
2.1. Mitochondrie	6
2.2. Systém oxidativní fosforylace	8
2.2.1. Komplex I (NADH:ubichinonoxidoreduktáza)	8
2.2.2. Komplex II (sukcinát:ubichinonoxidoreduktáza)	8
2.2.3. Komplex III (cytochrom <i>bc1</i> komplex)	9
2.2.4. Komplex IV (cytochrom <i>c</i> oxidáza)	10
2.2.5. Mobilní přenašeče koenzym Q a cytochrom <i>c</i>	10
2.2.6. F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> ATP syntáza	11
2.2.7. Superkomplexy	13
2.3. Pyruvátdehydrogenázový komplex a Krebsův cyklus	14
2.4. Mitochondriální onemocnění	16
2.4.1. Vybraná primární mitochondriální onemocnění	17
2.4.2. Vybraná sekundární mitochondriální onemocnění	24
2.5. Diagnostika mitochondriálních onemocnění	27
2.5.1. Kapacita mitochondriálního energetického metabolismu	28
3. Cíle diplomové práce	32
4. Materiál a metody	33
4.1. Materiál	33
4.1.1. Soubor linií kultivovaných kožních fibroblastů	33
4.1.2. Použité chemikálie	40
4.1.3. Použité přístroje	42
4.2. Metody	44
4.2.1. Kultivace fibroblastů	44
4.2.2. Sklizení fibroblastů pro účely měření KMEM	44
4.2.3. Měření kapacity mitochondriálního energetického metabolismu	45
4.2.4. Stanovení koncentrace proteinu dle Lowryho	46
4.2.5. Stanovení aktivity citrátsyntázy (CS)	47
5. Výsledky	48
5.1. Optimalizace metody KMEM ve fibroblastech	48
5.1.1. Závislost aktivity na množství proteinu v metodě analýzy KMEM	48
5.1.2. Vliv věku pacientů na KMEM	49
5.2. Identifikace poruch OXPHOS na úrovni kultivovaných kožních fibroblastů pomocí metody KMEM	51
5.2.1. Analýza KMEM u pacientů s primární mitochondriální poruchou	51

5.2.2. Analýza KMEM u pacientů se sekundární mitochondriální poruchou (HD) .....	63
6. Diskuze .....	65
6.1. KMEM u pacientů s primárním deficitem OXPHOS .....	67
6.1.1. Pacienti s poruchou komplexu I.....	67
6.1.2. Pacienti s poruchou komplexu IV .....	69
6.1.3. Pacienti s poruchou $F_1F_0$ ATP syntázy .....	70
6.1.4. Pacienti s kombinovanou poruchou OXPHOS .....	71
6.1.5. Porovnání výsledků analýzy KMEM mezi různými primárními mitopatiemi .....	73
6.2. KMEM u pacientů se sekundárním deficitem OXPHOS .....	75
6.3. Porovnání výsledků KMEM v kosterním svalu a v kultivovaných kožních fibroblastech od vybraných pacientů s deficitem OXPHOS .....	77
6.4. Porovnání výsledků analýzy KMEM s výsledky polarografie v kultivovaných kožních fibroblastech od vybraných pacientů s deficitem OXPHOS .....	78
7. Souhrn.....	81
8. Literatura.....	83
9. Přílohy.....	91

## 1. Seznam zkratek

$A_{\text{kat}}, A_{\text{m}}, A_{\text{p}}, A_{\text{s}}, A_{\text{v}}$	katalytická aktivita, aktivita malátu, aktivita pyruvátu, aktivita sukcinátu, aktivita vzorku
ADP, ATP	adenosindifosfát, adenosintrifosfát
ANT	adeninnukleotidový přenašeč
APOPT1	apoptogenický protein 1
Ap5A	$p^1, p^5$ -di(adenosin-5')pentafošfát
Atp12	asemblační faktor $F_1F_0$ ATP syntázy
BCS	tekutý scintilační koktejl
BN-PAGE	modrá nativní elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
bp	pár bází
BSA	hovězí sérový albumin
c	koncentrace proteinu (jednotka [mg/ml])
CAG	triplet cytosin, adenin, guanin; kodon pro glutamin
CCCP	karbonylkyanid 3-chlorofenylhydrazon
CoA	koenzym A
COA3, COA5	asemblační faktor cytochrom <i>c</i> oxidázy 3, 5
CoQ	koenzym Q
COX1, COX2, COX3	podjednotky cytochrom <i>c</i> oxidázy, kódované mitochondriální DNA
COX10, 14, 15, 20	asemblační faktory cytochrom <i>c</i> oxidázy
CS	citrátsyntáza
$\text{Cu}_A, \text{Cu}_B$	$\text{Cu}^{2+}$ redoxní centra cytochrom <i>c</i> oxidázy
cyt <i>b</i>	podjednotka cytochrom <i>bc1</i> komplexu, kódovaná mitochondriální DNA
cyt <i>c</i> , cyt <i>c</i> <sub>1</sub>	cytochrom <i>c</i> ; cytochrom <i>c</i> <sub>1</sub> podjednotka cytochrom <i>bc1</i> komplexu
Da	Dalton, jednotka relativní molekulové hmotnosti $1 \text{ Da} = 1,660\,539 \times 10^{-27} \text{ kg}$
DAPIT	protein asociující s $F_1F_0$ ATP syntázou, z anglického Diabetes-Associated Protein in Insulin-sensitive Tissue



DMEM	Dulbecco's Modified Eagle medium
DMSO	dimethylsulfoxid
DPM	počet rozpadů radionuklidu za minutu, míra radioaktivity měřená scintilačním počítačem, z anglického Disintegrations per minute
DRP1	dynaminu příbuzný protein 1, z anglického dynamin-related protein 1
dThd	thymidin
DTNB	Ellmanovo činidlo, kyselina 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová
e <sup>-</sup>	elektron
E <sub>1</sub> , E <sub>2</sub> , E <sub>3</sub>	pyruvát dehydrogenáza, dihydrolipoyltransacetyláza, dihydrolipoyldehydrogenáza, enzymy pyruvátdehydrogenázového komplexu
ECACC	Evropský depozitář buněčných kultur, z anglického European Collection of Cell Cultures
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
ETHE1	ethylmalonový encefalopatický protein 1, mitochondriální sirná dioxygenáza
F	kultivované kožní fibroblasty
FAD, FADH <sub>2</sub>	flavinadenindinukleotid (oxidovaná, redukována forma)
FBS	fetální hovězí sérum
FH	fumaráthydratáza
FIS1	protein mitochondriálního dělení 1, z anglického fission 1
GFM1	mitochondriální elongační faktor G1
GTP	guanosintrifosfát
HD	Huntingtonova choroba, z anglického Huntington disease
hem <i>a</i> , hem <i>a</i> <sub>3</sub>	hemová centra cytochrom <i>c</i> oxidázy
ink	inkubace analýzy KMEM
iFBS	inaktivované fetální hovězí sérum

K	kontrola
KC	Krebsův cyklus
KH	kontrolní hodnota
KI	komplex I, NADH:ubichinonoxidoreduktáza
KII	komplex II, sukcinát:ubichinonoxidoreduktáza
KIII	komplex III, cytochrom <i>bc1</i> komplex, ubichinol:cytochrom <i>c</i> oxidoreduktáza
KIV	komplex IV, cytochrom <i>c</i> oxidáza
KMEM	kapacita mitochondriálního energetického metabolismu
KTEA	roztok chloridu draselného, Tris/HCl, ethylendiamintetraoctové kyseliny a aprotininu
KV	komplex V, F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> ATP syntáza
LHON	Leberova dědičná optická neuropatie
LRPPRC	mRNA vázající protein zapojený do exprese mitochondriální DNA, z anglického Leucine-Rich Pentatricopeptide Repeat Cassette
m	měsíc
M	muž
MELAS	mitochondriální encefalopatie, laktátová acidóza a iktu podobné příhody, z anglického Mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes
MEM	mitochondriální energetický metabolismus
MFN1, MFN2	mitofusin 1, mitofusin 2
mHtt	mutovaný huntingtin
MK	mastná kyselina
MLQ	6,8 kDa velký proteolipid, protein asociující s ATP syntázou
mtDNA	mitochondriální deoxyribonukleová kyselina
<i>MT-ATP6</i> , <i>MT-ATP8</i>	geny pro podjednotky a a A6L F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> ATP syntázy
MTFMT	mitochondriální methionyl-tRNA formyltransferáza
MTND1–6, MTND4L	podjednotky komplexu I, kódované mtDNA

<i>MT-TL1</i>	gen pro mitochondriální tRNA pro leucin
n	počet měření
NA	nebylo analyzováno
NAD, NADH	nikotinamidadeninukleotid (oxidovaná, redukovaná forma)
nDNA	jaderná deoxyribonukleová kyselina
OMIM	internetová databáze lidských genů a genetických onemocnění, z anglického Online Mendelian Inheritance in Man ( <a href="http://www.omim.org">www.omim.org</a> )
OPA1	protein mitochondriálního mezimembránového prostoru, jehož mutace způsobuje optickou atrofii 1
OXPHOS	systém oxidativní fosforylace
P	pacient
PBS	fyzilogický roztok pufovaný fosfáty
PDHc	pyruvátdehydrogenázový komplex
PET100	protein účastnící se biogeneze cytochrom <i>c</i> oxidázy
POLG	mitochondriální DNA polymeráza $\gamma$
prot	protein
Q, QH <sub>2</sub> , Q <sup>-</sup>	ubichinon (koenzym Q), ubichinol (hydroubichinol), (oxidovaná, redukovaná forma koenzymu Q); semiubichinonový radikál
r	rok
ROS	volné kyslíkové radikály, z anglického reactive oxygen species
RT	pokojová teplota, z anglického room temperature
S	svalová tkáň
SA	specifická aktivita
SCO1, SCO2	asemblační faktory cytochrom <i>c</i> oxidázy
SDH	sukcinátdehydrogenáza
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného
SPR	spektrofotometrické měření aktivit jednotlivých komplexů OXPHOS

SURF1	asembační faktor cytochrom <i>c</i> oxidázy, z anglického Surfeit protein 1
t	týden
T + E	roztok trypsinu a ethylendiamintetraoctové kyseliny
TACO1	translační aktivátor COX1 podjednotky cytochrom <i>c</i> oxidázy
TMEM70	transmembránový protein 70, asemblační faktor F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> ATP syntázy
TPP	thiaminpyrofosfát
<i>TSFM</i>	gen pro mitochondriální translační elongační faktor Ts (EFTs)
<i>TUFM</i>	gen pro mitochondriální translační elongační faktor Tu (EFTu)
TYMP	thymidinfosforyláza
V	objem
VDAC	mitochondriální porin, z anglického Voltage Dependent Anion Channel
Ž	žena
α, β, γ, δ, ε, a, b, c, d, e, f, g, F6, A6L a OSCP	podjednotky F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> ATP syntázy
α-KGD	α-ketoglutarátdehydrogenáza
$\bar{A}$	průměrná aktivita
†	úmrť

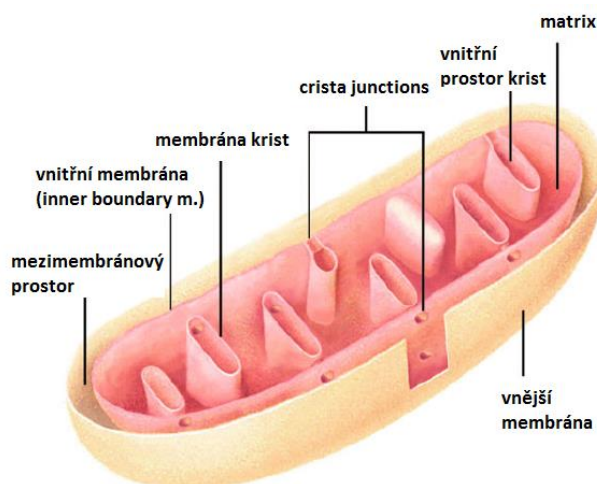
## 2. Teoretický úvod

### 2.1. Mitochondrie

Mitochondrie jsou buněčné organely mající v eukaryotické buňce mnoho důležitých funkcí. Na rozdíl od ostatních organel živočišné buňky si nesou vlastní genetickou informaci. Vznikly endosymbiózou  $\alpha$ -proteobakterií před více než dvěma miliardami let (Gray, 2012; Yang et al., 1985). Od té doby prošly mitochondrie rozsáhlou evolucí a většina genů, která byla dříve součástí mitochondriálního genomu, přešla do jádra. Mitochondriální DNA (mtDNA) si zachovala pouze 37 genů. Jedná se o geny pro 13 proteinů dýchacího řetězce, 2 rRNA (12S rRNA a 16S rRNA) a 22 tRNA. Lidská mtDNA je cirkulární molekula, nese 16 569 bp a je obsažena v buňce až v tisíci kopiích (Anderson et al., 1981).

Mitochondrie jsou oválného tvaru, přibližně 0,5  $\mu\text{m}$  široké a 1–2  $\mu\text{m}$  dlouhé. Jejich velikost a tvar se liší v závislosti na tkáni, v které se nachází. V buňce se nevyskytují jako izolované organely, tvoří vysoce dynamickou síť.

Díky specifickému původu (endosymbióze  $\alpha$ -proteobakterií) mají mitochondrie dvě membrány, vnější a vnitřní. Mezi vnější a vnitřní membránou najdeme mezimembránový prostor, vnitřní prostor mitochondrie nazýváme matrix. Dále v mitochondriích nacházíme kristy, struktury připomínající napuchlé váčky (cisterny). Tyto kristy jsou mezi sebou a s vnitřní mitochondriální membránou pospojovány pomocí tubulů (crista junctions), obrázek 1. Tento pohled na strukturu mitochondrie („crista junction model“) nahradil díky elektron-mikroskopické tomografii dřívější Paladeho model (Palade, 1952).



**Obrázek 1: Crista junction model struktury mitochondrie.** Mitochondrie se skládají ze dvou membrán, vnější a vnitřní, mezi těmito membránami se nachází mezimembránový prostor, vnitřní prostor mitochondrie nazýváme matrix. Dále v mitochondriích nacházíme křisty, které jsou s vnitřní mitochondriální membránou spojeny pomocí tzv. crista junctions (převzato a upraveno podle (Logan, 2006)).

Nejdůležitější funkcí mitochondrie je přeměna energie. Dochází k ní na vnitřní mitochondriální membráně procesem zvaným oxidativní fosforylace. Tvorba ATP však není jedinou úlohou mitochondrií. Mitochondrie se podílí na homeostázi  $\text{Ca}^{2+}$ , termogenezi, metabolismu aminokyselin, mastných kyselin (MK) a steroidů. Je to klíčové místo organizované buněčné smrti (apoptózy), některých druhů buněčné signalizace či místo tvorby reaktivních forem kyslíku (ROS) (Venditti et al., 2013). V matrix mitochondrie probíhá Krebsův cyklus, série reakcí, při kterých dochází k tvorbě redukovaných koenzymů NADH a  $\text{FADH}_2$ . Ty jsou následně využity dýchacím řetězcem k tvorbě ATP. V mitochondriální matrix se dále nachází mtDNA a kompletní mašinerie syntézy mitochondriálních proteinů (DNA a RNA polymerázy, ribosomy, molekuly tRNA, nukleotidy i aminokyseliny). Probíhá zde oxidace MK, pyruvátu, část ornitinového cyklus či biosyntéza hemu. Vnější membrána obsahuje poriny (voltage-dependent anion channel (VDAC)), které umožní volný průchod molekulám do velikosti 5 kDa, zatímco transport přes vnitřní membránu je kontrolován specifickými transportními přenašeči (Valsecchi et al., 2010).

## 2.2. Systém oxidativní fosforylace

Systém oxidativní fosforylace je lokalizován ve vnitřní mitochondriální membráně. Skládá se ze 4 enzymů dýchacího řetězce (komplex I–IV), dvou mobilních přenašečů (koenzym Q a cytochrom *c*) a ATP syntázy (obrázek 3). Průchodem elektronů, pocházejících z redukovaných koenzymů (NADH a FADH<sub>2</sub>) přes enzymy dýchacího řetězce dochází k tvorbě protonového gradientu, který je následně využit F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP syntázou k tvorbě ATP.

### 2.2.1. Komplex I (NADH:ubichinonoxidoreduktáza)

NADH:ubichinonoxidoreduktáza (KI, EC 1.6.5.3) je prvním a největším enzymem dýchacího řetězce. U savců je tvořena 44 podjednotkami, z toho sedm podjednotek (MTND1–MTND6 a MTND4L) je kódováno mtDNA. Přenáší 2 elektrony z NADH přes osm železo-sirných center na ubichinon. Přenosem elektronu z vyššího do nižšího energetického stavu dochází k uvolnění energie, která je použita na přenos 4 protonů z matrix do mezimembránového prostoru. Tvoří se tak proton-motivní síla, která je následně využita ATP syntázou pro tvorbu ATP.

Komplex I je tvořen 14 esenciálními podjednotkami. Jejich homology najdeme i v prokaryotickém organismu a jsou nazývány jako „minimum enzymu“. Jedná se o katalytické podjednotky, které přenáší elektrony z NADH na ubichinon a generují tak membránový potenciál. Sedm z těchto podjednotek je zabudováno ve vnitřní mitochondriální membráně, jedná se tedy o podjednotky hydrofobní (MTND podjednotky) a jsou kódovány mtDNA. Zbýlých sedm podjednotek je hydrofilních a tvoří redoxní část sahající do mitochondriální matrix. Těchto 14 podjednotek dohromady tvoří tvar připomínající písmeno L. Zbýlých 33 podjednotek je tzv. nadpočetných, mezi jednotlivými druhy se liší a jejich funkce není zcela známá. Některé mají zřejmě úlohu v assemblaci, regulaci a stabilizaci komplexu či chrání proti reaktivním formám kyslíku (ROS) (Hirst, 2013).

### 2.2.2. Komplex II (sukcinát:ubichinonoxidoreduktáza)

Sukcinát:ubichinonoxidoreduktáza (KII, EC 1.3.5.1) má svojí úlohu jak v dýchacím řetězci, tak v Krebsově cyklu (KC) jakožto sukcinátdehydrogenáza (SDH). Je tvořena 4 podjednotkami, z nichž ani jedna není kódována mtDNA. Katalyzuje oxidaci sukcinátu na fumarát za současné redukce FAD. Elektrony přechází

z redukovaného FAD (FADH<sub>2</sub>) přes tři železo-sírná centra na ubichinon (Hägerhäll, 1997). Komplex II je jediným enzymem dýchacího řetězce, který nepřenáší protony přes vnitřní mitochondriální membránu.

Komplex II je heterodimer obsahující podjednotku A s kovalentně vázaným FAD a podjednotku B, která nese tři železo-sírná centra. Dále pak podjednotku C a podjednotku D. Podjednotky A a B tvoří enzymatickou část komplexu, zatímco podjednotky C a D kotví komplex do vnitřní mitochondriální membrány (Sun et al., 2005).

### 2.2.3. Komplex III (cytochrom *bc1* komplex)

Cytochrom *bc1* komplex (KIII, EC1.10.2.2) nebo též ubichinon:cytochrom *c* oxidoreduktáza je tvořen 11 podjednotkami, z nichž jedna (cyt *b*) je kódována mtDNA. Jejím úkolem je přenášet elektrony z redukovaného koenzymu Q (CoQ) na cytochrom *c* za současného přenosu 4 protonů/4e<sup>-</sup> z matrix do mezimembránového prostoru (Diaz et al., 2011).

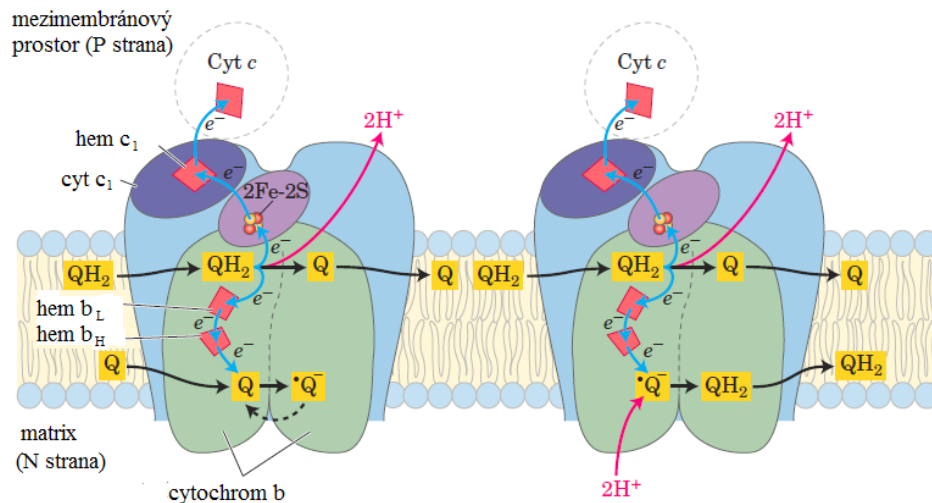
Jedná se o homodimer, kdy každý z monomerů obsahuje tři katalytické podjednotky: Rieskeho železosírný protein, nízko a vysoce kapacitní cytochrom *b* a cytochrom *c*<sub>1</sub> (Robertson et al., 1993) a osm strukturních podjednotek.

#### 2.2.3.1. Q cyklus

Transport elektronů komplexem III probíhá pomocí tzv. Q cyklu (obrázek 2), během kterého dochází k oxidaci ubichinolu (QH<sub>2</sub>) na ubichinon (Q) za současné redukce 2 molekul cytochromu *c* (cyt *c*).

Z QH<sub>2</sub> se uvolní dva elektrony, první z nich putuje přes Rieskeho železosírný protein na cytochrom *c* a dále na komplex IV, druhý přechází přes hemy *b*<sub>L</sub> a *b*<sub>H</sub> až k ubichinonu, kde dochází k redukci na semiubichinonový radikál (Q<sup>•</sup>). Následně se cyklus opakuje, dojde k redukci dalšího cyt *c* a semiubichinon je redukován na ubichinon. Během tohoto procesu dojde k transportu 4H<sup>+</sup> z matrix do mezimembránového prostoru (Iwata et al., 1998).





**Obrázek 2: Schéma Q cyklu.** Z ubiquinonu (QH<sub>2</sub>) se uvolní dva elektrony. První putuje přes Rieskeho [2Fe-2S] protein a hem *c*<sub>1</sub> na cytochrom *c*. Druhý elektron putuje přes hemy *b*<sub>L</sub> a *b*<sub>H</sub> na ubiquinon a dojde k tvorbě semiubichinonového radikálu (Q<sup>•</sup>). V druhé fázi se celý cyklus opakuje, opět jeden elektron putuje na cytochrom *c* a druhý redukuje Q<sup>•</sup> na ubiquinol (převzato a upraveno podle (Nelson et al., 2008)).

#### 2.2.4. Komplex IV (cytochrom *c* oxidáza)

Posledním enzymem dýchacího řetězce je cytochrom *c* oxidáza (KIV, EC1.9.3.1). Jedná se o homodimer a každý monomer je tvořen 14 podjednotkami (Balsa et al., 2012), z toho tři jsou kódovány mtDNA. Přenáší elektrony z cytochromu *c* na kyslík za současného vzniku molekuly vody a zároveň dochází k přenosu čtyř protonů z matrix do mezimembránového prostoru. Jedná se o hlavní regulační enzym elektron-transportního řetězce (Srinivasan and Avadhani, 2012).

Katalytické jádro enzymu je tvořeno třemi podjednotkami, které jsou kódovány mtDNA. Jedná se o podjednotky COX1, COX2, COX3. Tyto podjednotky nesou dvě hemové (hem *a*, hem *a*<sub>3</sub>) a dvě Cu<sup>2+</sup> redoxní centra (Cu<sub>A</sub>, Cu<sub>B</sub>). Zbylé podjednotky jsou kódovány jadernou DNA (nDNA) a jejich role je stabilizace, asemblace a regulace cytochrom *c* oxidázy (Srinivasan and Avadhani, 2012).

#### 2.2.5. Mobilní přenašeče koenzym Q a cytochrom *c*

Elektron-transportní řetězec obsahuje dva mobilní přenašeče, koenzym Q a cytochrom *c*. V případě koenzymu Q, neboli ubiquinonu se jedná o lipofilní molekulu, která se vyskytuje ve všech typech tkání a buněk. Jde o izoprenoidní koenzym, kdy se délka izoprenoidního řetězce liší mezi jednotlivými tkáněmi. Lidský koenzym Q obsahuje 10 izoprenylových podjednotek, proto se též nazývá koenzym Q<sub>10</sub>. Koenzym Q přenáší elektrony z prvního a druhého komplexu dýchacího řetězce na komplex III.

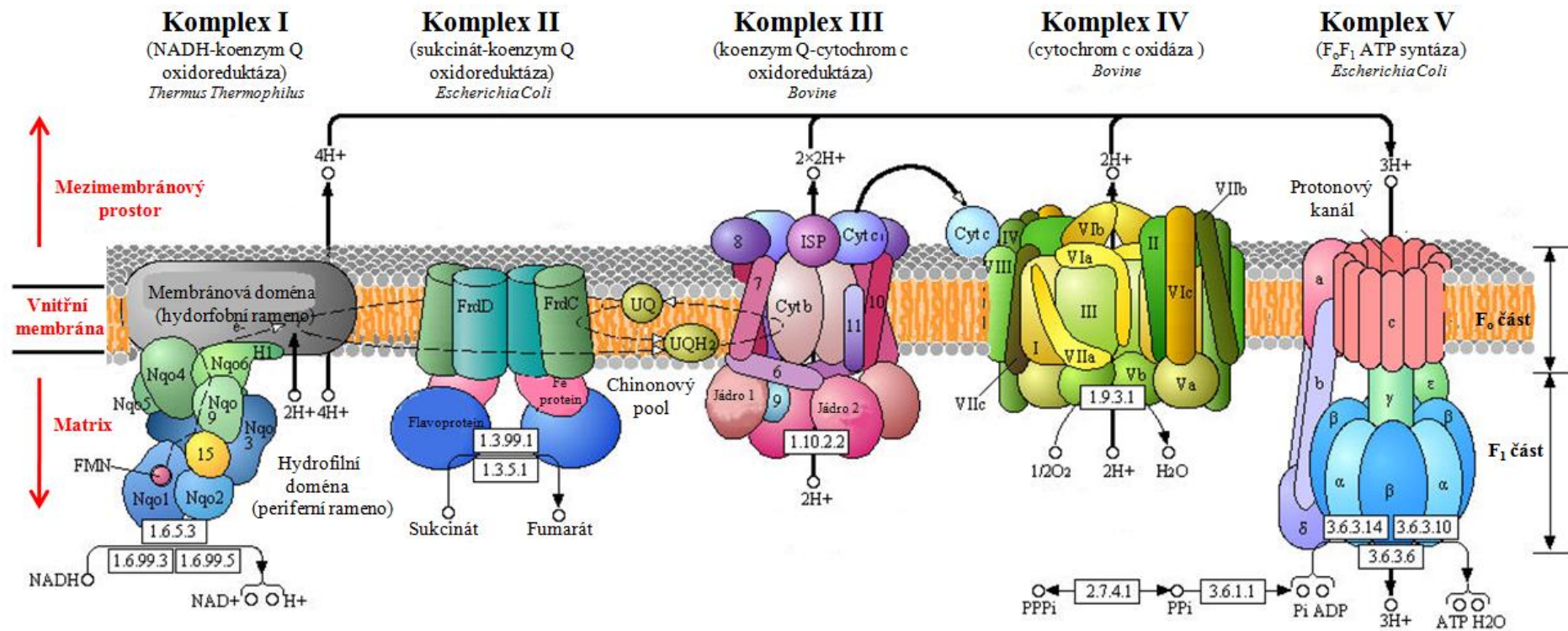
Jeho funkce je i antioxidační, vycytává značné množství ROS (Quinzii and Hirano, 2010; Turunen et al., 2004). V případě cyt *c* se jedná o malý, ve vodě rozpustný protein vnitřní mitochondriální membrány. Jeho úkolem je přenos elektronů z komplexu III na cytochrom *c* oxidázu. Dále pak hraje důležitou roli při stimulaci kaspáz během programované buněčné smrti (Nelson et al., 2008).

#### 2.2.6. $F_1F_0$ ATP syntáza

$F_1F_0$  ATP syntáza (EC 3.6.3.14) využívá energii vytvořenou elektron-transportním řetězcem k tvorbě ATP a je často označována jako pátý komplex (KV) dýchacího řetězce. Skládá se ze dvou funkčních domén. Membránové  $F_0$ , pojmenované podle její citlivosti k oligomycinu (specifický inhibitor ATP syntázy) a matrixové  $F_1$  části. Je tvořena dohromady 11 podjednotkami ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ , a, b, c, d, F6 a OSCP) z toho dvě (podjednotka a a A6L) jsou kódované mtDNA.

$F_1$  doména je tvořena z  $\alpha\beta$  hexameru a podjednotek  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ , které tvoří centrální stonek.  $F_0$  doména je tvořena z c oligomeru (v případě savců je c kruh tvořen osmi c podjednotkami (Watt et al., 2010)), periferní stopky (tvořené podjednotkami a, b, F6 a OSCP) a dále pak čtyřmi podjednotkami přídavnými (e, f, g a A6L) (Jonckheere et al., 2012).

Mezi nově objevené proteiny asociující s ATP syntázou patří DAPIT (z anglického Diabetes-Associated Protein in Insulin-sensitive Tissue) a 6,8 kDa velký proteolipid (MLQ) (Hejzlarová et al., 2014). Dále též transmembránový protein 70 (TMEM70), který hraje roli v časně fázi assemblace ATP syntázy a chybí-li, je syntéza enzymu silně inhibována (Čížková et al., 2008).

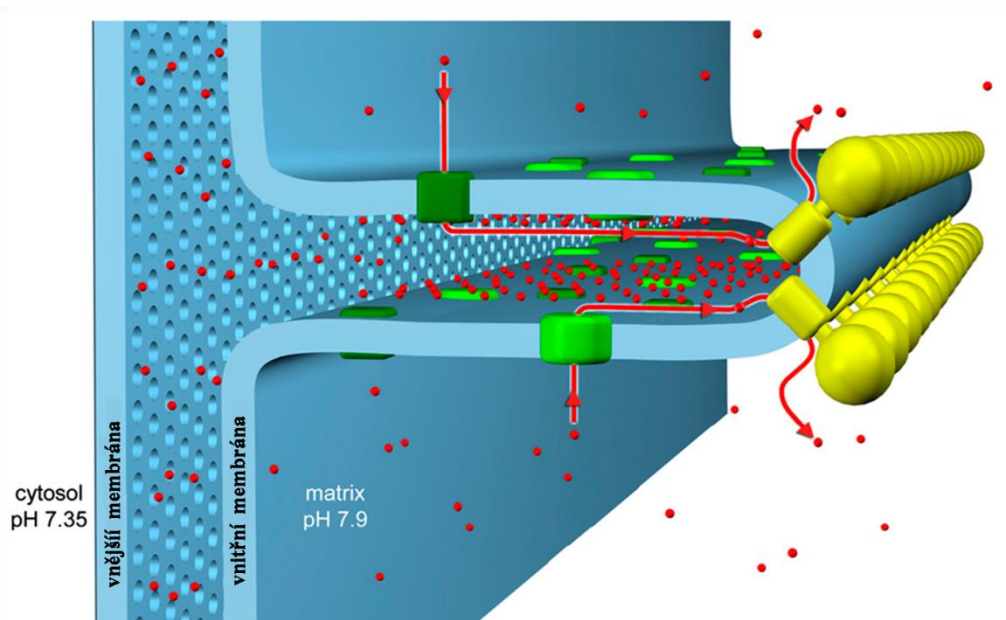


**Obrázek 3: Schématické znázornění jednotlivých komplexů systému OXPHOS.** Na obrázku jsou zobrazeny jednotlivé komplexy OXPHOS (NADH:ubichinon-oxidoreduktáza, sukcinát:ubichinonoxidoreduktáza, cytochrom *bc1* komplex, cytochrom *c* oxidáza a F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP syntáza). Tučnými černými šipkami je znázorněn přenos protonů přes vnitřní mitochondriální membránu z matrix do mezimembránového prostoru (komplex I, III a IV). Ten je následně využit ATP syntázou k tvorbě ATP. Dále jsou zde zobrazeny podjednotky jednotlivých komplexů systému OXPHOS, kyslík jako cílový akceptor elektronů z redukováných koenzymů, elektronové přenašeče (koenzym Q a cytochrom *c*) a podjednotky ATP syntázy (převzato a upraveno podle (Granata et al., 2009; Marková, 2015)).

### 2.2.7. Superkomplexy

V posledních letech bylo zjištěno, že komplexy systému OXHOS se na vnitřní mitochondriální membráně nevyskytují jako jednotlivé komplexy, ale tvoří tzv. superkomplexy. Existence enzymů OXPHOS v podobě superkomplexů je výhodná hned z mnoha důvodů. Dochází tak k účinnějšímu směřování substrátů, stabilizaci jednotlivých komplexů, i k menšímu úniku elektronů a s tím spojené produkci ROS (Schägger, 2001; Schägger et al., 2004; Winge, 2012).

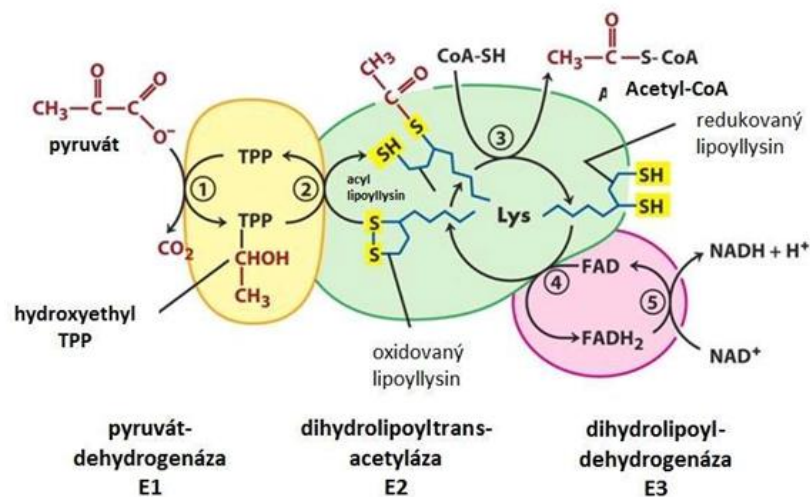
Superkomplexy tvoří KI, KIII, KIV a KV. Komplex II se nejspíše tvorby těchto struktur neúčastní (Lapiente-Brun et al., 2013). Tento fakt může být způsoben tím, že se tento enzym nepodílí pouze na oxidativní fosforylaci v rámci dýchacího řetězce, ale je i jedním z enzymů KC. U člověka jsou superkomplexy tvořeny nejčastěji KI+KIII (tuto strukturu označujeme jako respirasom), dále se pak často podílí na tvorbě superkomplexu i KIV (Schägger et al., 2004). Tvorba superkomplexů spolu s  $F_1F_0$  ATP syntázou, která se vyskytuje ve formě dimeru na konci krist (obrázek 4), umožňuje tvorbu lokálního gradientu protonů, který je pak efektivně využit k tvorbě ATP (Davies et al., 2011).



**Obrázek 4: Dimerizovaná ATP syntáza na konci krist.** Dimery ATP syntázy jsou znázorněny žlutě, komplexy dýchacího řetězce zeleně a červeně jsou znázorněny protony, které jsou pumpovány komplexy I, III a IV do oblasti mitochondriálních krist a následně využity ATP syntázou k tvorbě ATP (převzato a upraveno podle (Davies et al., 2011)).

## 2.3. Pyruvátdehydrogenázový komplex a Krebsův cyklus

Pyruvátdehydrogenázový komplex (PDHc) je multienzymatický komplex mitochondriální matrix, katalyzující přeměnu pyruvátu na acetyl-CoA a  $\text{CO}_2$ . Acetyl-CoA pak vstupuje do Krebsova cyklu i dalších metabolických drah. Pyruvátdehydrogenázový komplex se skládá ze tří enzymů (pyruvátdehydrogenáza ( $\text{E}_1$ , EC 1.2.4.1.), dihydrolypoyltransacetyláza ( $\text{E}_2$ , EC 2.3.1.12) a dihydrolypoyldehydrogenáza ( $\text{E}_3$ , EC 1.8.1.4) a pěti kofaktorů (thiaminpyrofosfát (TPP), flavinadenindinukleotid (FAD), koenzym A (CoA), nikotinamid-adenindinukleotid (NAD) a lipoát), (obrázek 5).

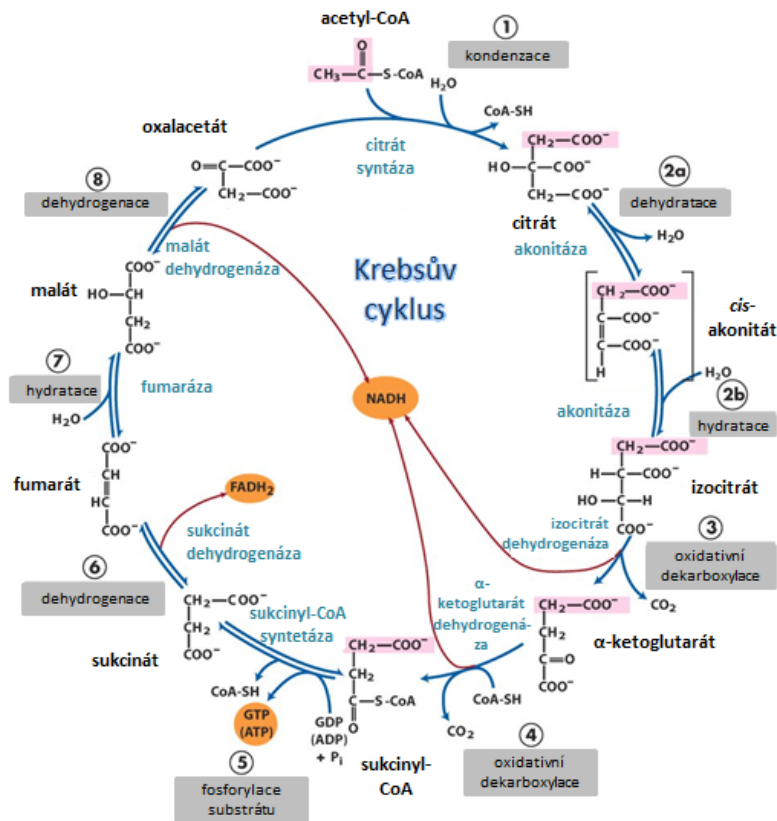


**Obrázek 5: Pyruvátdehydrogenázový komplex (PDHc):** PDH komplex (PDHc) se skládá ze tří enzymů: pyruvátdehydrogenázy ( $\text{E}_1$ ) s navázaným kofaktorem thiaminpyrofosfátem (TPP), dihydrolypoyltransacetylázy ( $\text{E}_2$ ), která kovalentně váže lipoylové skupiny a dihydrolypoyldehydrogenázy ( $\text{E}_3$ ) s kofaktory FAD a NAD (převzato a upraveno podle (Nelson et al., 2008)).

K přeměně pyruvátu na acetyl-CoA dochází v pěti krocích. První z nich probíhá v  $\text{E}_1$ , který katalyzuje dekarboxylaci pyruvátu, vzniká hydroxyethyl-TPP a následně  $\text{E}_1$  v druhém kroku oxiduje hydroxyethylovou skupinu na acetylovou za současné redukce lipoátu na dihydrolipoát. Též dojde k vyvázání TPP. Ve třetím kroku dochází k přenesení acetylu z dihydrolipoátu na CoA pomocí enzymu  $\text{E}_2$ . Kroky 4 a 5 slouží k regeneraci enzymu. Ve čtvrtém kroku se reoxiduje dihydrolipoát na lipoát a současně vzniká  $\text{FADH}_2$ .  $\text{FADH}_2$  je poté v pátém kroku oxidován pomocí  $\text{NAD}^+$  zpět na FAD a dochází tak k přenosu elektronů z FAD na  $\text{NAD}^+$  (obrázek 5) (Nelson et al., 2008).

Krebsův cyklus, nebo též cyklus trikarboxylových kyselin či citrátový cyklus je série osmi reakcí, odehrávajících se u eukaryot v mitochondriální matrix, během kterých

dochází k postupné dekarboxylaci citrátu a vytváření redukovaných koenzymů NADH a FADH<sub>2</sub>. Ty jsou následně využity jako zdroj elektronů komplexu dýchacího řetězce. Krebsův cyklus však hraje roli i v mnoha dalších metabolických pochodech buňky, například v glukoneogenezi či metabolismu aminokyselin.



**Obrázek 6: Schéma Krebsova cyklu:** První reakcí je kondenzace oxalacetátu a acetyl-CoA na citrát pomocí enzymu citrát syntázy (CS). Citrát je následně přeměněn na izocitrát v sérii dvou reakcí (dehydratace a hydratace). Poté dojde k oxidativní dekarboxylaci pomocí enzymu izocitrát dehydrogenázy, vzniká α-ketoglutarát, CO<sub>2</sub> a NADH. α-ketoglutarát je oxidativně dekarboxylován α-ketoglutarát dehydrogenázovým komplexem, vzniká sukcinyl-CoA, druhá molekula CO<sub>2</sub> a druhá molekula NADH. Následně dochází k fosforylaci enzymem sukcinyl-CoA syntetázou a vzniká GTP (ATP) a sukcinát. Sukcinát je dehydrogenován na fumarát pomocí sukcinát dehydrogenázy, vzniká FADH<sub>2</sub> a v následující reakci je fumarát hydratován na malát pomocí enzymu fumarázy. Během poslední reakce KC dojde k dehydrogenaci malátu pomocí malát dehydrogenázy na oxalacetát, vzniká třetí NADH a celý cyklus se uzavírá (převzato a upraveno podle (Nelson et al., 2008)).

Vstupním substrátem Krebsova cyklu je acetyl-CoA, ten je v reakci spolu s oxalacetátem kondenzován na citrát pomocí enzymu citrát syntázy (CS). V následujících sedmi reakcích dochází k postupné konverzi citrátu na oxalacetát a uvolnění dvou molekul CO<sub>2</sub> (obrázek 6). Série těchto metabolických drah probíhá v kruhu, v každém kole je jeden oxalacetát spotřebován a jeden nový vytvořen, vzniká energie ve formě tří molekul NADH, jedné molekuly FADH<sub>2</sub> a jednoho nukleotidtrifosfátu (ATP nebo GTP). Intermediáty, vzniklé v průběhu Krebsova cyklu

jsou využívány jako stavební materiál v mnoha dalších biosyntetických drahách (Nelson et al., 2008).

## 2.4. Mitochondriální onemocnění

Mezi mitochondriální onemocnění (též označováno termínem mitopatie) řadíme poruchy funkce mitochondrií. Poruchy tvorby ATP, ale i poruchy fúze, dělení mitochondrií a jejich transportu na správné místo v rámci buňky. Jedná se o velmi heterogenní skupinu chorob s incidencí nejméně 1:5000 (Schaefer et al., 2004) s velmi odlišnými klinickými projevy. Mitochondriální onemocnění se může projevovat jako relativně mírné myopatické onemocnění, ale i jako multisystémové selhání. Postiženy jsou zejména orgány a tkáně s vysokými energetickými požadavky (mozek, srdce, kosterní svalovina, centrální nervová soustava a další).

Odlišujeme primární a sekundární mitopatie. Primární mitochondriální onemocnění je způsobené mutací v genech mtDNA či nDNA, které jsou zodpovědné za správné fungování systému OXPHOS. Jedná se tedy o geny pro jednotlivé podjednotky enzymů dýchacího řetězce, pro jejich asemblační faktory, o geny biogeneze mtDNA či geny biochemických drah, které vedou jaderně kódované podjednotky do vnitřní mitochondriální membrány. První projev mitochondriálního onemocnění můžeme zaznamenat v jakémkoli věku, ale nejčastěji se projevuje do pátého roku života. Mezi časté primární mitochondriální onemocnění patří Leighův syndrom, u kterého se první známky choroby objeví krátce po narození a má velmi progresivní průběh (van den Heuvel and Smeitink, 2001). Dochází k degeneraci bazálních ganglií, hyperlaktacidemii, svalové slabosti a poruchám motoriky. V případě mitopatií pozorujeme velmi malou korelaci mezi molekulární příčinou (genotypem) a klinickým následkem (fenotypem), zejména u mitopatií způsobených mtDNA mutacemi. Jedna a tatáž mutace může u dvou pacientů způsobit onemocnění se zcela odlišným průběhem a naopak konkrétní klinický fenotyp může mít u jednotlivých pacientů rozdílnou molekulární příčinu (DiMauro and Schon, 2003). Nejen proto je pro nás diagnostika mitochondriálních onemocnění velmi náročná.

Některá další onemocnění vykazují abnormality v rámci systému OXPHOS a proto je řadíme mezi sekundární mitopatie. Jedná se o některá neurodegenerativní onemocnění, například Parkinsonova, Huntingtonova či Alzheimerova choroba, Amyotrofická laterální skleróza, ale i onemocnění jako je diabetes mellitus, epilepsie,

rakovina, obezita (Cairns et al., 2011; Lönnqvist et al., 2009; Schapira, 2002; Sleight et al., 2011; Tseng et al., 2010).

#### **2.4.1. Vybraná primární mitochondriální onemocnění**

Jak už bylo zmíněno, primární mitochondriální onemocnění může být způsobeno mutací v jaderné či mitochondriální DNA a má široké spektrum klinických projevů. Může se jednat o tkáňově specifické onemocnění i o multisystémové selhání. Mitopatie mohou být děděné maternálně v případě mtDNA mutací. V případě nDNA mutace se může jednat o autosomálně dominantní, recesivní nebo o X-vázanou dědičnost. Nebo může dojít ke vzniku mutace *de novo* (R. J. R. J. Janssen et al., 2006).

Mitochondriální onemocnění způsobená mutací v mtDNA se obvykle manifestuje v pozdním dětství či dospělosti a jejich projevy jsou většinou mírnější. Oproti tomu mitopatie způsobené mutacemi v nDNA mají většinou velmi časný nástup a rychlý průběh s fatálním koncem.

Další jev, který je třeba zmínit v případě mitopatií způsobených mtDNA mutací jsou termíny heteroplasmie, threshold efekt a mitotická segregace. V jedné buňce se může nacházet až tisíce kopií mtDNA a ne všechny tyto molekuly nesou patogenní mutaci. Množství mutovaných mtDNA v buňce či tkáni tedy nazýváme hladina heteroplasmie a až po překročení určitého počtu mutovaných molekul mitochondriální DNA dojde ke klinickému projevení nemoci, tzv. treshold efekt. Tato hranice (treshold) se liší jak mezi jednotlivými tkáněmi, tak mezi jednotlivými mutacemi (DiMauro and Schon, 2003). Jakmile se buňka dělí, dochází k náhodné segregaci mitochondrií do dceřiných buněk (mitotická segregace), v průběhu buněčného dělení se tedy mění i hladina heteroplasmie.

##### **2.4.1.1. Poruchy komplexu I**

Izolovaný deficit komplexu I patří mezi nejčastější typ deficitu OXPHOS. Porucha komplexu I může být způsobena mutací v mtDNA či nDNA. Jedná se o geny jak pro strukturní podjednotky KI, tak pro jejich asemblační a stabilizační faktory, které nemusí být součástí výsledného holoenzymu (Diaz et al., 2011; Valsecchi et al., 2010). K dnešnímu datu byly popsány mitopatie způsobené mutacemi ve všech sedmi mtDNA genech strukturních podjednotek KI. V případě mtDNA mutací se jedná o různé klinické symptomy, buď tkáňově či orgánově specifické, například o Leberovu dědičnou optickou neuropatii (LHON; OMIM 535000) nebo o multisystémové poruchy,



například mitochondriální encefalopatii, laktátovou acidózu a iktu podobné příhody (MELAS; OMIM 540000). Mutace v nDNA kódovaných podjednotkách KI jsou často děděny autosomálně recesivně, kdy oba rodiče jsou heterozygotními přenašeči. Pacienti s deficitem KI způsobeným nDNA mutací mívají vážné projevy onemocnění již v raném věku a většina těchto případů končí předčasnou smrtí. Mezi hlavní klinické projevy patří laktátová acidóza, Leighův syndrom, neonatální kardiomyopatie s laktátovou acidózou, leukodystrofie s mikrocefalií a hepatopatie s renální tubulopatií (Loeffen et al., 2000). Dále se vyskytují nespecifické mitochondriální encefalomyopatie v kombinaci s neuromuskulárními symptomy (R. J. R. J. Janssen et al., 2006). V případě nDNA byly mitopatie KI spojeny se 17 geny pro strukturní podjednotky a s devíti geny pro asemblační faktory (Fassone and Rahman, 2012).

Pravděpodobně existuje mnoho dalších jaderných faktorů, sloužících k asemblaci a stabilizaci komplexu I, které zatím nejsou známy. Tyto faktory jsou dalšími potenciálními kandidáty způsobující deficit KI. Budoucí detailní pochopení funkce komplexu I na molekulární, mechanické i bioenergetické úrovni by nám mělo pomoci při rozvoji efektivní strategie v boji proti poruchám tohoto komplexu (Hirst, 2013).

Izolovaný deficit KI však nemusí být způsoben pouze mutacemi v genech pro strukturní podjednotky, asemblační a stabilizační faktory komplexu. Někteří pacienti s izolovanou poruchou KI nesou mutaci v genu *POLG* (OMIM 174763), kódující katalytickou podjednotku DNA polymerázy  $\gamma$  a dochází poté ke špatné replikaci mtDNA (Fassone and Rahman, 2012) či mutaci v genu *MTFMT* (OMIM 611766), kódující mitochondriální methionyl-tRNA formyltransferázu (Haack et al., 2012).

#### **2.4.1.2. Poruchy komplexu IV**

Porucha KIV může být způsobena buď ztrátou některé ze strukturních podjednotek nebo poruchou v asemblaci komplexu. Mitochondriální onemocnění bylo popsáno u všech třech mtDNA kódovaných strukturních podjednotek KIV (Shoubridge, 2001) a u šesti jaderně kódovaných podjednotek COX4I2 (Shteyer et al., 2009), COX6A1 (Tamiya et al., 2014), COX6B1 (Abdulhag et al., 2015; Massa et al., 2008), COX7B (Indrieri et al., 2012), NDUFA4 (Pitceathly et al., 2013) a COX8A (Hallmann et al., 2016). Většina defektů KIV je však způsobena mutacemi v genech pro asemblační faktory KIV, mutace ve strukturních podjednotkách jsou relativně vzácné. Izolované deficity KIV jsou asociované se širokým spektrem klinických projevů od

izolované myopatie po multisystémová onemocnění. Deficity KIV způsobené mutacemi v mtDNA mají většinou nástup v pozdním dětství či časně dospělosti. Většina nDNA kódovaných deficitů KIV je děděna autosomálně recesivně a má obvykle velmi časný nástup a fatální konec. Mezi klinické projevy patří Leighův syndrom, hypertrofická kardiomyopatie a myopatie či časná laktátová acidóza. Dále pak encefalopatie, sideroblastická anemie, syndrom podobný laterální skleróze, MELAS, selhání ledvin, ketoacidotické kóma a tubulopatie (Shoubridge, 2001; Srinivasan and Avadhani, 2012).

Mezi nejčastější poruchu asemblačních faktorů KIV patří mutace v genu *SURF1* (OMIM 185620) způsobující Leighův syndrom (Tiranti et al., 1998). Přesná funkce SURF1 proteinu není zatím známá, ale předpokládá se, že se podílí na časně asemblaci KIV. Bakteriální homology Surf1 proteinu (Surf1c a Surf1q) jsou hem *a* vázající proteiny (Bundschuh et al., 2009). Mezi další mutované asemblační faktory patří SCO1 (OMIM 603644) a SCO2 (OMIM 604272), které zajišťují doručení Cu<sup>2+</sup> redoxních center (Cu<sub>A</sub> a Cu<sub>B</sub>) na své místo (COX2, COX1 podjednotky) (Leary et al., 2004). A dále faktory zapojené do biosyntézy hemu, faktory COX10 (OMIM 602125) a COX15 (OMIM 603646) (Stiburek et al., 2006). Mutace v genu *SCO2* vedou k rozvoji hypertrofické kardiomyopatie, encefalopatie a hypotonie manifestující se v prvních týdnech života (Leary et al., 2004; Valnot et al., 2000a). U pacientů s mutací v genu *SCO1* ketoacidotické kóma, novorozenecké selhání ledvin, progresivní hypotonie, hepatomegalie, hypertrofie srdeční komory či mozková atrofie (Stiburek et al., 2009; Valnot et al., 2000a). V případě pacientů nesoucích mutaci v genu *COX10* pak encefalopatie, tubulopatie a leukodystrofie (Valnot et al., 2000b). U pacientů s mutací v genu *COX15* se vyskytuje široká škála klinických fenotypů: hypotonie, mikroencefalopatie, laktátová acidóza, u některých hypertrofická kardiomyopatie, Leighův syndrom a další (Alfadhel et al., 2011; Antonicka et al., 2003; Bugiani et al., 2005; Oquendo et al., 2004).

Nově se objevují další jaderné geny, které jsou odpovědné za generalizované snížení aktivity KIV, jako je gen pro apoptotický regulátor *APOPT1* (OMIM 616003) (Melchionda et al., 2014), gen pro faktor biogeneze KIV *PET100* (OMIM 614770) (Lim et al., 2014), dále pak gen pro translační aktivátor podjednotky COX1, *TACO1* (OMIM 612958) (Weraarpachai et al., 2009) a geny pro nové asemblační faktory *COA3* (OMIM 614775) (Ostergaard et al., 2015), *COX14* (OMIM 614478) (Weraarpachai et al., 2012), *COX20* (OMIM 614698) (Bourens et al., 2014; Doss et al., 2014) a *COA5* (OMIM

613920) (Huigsloot et al., 2011). Dále gen *ETHE1* kódující enzym mitochondriální matrix podílející se na katabolismu sulfidů (Mineri et al., 2008; Tiranti et al., 2009) a gen pro mRNA vázající protein zapojený v expresi mtDNA *LRPPRC* (OMIM 607544) (Mootha et al., 2003).<sup>1</sup>

#### 2.4.1.3. Poruchy $F_1F_0$ ATP syntázy

Poruchy  $F_1F_0$  ATP syntázy se nejčastěji projevují jako mitochondriální kardiomyoencefalopatie s časným nástupem onemocnění. K dnešnímu datu byly spojeny se čtyřmi jaderně kódovanými geny. Mutace v těchto genech způsobuje izolovanou poruchu ATP syntázy s podobným biochemickým fenotypem – snížené množství plně asemblovaných molekul enzymu. Jedná se o dva geny pro strukturní podjednotky (podjednotka  $\alpha$  (gen *ATP5A1*) a podjednotka  $\epsilon$  (gen *ATP5E*)) a dva biogenetické faktory (TMEM70 a *Atp12*). V případě TMEM70 (gen *TMEM70*) a *Atp12* (gen *Atp12*) jde o faktory, které nejsou součástí výsledného holoenzymu, ale mají svojí důležitou roli v průběhu sestavování KV. Dále byla porucha KV spojena se dvěma mitochondriálně kódovanými geny, s genem *MT-ATP6* (kódujícím podjednotku a) a s genem *MT-ATP8* (kódujícím podjednotku A6L). Mutace v genu pro podjednotku A6L se vyskytuje zřídka oproti mutaci v genu pro podjednotku a.

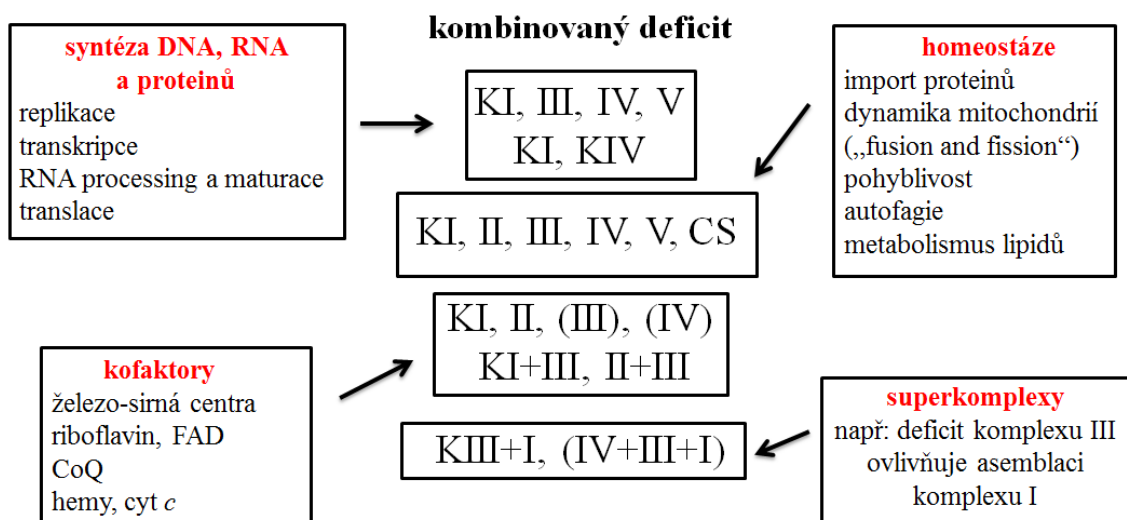
Výskyt jednotlivých mutací, molekulární mechanismus patogeneze, klinická manifestace i průběh nemoci se mezi jednotlivými geny liší. Mezi nejčastější příčinu deficitu KV patří mutace v genu pro transmembránový protein 70 (TMEM70). Protein TMEM70 byl poprvé popsán Sarah Calvoovou v roce 2006 (Calvo et al., 2006) jakožto potenciální mitochondriální protein. Později byl TMEM70 rozpoznán jako nový asemblační faktor ATP syntázy (Čížková et al., 2008), jehož přesná funkce není dodnes jasná, ale pravděpodobně se podílí na časně asemblaci ATP syntázy (Houstek et al., 1999; Kratochvílová et al., 2014). Množství pacientů s mutací v genu *TMEM70* stále roste a vyskytuje se zde široká škála klinických fenotypů. Mezi nejčastější patří laktátová acidóza, hypertrofická kardiomyopatie, letargie, respirační a srdeční selhání, časná novorozenecká hypotonie, 3-methylglutakonová acidurie, intrauterinní růstová retardace a psychomotorická retardace (Honzík et al., 2010; Houstek et al., 2004; Magner et al., 2015; Sperl et al., 2006).

---

<sup>1</sup> Vysvětlení jednotlivých zkratk nově objevených genů, způsobujících deficit komplexu IV viz seznam zkratk (1.)

#### 2.4.1.4. Vybrané kombinované poruchy OXPHOS

Kombinované poruchy OXPHOS patří mezi nejčastěji se vyskytující skupinu mitopatií, tvoří přibližně polovinu všech případů a za její molekulární podstatou stojí okolo 50 % všech genů, které byly prozatím s mitochondriálním onemocněním spojeny (Mayr et al., 2015). Mohou být způsobeny jak mutací v mtDNA tak i v nDNA. Jedná se buď o poruchu v rámci genové exprese mitochondriálních genů (replikace, metabolismus nukleotidů, RNA processing, translace), nebo o poruchu v rámci tvorby substrátů, které vstupují do dýchacího řetězce (poruchy v rámci KC, PDHc, oxidace MK, importu substrátů či anaplerotických drah, které dodávají meziprodukty KC), o defekt kofaktorů (železo-sírná centra, riboflavin, FAD, CoQ, cyt *c*, hemy) a dalších enzymů mitochondriálního energetického metabolismu či o narušení homeostázy mitochondrií (o poruchu jejich dynamiky v rámci buňky, biogeneze, importu proteinů, atd). Rozlišujeme kombinovaný defekt KI+KIV, KI+KIII+KIV+KV (nejspíše příklad chyby na úrovni genové exprese mtDNA genů), KI+III/KII+III, KIII+KIV či generalizovaný deficit všech komplexů (pravděpodobně způsobeno chybnou mitochondriální homeostází), viz obrázek 7. Kombinované deficity OXPHOS mají širokou škálu klinických fenotypů. Mohou se prezentovat jako klasické encefalomyopatie, ale i jako hepatopatie, nefropatie, hematopoetické nálezy a u části případů se kombinovaný deficit prezentuje jako Perraultův syndrom (Mayr et al., 2015).



**Obrázek 7:** Schéma jednotlivých typů kombinovaných deficitů OXPHOS, konkrétní forma kombinovaného deficitu a jeho molekulární příčina (převzato a upraveno podle (Mayr et al., 2015)).

Kombinovaný deficit OXPHOS může být způsoben mutací v široké škále genů. Jedná se například o mutaci v genu pro polymerázu  $\gamma$  (gen *POLG*), která se účastní replikace mtDNA, pro methionyl-tRNA formyltransferázu (gen *MTFMT*), která má svojí úlohu v iniciaci mitochondriální translace, či v mitochondriálních elongačních faktorech Tu, Ts a G (geny *TUFM*, *TFSM* a *GFMI*). Pro účely této diplomové práce se budu níže zmiňovat o čtyřech konkrétních genech: *FH*, *OPA1*, *TFSM* a *TYMP* a to z důvodu, že soubor pacientů, použitý na analýzu KMEM, obsahuje právě pacienty nesoucí mutace v těchto genech.

#### *Gen FH*

Fumaráthydratáza (FH, EC 4.2.1.2) nebo též fumaráza je enzym KC, katalyzující konverzi fumarátu na malát. Mutace v genu *FH* způsobuje vzácné autosomálně recesivní metabolické onemocnění označované jako fumarová acidurie nebo deficit fumarázy (OMIM 606812). Je doprovázené časnou hypotonií, vážnou psychomotorickou retardací a mozkovými malformacemi (prenatální nález ageneze corpus callosum, ventrikulomegálie a defekt komorového septa (Mroch et al., 2012)), dále nálezy na magnetické rezonanci jako je rozptýlená polymikrogyrie, leukopenie, hydrocefalus a otevřené operculum, kraniofaciální dysmorfie obličeje a neonatální polycytémie. Dále se vyskytuje metabolická acidóza a/nebo encefalopatie. Většina pacientů umírá během prvních let života (Kerrigan et al., 2000).

#### *Gen OPA1*

Dalším ze zmíněných genů je gen *OPA1* (OMIM 605290). Kóduje GTPázový protein vnitřní mitochondriální membrány příbuzný dynaminu. Jeho hlavní funkcí je zprostředkovat splynutí dvou mitochondrií („mitochondrial fusion“) v rámci mitochondriální dynamiky, stabilizuje komplexy dýchacího řetězce a umožňuje efektivní spřažení transportu elektronů se syntézou ATP (Chevrollier et al., 2008; Zanna et al., 2008) Další funkcí je sekvestrovat proapoptotický cyt *c* do míst mitochondriálních krist, tím omezuje uvolňování cyt *c* a brání tak spouštění apoptózy. K tomuto jevu dochází v rámci odpovědi na vnitřní stimuly buňky. *OPA1* hraje též roli v regulaci tvaru a délce mitochondriálních krist a to nejen v průběhu apoptózy (Frezza et al., 2006). Nově se ukazuje, že má roli i ve stabilizaci mtDNA (Yu-Wai-Man et al., 2010). Mutace v *OPA1* způsobuje autosomálně dominantní optickou atrofii (OMIM 165500), která je charakteristická ztrátou nervových buněk sítnice a progresivní

degenerací optického nervu. Též může docházet k poškození neuronů centrální nervové soustavy, periferních nervů a kosterních svalů v rámci tzv. OPA1 plus syndromu. Postupně dochází k slepotě pacienta. Dále se vyskytují i další poškození jako je ataxie, myopatie, periferní neuropatie a progresivní externí oftalmoplegie (Yu-Wai-Man et al., 2010).

#### *Gen TSFM*

V případě *TSFM* (OMIM 604723) se jedná o jaderně lokalizovaný gen pro translační elongační faktor EFTs. Jedná se o guanin nukleotid exchange faktor pro TUFM. TUFM je další translační elongační faktor, zajišťující přenos tRNA s navázanou aminokyselinou na ribozom za současné hydrolyzy GTP. Mutace v genu *TSFM* vede k poruchám asemblace všech tří OXPHOS komplexů obsahujících mtDNA kódované podjednotky a na klinické úrovni způsobuje časnou fatální encefalopatii, hypertrofickou kardiomyopati, svalovou slabost, hypotonii, epilepsii a další (Smeitink et al., 2006).

#### *Gen TYMP*

Jaderný gen *TYMP* kóduje thymidinfosforylázu (TYMP, EC 2.4.2.4), cytosolický enzym katalyzující fosforylaci thymidinu (dThd) nebo deoxyuridinu na thymin či uracil. Chybí-li buňkám TYMP, dochází k hromadění dThd a deoxyuridinu. Toto hromadění narušuje nukleotid-nukleosidový pool, což má za následek změny v mtDNA (delece, deplece a bodové mutace). Mitochondriální DNA je citlivější na změny v nukleotidovém poolu než nDNA a to z několika důvodů. Zaprvé je mitochondriální nukleotidový pool regulován odděleně a je pravděpodobně náchylnější na toxické efekty nadměrného množství dThd než jaderný nukleotidový pool. Za druhé je mtDNA více závislá na ideálním nukleotidovém poolu oproti nDNA, která umí nukleotidy syntetizovat *de novo*. Za třetí lidským mitochondriím chybí efektivní mismatch opravný systém (Nishigaki et al., 2003). Dalším důvodem je fakt, že mtDNA se replikuje i v postmitotických buňkách. Mutace v genu *TYMP* způsobuje autosomálně recesivní mitochondriální neurogastrointestinalní encefalomyopatii (OMIM 603041), též nazýváno jako mitochondriální DNA depleční syndrom 1. Mezi klinické projevy tohoto syndromu patří: těžké zažívací problémy, ptóza, oftalmoparéza, neuropatie a leukoencefalopatie (Szigeti et al., 2004).

**Tabulka 1: Popsané mutace vybraných komplexů OXPHOS spojené s mitopatiemi a příklady kombinovaných poruch OXPHOS.**

		<b>nDNA kódované</b>	<b>mtDNA kódované</b>
<b>KI</b> (Fassone and Rahman, 2012)	geny pro strukturní podjednotky	<i>NDUFV1, NDUFV2, NDUFS1, NDUFS2, NDUFS3, NDUFS4, NDUFS6, NDUFS7, NDUFS8, NDUFA1, NDUFA2, NDUFA9, NDUFA10, NDUFA11, NDUFA12, NDUFB3, NDUFB9</i>	<i>MTND1, MTN2, MTND3, MTND4, MTND5, MTND6, MTND4L</i>
	geny pro asemblační faktory	<i>NDUFAF1, NDUFAF2, NDUFAF3, NDUFAF4, C20ORF7 (NDUFAF5), C8ORF38, FOXRED1, NUBPL, ACAD9</i>	
<b>KIV</b>	geny pro strukturní podjednotky	<i>COX4I2, COX6A1, COX6B1, COX7B, COX8A, NDUFA4</i>	<i>COX1, COX2, COX3</i>
	vybrané geny pro asemblační faktory	<i>SURF1, SCO1, SCO2, COX10, COX15</i>	
<b>F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>ATP syntáza</b>	geny pro strukturní podjednotky	<i>ATP5A1, ATP5E</i>	<i>MT-ATP6, MT-ATP8</i>
	geny pro asemblační faktory	<i>TMEM70, ATP12</i>	
<b>kombinované poruchy</b>	vybrané mutace vedoucí ke kombinované poruše OXPHOS	<i>OPA1, TSFM, TYMP, ...</i>	

## 2.4.2. Vybraná sekundární mitochondriální onemocnění

### 2.4.2.1. Huntingtonova choroba

Huntingtonova choroba (HD, z anglického Huntington's disease), též označováno jako tanec Svatého Víta, je neurodegenerativní onemocnění s prevalencí 5–10 na 100 000 (McFarland and Cha, 2011). Jedná se o vážné dědičné (autosomálně dominantní) onemocnění, kdy příčinou choroby je mutace v genu pro huntingtin. Konkrétně dochází ke zmnožení CAG repetice (kodon pro glutamin) v prvním exonu tohoto genu, což má za následek prodloužení polyglutaminového řetězce vedoucí ke změnám ve struktuře a funkci proteinu. U zdravých jedinců se běžně vyskytuje 9–36 CAG repetice, u pacientů s HD bývá tento počet 37 a více (Duyao et al., 1993).

První známky onemocnění se objevují nejčastěji kolem 35.–50. roku života. Nemoc však může propuknout v jakémkoli věku. Pokud se nemoc projeví před 20. rokem života, označujeme tuto formu HD jako juvenilní (Telenius et al., 1993) a pokud se projeví po 60. roce života, tak jako formu s pozdním nástupem. Mutovaný gen způsobuje odumírání neuronů a to především v bazálních gangliích a v mozkové kůře, což má postupně za následek progresivní ztrátu všech tělesných i duševních schopností a během 15–20 let dochází k úplné závislosti pacienta na péči okolí a onemocnění končí smrtí (Ho et al., 2001).

### *Huntingtin*

Huntingtin má v buňce mnoho důležitých rolí. Působí antiapoptoticky a hraje klíčovou roli během embryonálního vývoje nervové soustavy (McKinstry et al., 2014). Je široce exprimován v neuronech centrální nervové soustavy a buňkách varlat (Sharp et al., 1995), asociuje s mnoha proteiny a buněčnými organelami. Mimo jiné i s mitochondriemi, což může být jedním z hlavních patogenetických mechanismů zapříčiňujících rozvoj HD. U HD pacientů dochází k narušení mitochondriální biogeneze a komplexů OXPHOS nejen v mozkové tkáni, ale i v periferních tkáních jako jsou svaly, fibroblasty anebo lymfocyty (Costa and Scorrano, 2012). Díky mutovanému huntingtinu (mHtt) dochází k narušení homeostázy  $Ca^{2+}$  (Panov et al., 2002), které následně vede k změnám na úrovni OXPHOS a aktivaci vnitřní dráhy apoptózy (vylití cyt *c* do cytosolu následkem otevření mitochondriálního permeabilního tranzitního póru) (Nicholls, 2009). Je narušena funkce komplexů OXPHOS. Dochází k výraznému snížení aktivit KII a KIII, k mírnému snížení aktivity KIV na úrovni mozkové tkáně pacientů s HD (Gu et al., 1996). Též bylo pozorováno snížené množství některých podjednotek KII ve striatálních neuronech pacientů s HD (Benchoua et al., 2006). Přesný mechanismus způsobující tyto změny však není znám. Jednoznačné však je, že dochází k výraznému snížení dodávky energie v nervových buňkách, což může být příčinou odumírání neuronů. Dochází též k narušení dynamiky (dělení a fúze) mitochondrií, transportu těchto organel v rámci buňky a ke změnám jejich tvaru. Mutovaný huntingtin interaguje s proteinem DRP1, který je odpovědný za mitochondriální dělení, stimuluje jeho aktivitu a tím nejspíše dochází k rozpadu mitochondriální sítě (Song et al., 2011). Dále dochází ke snížení exprese proteinů zajišťujících mitochondriální fúzi (OPA1, MFN1, MFN2) a zvýšení exprese proteinů zajišťujících dělení mitochondrií (DRP1, FIS1) (Shirendeb et al., 2011). Fragmentace



mitochondrií, ke které dochází jak již bylo zmíněno výše, má za následek uvolnění cyt *c* a následné aktivaci vnitřní dráhy apoptózy (Wang et al., 2009). Dochází i k změnám ve struktuře mitochondriálních krist (Wang et al., 2009) a mHtt nejspíše nepřímo inhibuje molekulární motory kinesiny a dyneiny, které transportují nejen mitochondrie po mikrotubulech na různá místa v buňce (Bossy-Wetzel et al., 2008). Dochází tak k nerovnoměrné distribuci ATP v buňce.

## 2.5. Diagnostika mitochondriálních onemocnění

Diagnostické vyšetření pacientů s podezřením na mitochondriální onemocnění obnáší celou řadu klinických a laboratorních testů. První známkou toho, že by se mohlo jednat o mitochondriální poruchu, bývá zvýšené množství laktátu a poměru laktát:pyruvát v krvi či zvýšené množství intermediátů Krebsova cyklu (malát, sukcinát, fumarát,  $\alpha$ -ketoglutarát) v moči (Haas et al., 2008; Rodenburg, 2011; Rustin et al., 1994). Proto při prvním podezření na mitochondriální onemocnění bývá provedena analýza těchto metabolitů. Pokud podezření na mitochondriální onemocnění přetrvává, dochází k sérii biochemických vyšetření, které se snaží lokalizovat příčinu onemocnění. Mezi tato biochemická vyšetření patří měření aktivity jednotlivých komplexů OXPHOS pomocí spektrofotometrie, měření buněčné respirace pomocí oxygrafu, měření kapacity mitochondriálního energetického metabolismu pomocí radioaktivně značených substrátů a proteinová analýza komplexů OXPHOS pomocí BN-PAGE. Výsledky těchto analýz nás poté navedou více či méně konkrétně na primární příčinu onemocnění a následně jsou testovány jednotlivé kandidátní geny nebo panely genů, popřípadě celé exomy molekulárně genetickými metodami.

Jako materiál pro biochemickou analýzu slouží nejčastěji kosterní sval, odebraný biopsií. Jelikož je ale svalová biopsie pro pacienta velmi invazivní zákrok, je snaha využít při diagnostice tkáně na odběr méně náročné, například kožní fibroblasty, které jsou navíc snadno kultivovatelné.

### 2.5.1. Kapacita mitochondriálního energetického metabolismu

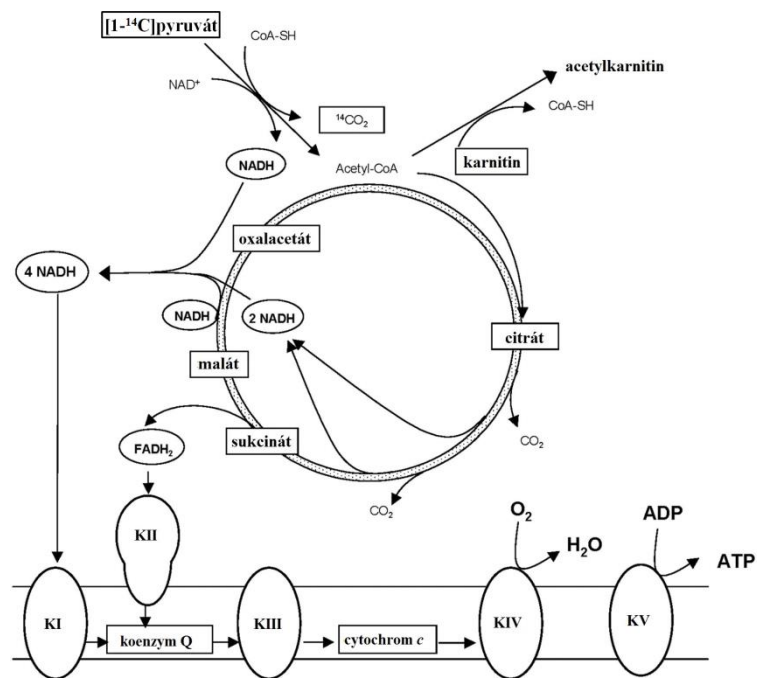
Oxidací pyruvátu nebo MK vzniká acetyl-CoA, který je dále oxidován v KC a vznikají tak redukované koenzymy NADH a FADH<sub>2</sub>, které jsou následně využity systémem OXPHOS k tvorbě ATP. Oxidací 1 molu pyruvátu vzniká až 15 molů ATP a defekt v jakékoli části této metabolické dráhy vede ke snížené produkci ATP. Analýzou kapacity mitochondriálního energetického metabolismu (KMEM) tedy můžeme detekovat nejen deficit OXPHOS, ale i deficit PDHc, KC či ANT.

Principem analýzy KMEM je sledování oxidace <sup>14</sup>C značených substrátů v sérii 10 inkubací, obsahujících <sup>14</sup>C pyruvát, malát anebo sukcinát, dále pak různé donory a akceptory acetyl-CoA a inhibitory KC (tabulka 2, obrázek 8 a 9). Míra oxidace je detekována jako množství vzniklého <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>. Porovnávání míry oxidace jednotlivých inkubací mezi sebou pak může být indikátorem mitochondriální poruchy. Výhodou této metody oproti respirometrii a spektrofotometrii je, že analyzuje širší spektrum metabolických drah. Kromě dýchacího řetězce i PDHc a KC (A. J. M. Janssen et al., 2006).

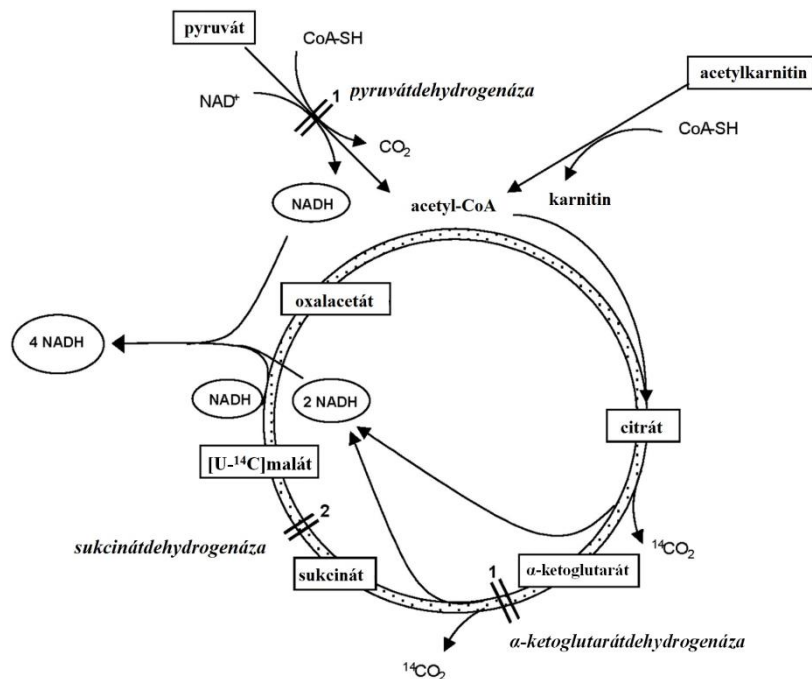
**Tabulka 2: Složení jednotlivých inkubací pro měření kapacity mitochondriálního energetického metabolismu.**

inkubace	substrát
1	[1- <sup>14</sup> C] pyruvát + malát + ADP
2	[1- <sup>14</sup> C] pyruvát + karnitin + ADP
3	[1- <sup>14</sup> C] pyruvát + malát – ADP
4	[1- <sup>14</sup> C] pyruvát + malát – ADP + CCCP
4a	[1- <sup>14</sup> C] pyruvát – karnitin + ADP
5	[1- <sup>14</sup> C] pyruvát + malát + ADP + atraktylosid
6	[U- <sup>14</sup> C] malát + pyruvát + malonát + ADP
7	[U- <sup>14</sup> C] malát + acetylkarnitin + malonát + ADP
8	[U- <sup>14</sup> C] malát + acetylkarnitin + arsenit + ADP
9	[1,4- <sup>14</sup> C] sukcinát + acetylkarnitin + ADP

CCCP karbonylkyanid-3-chlorofenylhydrazon, ADP adenosindifosfát



**Obrázek 8:** Schématické znázornění oxidace  $[1-^{14}\text{C}]$  pyruvátu v přítomnosti ADP a malátu anebo karnitinu jakožto akceptoru acetyl-CoA (inkubace 1 či 2). Malát je v Krebsově cyklu přeměněn na oxalacetát, který se dále mění na acetyl-CoA a poté pomocí enzymu citrát-syntázy na citrát. V případě inkubace 2 ( $[1-^{14}\text{C}]$  pyruvát + karnitin + ADP), ve které je přítomen karnitin, dochází ke konverzi acetyl-CoA na acetylkarnitin a CoA-SH pomocí enzymu karnitin-acetyltransferázy. Oxidací pyruvátu vznikají redukované koenzymy, které jsou využity komplexy dýchacího řetězce (KI–KV) k tvorbě ATP (převzato a upraveno podle (A. J. M. Janssen et al., 2006)).



**Obrázek 9:** Schématické znázornění oxidace  $[\text{U}-^{14}\text{C}]$  malátu v přítomnosti pyruvátu nebo acetylkarnitinu jakožto donoru acetyl-CoA (inkubace 6–8) a vyznačená místa inhibitorů arsenitu a malonátu. (1) inhibiční místo pyruvátdehydrogenázy anebo  $\alpha$ -ketoglutarátdehydrogenázy (pomocí inhibitoru arsenitu (inkubace 8)). (2) inhibiční místo sukcinátdehydrogenázy (inhibice malonátem (inkubace 6 a 7)) (převzato a upraveno podle (A. J. M. Janssen et al., 2006)).

### 2.5.1.1. Vyhodnocování výsledků analýzy KMEM

Metoda KMEM byla převzata z holandské laboratoře v Nijmegenu, jejím autorem je pan Antoon Janssen, který princip shrnuje v článku Measurement of the Energy-Generating Capacity of Human Muscle Mitochondria: Diagnostic Procedure and Application to Human Pathology (A. J. M. Janssen et al., 2006).

Rychlost oxidace jednotlivých inkubací (tabulka 2) a následné porovnávání těchto hodnot mezi sebou nám může naznačit deficit OXPHOS, KC, PDHc či ANT. Důležité informace o stavu mitochondriálního energetického metabolismu (MEM) nám přináší i dávání jednotlivých inkubací do poměru mezi sebou.

Jakákoli disbalance MEM kromě deficitu KII vede ke snížené oxidaci pyruvátu a snížené produkci ATP. Oxidace pyruvátu (inkubace 1–5, tabulka 2) je měřena v přítomnosti malátu anebo karnitinu (vychytávají vzniklý acetyl-CoA, obrázek 8), čímž je zabráněno inhibici PDHc, ke které by docházelo vzhledem k akumulaci vzniklého produktu, acetyl-CoA. Pyruvátdehydrogenázový komplex je regulován poměry ATP/ADP, NADH/NAD<sup>+</sup> a acetyl-CoA/CoA. Defekty KC tedy vedou ke snížené oxidaci inkubace 1 ([1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP) jakožto výsledek zvýšeného poměru acetyl-CoA/CoA respektivně NADH/NAD<sup>+</sup>. Defekty KV a ANT vedou ke snížené oxidaci inkubace 1 z důvodu zvýšeného poměru NADH/NAD<sup>+</sup> respektivně ATP/ADP.

Poměr inkubací 1/3 nám udává míru spřažení OXPHOS. Inkubace 3 ([1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát – ADP) oproti inkubaci 1 ([1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP) neobsahuje ADP a proto, je-li poměr 1/3 snížený naznačuje nám narušení OXPHOS.

Inkubace 2 ([1-<sup>14</sup>C] pyruvát + karnitin + ADP) obsahuje karnitin, který vychytává acetyl-CoA a tím pádem oxidací 1 molu pyruvátu dochází k tvorbě 1 molu NADH, zatímco v inkubaci 1 ([1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP) dochází k tvorbě 4 molů NADH a 1 molu FADH<sub>2</sub> (obrázek 8). V případě deficitu systému OXPHOS či deficitu ANT dochází ke snížení rozdílu oxidací mezi inkubací 1 a 2 a tím pádem ke zvýšenému poměru 2/1.

Inkubace 4 ([1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát – ADP + CCCP) obsahuje rozpřahovač CCCP (karbonylkyanid-3-chlorofenylhydrazon) a tím dělá oxidaci pyruvátu nezávislou na ADP, F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>ATP syntáze a ANT. Deficit ATP syntázy a ANT způsobuje zvýšenou oxidaci inkubace 4 a tím i zvýšený poměr inkubací 4/1.

Inkubace 5 ([1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP + atraktylosid) měří oxidaci pyruvátu v přítomnosti atraktylosidu (inhibitor ANT). V případě, že nebude přítomno exogenní ADP (inkubace 3 ([1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát – ADP)) a oxidace pyruvátu bude závislá na endogenním ADP, dojde ke zvýšenému poměru ATP/ADP, což bude mít za následek inhibici PDHc. V případě deficitu ANT nemá přidání atraktylosidu na oxidaci pyruvátu žádný či téměř žádný vliv, míra oxidace inkubací 3 a 5 je velmi podobná a tím pádem je snížen poměr těchto inkubací.

Oxidace [U-<sup>14</sup>C] malátu a [1,4-<sup>14</sup>C] sukcinátu je silně závislá na donorech acetyl-CoA. Proto při měření oxidace malátu (inkubace 6–9, tabulka 2) a sukcinátu (inkubace 9) přidáváme do reakcí pyruvát nebo acetylkarnitin (obrázek 9).

Inkubace 6 ([U-<sup>14</sup>C] malát + pyruvát + malonát + ADP) měří aktivitu Krebsova cyklu výjma SDH a FH. Poruchy PDHc, KC (krom SDH a FH), OXPHOS a ANT vedou ke snížené oxidaci inkubace 6. Teoreticky oxidací 1 molu pyruvátu dochází k oxidaci 1 molu malátu, mělo by tedy docházet k dvakrát větší produkci <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> v inkubaci 6 než v inkubaci 1. Poměr 6/1 je však nižší, jelikož dochází k částečnému transportu α-ketoglutarátu ven z mitochondrie a tím pádem je množství vytvořeného <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> nižší. Do inkubací 6 a 7 ([U-<sup>14</sup>C] malát + acetyl-karnitin + malonát + ADP) přidáváme malonát (inhibitor SDH), nedochází tak k produkci FADH<sub>2</sub> a teoreticky by mělo oxidací 1 molu pyruvátu vznikat 13 místo 15 molů ATP. Tento fakt byl potvrzen (Antoon J. M. Janssen et al., 2006) a malonát tedy opravdu specificky inhibuje SDH.

V inkubaci 7 vznikají oxidací malátu 2 moly <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>, zatímco v inkubaci 8 ([U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + arsenit + ADP), kde je přítomný arsenit (inhibitor α-ketoglutarátdehydrogenázy (α-KGD) a PDHc) vzniká pouze 1 mol <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>. Poměr těchto inkubací je přibližně dva. V případě deficitu α-KGD je hodnota tohoto poměru okolo jedné. V inkubacích 7 a 8 je přítomen acetylkarnitin, jakožto donor acetyl-CoA a tudíž je oxidace těchto inkubací nezávislá na PDHc. Oproti tomu v inkubaci 6 donor acetyl-CoA neobsahuje. Deficit PDHc tedy vede ke zvýšenému poměru inkubací 7/6.

Inkubace 9 ([1,4-<sup>14</sup>C] sukcinát + acetylkarnitin + ADP) měří míru oxidace sukcinátu. V případě snížené oxidace inkubace 9 spolu s normální či mírně sníženou oxidací [U-<sup>14</sup>C] malátu (inkubace 6, 7 a 8) naznačuje deficit SDH nebo FH (A. J. M. Janssen et al., 2006).

### **3. Cíle diplomové práce**

Cílem diplomové práce je studium kapacity mitochondriálního energetického metabolismu (KMEM) v kultivovaných kožních fibroblastech od pacientů s izolovaným nebo kombinovaným deficitem komplexů oxidativní fosforylace (OXPHOS).

**Dílčími cíly práce bylo:**

1. Optimalizovat metodu analýzy KMEM pro její využití v kultivovaných kožních fibroblastech.
2. Stanovit KMEM u kontrolních linií kultivovaných kožních fibroblastů.
3. Stanovit KMEM v kultivovaných kožních fibroblastech od pacientů s deficitem OXPHOS potvrzeným na molekulárně-genetické úrovni.
4. Stanovit KMEM v kultivovaných kožních fibroblastech od pacientů se sekundárním deficitem OXPHOS (Huntingtonova choroba).
5. Porovnat výsledky analýzy KMEM a spektrofotometrického stanovení aktivit komplexů oxidativní fosforylace v kultivovaných kožních fibroblastech od pacientů s deficitem OXPHOS.
6. Porovnat výsledky analýzy KMEM v kultivovaných kožních fibroblastech s výsledky analýzy KMEM ve svalové tkáni od vybraných pacientů s deficitem OXPHOS.
7. Porovnat výsledky analýzy KMEM s výsledky polarografie v kultivovaných kožních fibroblastech od vybraných pacientů s deficitem OXPHOS.

## 4. Materiál a metody

### 4.1. Materiál

#### 4.1.1. Soubor linií kultivovaných kožních fibroblastů

Studie KMEM byla provedeny na kožních fibroblastech od 23 pacientů (P1–P23) s izolovaným nebo kombinovaným deficitem komplexů OXPHOS a od 7 pacientů (P24–30) se sekundárním deficitem OXPHOS (HD) získaných při kožní biopsii po informovaném souhlasu.

Linie kožních fibroblastů od pacientů byly založeny a kultivovány do množství tří kultivačních lahví o ploše 75 cm<sup>2</sup> ve spolupráci s Laboratoří tkáňových kultur, Ústav dědičných metabolických poruch, Všeobecná fakultní nemocnice v Praze a následně přeneseny do naší laboratoře, kde byly rozpěstovány do množství 12 kultivačních lahví o ploše 75 cm<sup>2</sup> a použity k analýze KMEM.

Jako kontrolní fibroblasty byly použity 2 komerční linie neonatálních kožních fibroblastů (K1–K2) (ECACC –European Collection of Cell Cultures, Health Protection Agency Culture Collection, Velká Británie). Dále pak 8 linií kožních fibroblastů (K3–K10) ve věku několika dnů až čtyř let života a 5 linií kožních fibroblastů dospělého věku (K11–K15). U všech kontrolních linií nebylo prokázáno mitochondriální onemocnění (tabulka 3).

**Tabulka 3: Soubor kontrolních linií kožních fibroblastů.**

<b>kontrola</b>	<b>pohlaví</b>	<b>věk v době odběru fibroblastů</b>
K1	M	kojenec do 1 roku
K2	M	kojenec do 1 roku
K3	M	novorozenec
K4	M	kojenec do 1 roku
K5	M	kojenec do 1 roku
K6	Ž	kojenec do 1 roku
K7	Ž	kojenec do 1 roku
K8	M	batole (do 2 let)
K9	Ž	batole (do 3 let)
K10	M	předškolní věk (do 4 let)
K11	M	dospělý 26 let
K12	Ž	dospělý 28 let
K13	Ž	dospělý 29 let
K14	Ž	dospělý 38 let
K15	Ž	dospělý 49 let

K kontrola, M mužské pohlaví, Ž ženské pohlaví.



**Tabulka 4: Vstupní biochemická a molekulárně-genetická data souboru linií kultivovaných kožních fibroblastů od pacientů s prokázaným primárním deficitem OXPHOS na úrovni komplexu I (P1–P7).** Tabulka uvádí výsledky spektrofotometrického měření ve fibroblastech, výsledky měření KMEM (kapacity mitochondriálního energetického metabolismu) ve svalové tkáni a výsledky polarografie ve fibroblastech, jsou-li k dispozici. Dále porovnání hladiny heteroplasmie ve fibroblastech a ve svalové tkáni.

pacient	pohlaví	věk	diagnóza (mutace v genu)	SPR ve F	KMEM ve S	polarografie ve F	heteroplasmie ve S [%]	heteroplasmie ve F [%]	poznámka
P1	Ž	6 m.	<i>MTND1</i> (m.3697G>A)	↓↓ KI+III	NA	respirace po přidání substrátů: ↓↓KI+ADP	93	81	sestřenice P2
P2	M	10 m.	<i>MTND1</i> (m.3697G>A)	v normě	NA	NA	NA	79	bratranec P1
P3	Ž	7 m.	<i>MTND3</i> (m.10158T>C)	v normě	NA	NA	95	85	
P4	M	10 r.	<i>MTND5</i> (m.13513G>A)	v normě	NA	NA	48	40	
P5	M	3 r.	<i>MTND5</i> (m.13513G>A)	↓KI, ↓↓KIV, ↓↓CS, ↓↓KV/CS	↓↓oxidace pyruvátu a sukcinátu, ↓↓1/3, ↑↑2/1, ↓↓3/5	NA	67	65	
P6	Ž	12 r.	<i>MTND5</i> (m.13046T>C)	↓↓KIV, ↓↓CS	↓↓oxidace pyruvátu a sukcinátu, ↓↓1/3, ↑↑↑↑2/1, ↓↓3/5, ↓↓6/1, ↑↑↑↑7/6	NA	70	43	
P7	Ž	2 r.	<i>MTND5</i> (m.13042G>A)	v normě	NA	respirace po přidání substrátů: ↓↓KI+ADP	96	65	

↓↓↓ pokles na 0–35 %, ↓↓ pokles na 36–70 %, ↓ pokles na 71–100 %, ↑ nárůst na 101–135 %, ↑↑ nárůst na 136–170 %, ↑↑↑ nárůst na 171–200 %, ↑↑↑↑ nárůst na 201–300 %, ↑↑↑↑↑ nárůst na 301–400 % kontrolních hodnot. Vysvětlení zkratk: CS citrát syntáza, F fibroblasty, KI NADH:ubichinonoxidoreduktáza, KII sukcinát:ubichinonoxidoreduktáza, KIII cytochrom *bc1* komplex, KIV cytochrom *c* oxidáza, m měsíc, M muž, NA nebylo analyzováno, r rok, S sval, SPR spektrofotometrie, Ž žena. Složení inkubační analýzy KMEM:

1 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP, 2 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + karnitin + ADP, 3 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát – ADP, 5 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP + atraktylosid, 6 [U-<sup>14</sup>C] malát + pyruvát + malonát + ADP, 7 [U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + malonát + ADP

**Tabulka 5: Vstupní biochemická a molekulárně-genetická data souboru linií kultivovaných kožních fibroblastů od pacientů s prokázaným primárním deficitem OXPPOS na úrovni komplexu I (P8–P9).** Tabulka uvádí výsledky spektrofotometrického měření ve fibroblastech, výsledky měření KMEM (kapacity mitochondriálního energetického metabolismu) ve svalové tkáni a výsledky polarografie ve fibroblastech, jsou-li k dispozici. Dále porovnání hladiny heteroplasmie ve fibroblastech a ve svalové tkáni.

pacient	pohlaví	věk	diagnóza (mutace v genu)	SPR ve F	KMEM ve S	heteroplasmie ve S [%]	heteroplasmie ve F [%]
P8	M	35 r.	<i>MTND5</i> (m.12706T>C)	↓↓KI, ↓↓KIV, ↓↓CS	↓↓1/3, ↑↑2/1, ↓↓3/5	83	NA
P9	Ž	17 r.	<i>MTND5</i> (m.13513G>A)	↓↓KI	NA	97	4

↓↓↓ pokles na 0–35 %, ↓↓ pokles na 36–70 %, ↓ pokles na 71–100 %, ↑ nárůst na 101–135 %, ↑↑ nárůst na 136–170 %, ↑↑↑ nárůst na 171–200 %, ↑↑↑↑ nárůst na 201–300 %, ↑↑↑↑↑ nárůst na 301–400 % kontrolních hodnot. Vysvětlení zkratk: CS citrátsyntáza, F fibroblasty, KI NADH:ubichinonoxidoreduktáza, KII sukcinát:ubichinonoxidoreduktáza, KIII cytochrom *bc1* komplex, KIV cytochrom *c* oxidáza, M muž, NA nebylo analyzováno, r rok, S sval, SPR spektrofotometrie, Ž žena. Složení inkubační analýzy KMEM:

1 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP, 2 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + karnitin + ADP, 3 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát – ADP, 5 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP + atraktylosid

**Tabulka 6: Vstupní biochemická a molekulárně-genetická data souboru linií kultivovaných kožních fibroblastů od pacientů s prokázaným primárním deficitem OXPHOS na úrovni komplexu IV (P10–P15).** Tabulka uvádí výsledky spektrofotometrického měření ve fibroblastech a výsledky polarografie ve fibroblastech, jsou-li k dispozici.

pacient	pohlaví	věk	diagnóza (mutace v genu)	SPR ve F	polarografie ve F
P10	M	1 r.	<i>SURF1</i> (c.[312_321del10insAT]; [845_846delCT])	↓↓↓KIV, ↓↓↓KIV/CS	respirace po přidání substrátů: ↓↓↓KI,↓↓↓KI+ADP, ↓↓↓KII, ↓KIV
P11	M	1 r.	<i>SURF1</i> (c.[792_793delAG]; [845_846delCT])	↓↓↓KIV, ↓↓↓KIV/CS	NA
P12	Ž	1 r.	<i>SURF1</i> (c.[469C>T]; [845_846delCT])	↓↓↓KIV, ↓CS, ↓↓↓KIV/CS	NA
P13	M	1 r.	<i>SCO2</i> (c.[418G>A];[418G>A])	v normě	respirace po přidání substrátů: ↓↓KI+ADP, ↓↓KII a ↓↓↓KIV
P14	M	1 r.	<i>SCO2</i> (c.[418G>A];[418G>A])	↓↓KIV, ↓↓KIV/CS, ↓↓↓KI	NA
P15	M	1 r.	<i>SCO2</i> (c.[667G>A] + Chr22:del49275958_49451008)	↓↓KIV	NA

↓↓↓ pokles na 0–35 %, ↓↓ pokles na 36–70 %, ↓ pokles na 71–100 %, ↑ nárůst na 101–135 %, ↑↑ nárůst na 136–170 %, ↑↑↑ nárůst na 171–200 %, ↑↑↑↑ nárůst na 201–300 %, ↑↑↑↑↑ nárůst na 301–400 % kontrolních hodnot. Vysvětlení zkratk: CS citrát syntáza, F fibroblasty, KI NADH:ubichinonoxidoreduktáza, KII sukcinát:ubichinonoxidoreduktáza, KIII cytochrom *bc1* komplex, KIV cytochrom *c* oxidáza, M muž, NA nebylo analyzováno, r rok, S sval, SPR spektrofotometrie, Ž žena.

**Tabulka 7: Vstupní biochemická a molekulárně-genetická data souboru linií kultivovaných kožních fibroblastů od pacientů s prokázaným primárním deficitem OXPHOS na úrovni F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP syntázy (P16–P18).** Tabulka uvádí výsledky spektrofotometrického měření ve fibroblastech a výsledky měření KMEM ve svalové tkáni, jsou-li k dispozici.

pacient	pohlaví	věk	diagnóza (mutace v genu)	SPR ve F	KMEM ve S	poznámka
P16	M	4 m.	<i>TMEM70</i> (c.[317-2A>G];[317-2A>G])	v normě	↓↓↓ oxidace pyruvátu, malátu a sukcinátu, ↓↓↓1/3, ↑↑4/1	† 1rok a 4 měsíce
P17	M	6 m.	<i>TMEM70</i> (c.[317-2A>G];[317-2A>G])	v normě	NA	
P18	M	4 m.	<i>TMEM70</i> (c.[317-2A>G];[317-2A>G])	v normě	↓↓↓ oxidace pyruvátu a sukcinátu, ↓↓↓1/3, ↑↑↑2/1, ↑↑↑↑4/1, ↓↓3/5	† 2 roky

↓↓↓ pokles na 0–35 %, ↓↓ pokles na 36–70 %, ↓ pokles na 71–100 %, ↑ nárůst na 101–135 %, ↑↑ nárůst na 136–170 %, ↑↑↑ nárůst na 171–200 %, ↑↑↑↑ nárůst na 201–300 %, ↑↑↑↑↑ nárůst na 301–400 % kontrolních hodnot. Vysvětlení zkratk: CS citrátsyntáza, F fibroblasty, KI NADH:ubichinonoxidoreduktáza, KII sukcinát:ubichinonoxidoreduktáza, KIII cytochrom *bc1* komplex, KIV cytochrom *c* oxidáza, m měsíc, M muž, NA nebylo analyzováno, S sval, SPR spektrofotometrie, † úmrtí. Složení inkubací analýzy KMEM:

1 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP, 2 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + karnitin + ADP, 3 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát – ADP, 4 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát – ADP + CCCP,  
5 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP + atraktylosid

**Tabulka 8: Vstupní biochemická a molekulárně-genetická data souboru linií kultivovaných kožních fibroblastů od pacientů s prokázaným kombinovaným deficitem OXPHOS (P19–P22) a s deficitem Krebsova cyklu (P23). Spektrofotometrické výsledky měření ve fibroblastech a výsledky měření KMEM ve svalové tkáni, jsou-li k dispozici.**

pacient	pohlaví	věk	diagnóza (mutace v genu)	SPR ve F	KMEM ve S	poznámka
P219	M	7. t. †	<i>TSM</i> (c.[446G>A];[856C>T])	v normě	NA	† 7. t.
P20	M	4 m.	<i>OPA1</i> (c.[1062_1064delAGA];[1768C>T])	v normě	NA	† 10 m., bratr P22
P21	M	9 m.	<i>OPA1</i> (c.[1062_1064delAGA];[1768C>T])	v normě	↓↓ oxidace pyruvátu, malátu a sukcinátu, ↓↓↓1/3, ↑2/1, ↓3/5, ↓↓6/1	† 1 r., bratr P21
P22	M	13 r.	<i>TYMP</i> (c.[261G>T] + Chr22:del492275958_49362964)	↓↓↓ TYMP	NA	
P23	Ž	2 m.	<i>FH</i> (c.[1127A>C];[1127A>C])	↓↓↓ FH	NA	

↓↓↓ pokles na 0–35 %, ↓↓ pokles na 36–70 %, ↓ pokles na 71–100 %, ↑ nárůst na 101–135 %, ↑↑ nárůst na 136–170 %, ↑↑↑ nárůst na 171–200 %, ↑↑↑↑ nárůst na 201–300 %, ↑↑↑↑↑ nárůst na 301–400 % kontrolních hodnot. Vysvětlení zkratk: CS citrátsyntáza, F fibroblasty, FH fumaráthydratáza, KI NADH:ubichinonoxidoreduktáza, KII sukcinát:ubichinonoxidoreduktáza, KIII cytochrom *bcl* komplex, KIV cytochrom *c* oxidáza, m měsíc, M muž, NA nebylo analyzováno, r rok, S sval, SPR spektrofotometrie, t týden, TYMP thymidinofosforyláza, Ž žena, † úmrtí. Složení inkubační analýzy KMEM: 1 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP, 2 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + karnitin + ADP, 3 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát – ADP, 5 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP + atraktylosid, 6 [U-<sup>14</sup>C] malát + pyruvát + malonát + ADP

**Tabulka 9: Vstupní biochemická a molekulárně-genetická data souboru linií kultivovaných kožních fibroblastů od pacientů se sekundární deficitem OXPHOS (Huntingtonova choroba (HD) (P24–P30)).** Tabulka uvádí výsledky spektrofotometrické měření ve fibroblastech a výsledky měření KMEM ve svalové tkáni, jsou-li k dispozici. Dále pak počet CAG repetic a věk nástupu nemoci, je-li znám.

pacient	pohlaví	věk v době odběru F	počet CAG repetic	SPR ve F	věk nástupu nemoci	poznámka
P24	Ž	34 r.	20/53	↓↓KIV, ↓↓CS	27 r.	
P25	M	40 r.	19/48	↑↑↑KIV, ↑↑CS	35 r.	
P26	M	42 r.	24/42	NA	28 r.	
P27	Ž	74 r.	17/40	↑↑↑↑KI, ↓↓↓KIV, ↓↓CS	70 r.	† 75 r.
P28	M	39 r.	28/49	↓↓KIV, ↓↓CS, ↑↑KIV/CS	neznámý	
P29	Ž	48 r.	20/44	↑↑↑KI, ↓↓↓KIV, ↓↓CS	neznámý	† 48 r.
P30	M	62 r. †	19/44	↓↓CS	neznámý	† 62 r.

↓↓↓ pokles na 0–35 %, ↓↓ pokles na 36–70 %, ↓ pokles na 71–100 %, ↑ nárůst na 101–135 %, ↑↑ nárůst na 136–170 %, ↑↑↑ nárůst na 171–200 %, ↑↑↑↑ nárůst na 201–300 %, ↑↑↑↑↑ nárůst na 301–400 % kontrolních hodnot. Vysvětlení zkratk: CS citrátsyntáza, F fibroblasty, KI NADH:ubichinonoxidoreduktáza, KII sukcinát:ubichinon-oxidoreduktáza, KIII cytochrom *bcl* komplex, KIV cytochrom *c* oxidáza, M muž, NA nebylo analyzováno, r rok, SPR spektrofotometrie, Ž žena, † úmrtí.

#### 4.1.2. Použité chemikálie

Acetyl-DL-karnitin	Sigma - Aldrich (USA)
AcetylkoenzymA	Sigma - Aldrich (USA)
ADP	Sigma - Aldrich (USA)
Arsenit	Sigma - Aldrich (USA)
Atraktylosid	Sigma - Aldrich (USA)
BSA	Sigma - Aldrich (USA)
CCCP (karboxyl kyanid m-chlorofenyl hydrazon)	Sigma - Aldrich (USA)
Chlorid hořečnatý	Sigma - Aldrich (USA)
Digitonin	Sigma - Aldrich (USA)
DMSO	Sigma - Aldrich (USA)
DTNB (Ellmanovo činidlo, kyselina 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová)	Sigma - Aldrich (USA)
EDTA	Sigma - Aldrich (USA)
Ethanol (96%)	Penta (ČR)
Hydroxid draselný	Penta (ČR)
Hydroxid sodný	Penta (ČR)
Kyselina chloristá	Penta (ČR)
Kyselina chromsírová	Penta (ČR)
Kyselina oxaloctová	Sigma - Aldrich (USA)
L-karnitin	Sigma - Aldrich (USA)
Malát	Sigma - Aldrich (USA)
Malonát	
<i>n</i> -Dodecyl $\beta$ -D-maltoside (laurylmaltosid)	Sigma - Aldrich (USA)
p <sup>1</sup> ,p <sup>5</sup> -di(adenosin-5')pentafofát (Ap5A)	Sigma - Aldrich (USA)

Pyruvát sodný	Sigma - Aldrich (USA)
Sukcinát sodný	Sigma - Aldrich – (USA)
Síran měďnatý	Penta (ČR)
Tris/HCl	Sigma - Aldrich (USA)
U- <sup>14</sup> C malát	PerkinElmer (USA)
Uhličitan sodný	Penta (ČR)
Vinan sodno-draselný	Sigma - Aldrich (USA)
1- <sup>14</sup> C pyruvát	PerkinElmer (USA)
1,4- <sup>14</sup> C sukcinát	Moravek Biochemicals (USA)

**Komerčně dodávané roztoky:**

<b>Antibiotický a antimykotický roztok</b>	Biosera (Francie)
[100x konc., streptomycin sulfát, penicilin G sodný]	
<b>BCS (scintilační koktejl)</b>	Amersham (UK)
<b>DMEM se stabilním L-glutaminem</b>	Biochrom (Německo)
<b>Ethanolum benzino denaturatum</b>	Penta(ČR)
[roztok 96% ethanolu a 1% lékařského benzínu]	
<b>FBS</b>	Thermo Scientific (USA)
<b>Folinovo reagens</b>	Penta (ČR)
<b>PBS</b> [10x koncentrovaný: 56mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,54M NaCl, 10mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,4]	Lonza (Švýcarsko)
<b>T + E</b> (Trypsin + EDTA roztok)	Biosera (Francie)
[10x koncentrovaný; 0,5% (w/v) trypsinu, 0,2% (w/v) EDTA v roztoku PBS]	



### V laboratoři připravené roztoky:

**BSA** [0,2 mg/ml]

**KTEA** [100mM KCl; 50mM Tris/HCl pH 7,5; 2mM EDTA;  
2 µg/ml (w/v) Aprotinin]

**Pracovní pufr pro KMEM** [30mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,4; 75mM KCl; 8mM Tris;  
1,6mM EDTA; 5mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2mM Ap5A]

**Roztok Lowry A** [0,4% (w/v) NaOH, 2% (w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>]

**Roztok Lowry B** [0,5% (w/v) CuSO<sub>4</sub>]

**Roztok Lowry C** [1% (w/v) vinan sodnodraselný]

#### 4.1.3. Použité přístroje

Analytické váhy HA – 120M	Helago (Japonsko)
Autokláv MAC - 235EX	Sanyo (Japonsko)
CCD kamera DP50	Olympus (Japonsko)
Centrifuga Mikro 200	Hettich Zentrifugen (Německo)
Centrifuga Universal 32R	Hettich Zentrifugen (Německo)
Dávkovač Dispensette	BRAND (Německo)
Hybridizační pec	Stuart Scientific (UK)
Laminární box Air Clean	AirClean Systems (USA)
Mikropipety (automatické pipety)	Eppendorf (Německo), Gilson (USA), Thermo Scientific (USA) Nichiryo (USA)
Magnetická míchačka	VELP Scientifica (Itálie)
Mikroskop Nikon Diaphot 200	Nikon (Japonsko)
Mikrocentrifuga	ROTH (Německo)
Minicentrifuga	MPW (Polsko)

pH metr 774	Metrohm (Švýcarsko)
Pipetman	Hirschmann (Německo)
Scintilační analyzátor LS 6 500	Beckman (USA)
Spektrofotometr UV-2401PC	Shimadzu (Japonsko)
Termoblok LABNet	LABNet Int. (USA)
Termomixer	Eppendorf (Německo)
Termostat TCH100	Laboratorní přístroje Praha (ČR)
Termostat Sanyo CO <sub>2</sub> incubator	Sanyo (Japonsko)
Termostat Heratherm IMC 18	Thermo Scientific (USA)
Třepací vodní lázeň	Elphin+
Váhy	KERN (Německo)
Vortex-Genie 2	Scientific Industries (USA)
Vortex IKA MS3 basics, MS2	IKA (Německo)
Vortex 2x <sup>3</sup>	VELP Scientifica (Itálie)

## 4.2. Metody

### 4.2.1. Kultivace fibroblastů

Kožní fibroblasty byly pěstovány v kultivačních lahvích o ploše 75 cm<sup>2</sup> s 10 ml DMEM media s 1% (w/v) ATB, 10% iFBS, 25 mM glukózou (4,5 g/l) a 2mM L-glutaminem (0,580 g/l) do konfluency 90–100 % a poté byly pasážovány. V rámci pasážování bylo nejprve odsáto médium a kultivační plocha byla opláchnuta 5 ml 1% (w/v) PBS. Následně byly buňky trypsinizovány 1,5 ml 1% (w/v) roztoku T + E při 37 °C po dobu 10 min. Poté bylo k buňkám přidáno 20 ml DMEM media s 1% (w/v) ATB, 10% iFBS a obsah kultivační lahve byl rozdělen do 2 lahví a důkladně resuspendován. Kultivace probíhala v termmostatu (Sanyo CO<sub>2</sub> incubator) při 37 °C a 5% CO<sub>2</sub>.

### 4.2.2. Sklizení fibroblastů pro účely měření KMEM

Kožní fibroblasty (6 kultivačních lahví o ploše 75 cm<sup>2</sup>) byly pěstovány do konfluency cca 80 %, kdy docházelo k průběžné kontrole pod mikroskopem (Nikon Diaophon 200). Poté bylo odsáto médium, kultivační plocha byla opláchnuta 5 ml 1% (w/v) PBS a buňky byly trypsinizovány 1,5 ml 1% (w/v) roztoku T + E při 37 °C. Po 10 min trypsinizace byly buňky přeneseny do 15ml centrifugační zkumavky s 5 ml ledového media, ve kterém byly kultivovány a centrifugovány (10 min, 3 800 g, 4 °C, Centrifuga Universal 32R). Poté byla peleta buněk resuspendována v 1 ml ledového PBS a přenesena do 1,5 ml centrifugační zkumavky a centrifugována (10 min, 3 800 g, RT, Centrifuga Mikro 200).

Následně bylo odsáto PBS, byla zvážena hmotnost vlhké pelety (Analytické váhy HA – 120M) a buňky byly resuspendovány v novém PBS (200 µl PBS/50 mg vlhké váhy pelety). Poté byly buňky inkubovány 20 min s 0,8mM roztokem digitoninu (0,3 µl roztoku digitoninu/1 mg vlhké váhy pelety) při 4 °C. Z tohoto vzorku bylo pak odebráno 20 µl na stanovení koncentrace proteinu (Lowry, (5.2.4.)), 100 µl na stanovení aktivity citrát syntázy (Srere, (5.2.5.)) a 100 µl bylo následně využito na měření KMEM (5.2.3.).

#### 4.2.3. Měření kapacity mitochondriálního energetického metabolismu

Analýza KMEM byla měřena v sérii 10 inkubací obsahujících  $^{14}\text{C}$  značený pyruvát, malát anebo sukcinát, dále pak různé donory a akceptory acetyl-CoA a inhibitory KC. Jednotlivé inkubace obsahují pracovní pufr pro KMEM (5.1.2.) a dle indikace 2mM ADP, 1mM pyruvát, 1mM malát, 1mM sukcinát, plus/mínus  $[1-^{14}\text{C}]$ pyruvát,  $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ malát a  $[1,4-^{14}\text{C}]$ sukcinát, 5mM L-karnitin, 2mM acetyl-D,L-karnitin, 2mM arsenit sodný, 5mM malonát, 2 $\mu\text{M}$  CCCP, 40 $\mu\text{M}$  atraktylosid (tabulka 2). Po regeneraci ADP pomocí kreatinkinázy byl do všech reakcí obsahujících ADP přidán 20mM kreatin. Tyto inkubace (bez  $^{14}\text{C}$  substrátu byly připravovány v množství 50 alikvotů a skladovány při  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ ). Těsně před měřením byla pak vždy jedna série rozmrazena na ledu, rozpipetována do 24 skleněných lahviček o objemu 0,2 ml po 35  $\mu\text{l}$  ( $2 \times 10$  inkubací (tabulka 2) plus  $4 \times$  blank (místo vzorku přidáván roztok KTEA)) a bylo přidáno vždy 10  $\mu\text{l}$  příslušného pracovního roztoku substrátu. Pracovní roztok substrátu je připraven těsně před měřením a to následovně: nejprve je substrát naředěn 100mM HCl dle tabulky 10 a inkubován 10 min při  $37\text{ }^\circ\text{C}$  (dochází k vychytávání samovzniklého  $^{14}\text{CO}_2$ ), následně je k substrátu přidán 20mM Tris (pH = 8) a v případě  $[1-^{14}\text{C}]$ pyruvátu navíc přidán 100mM pyruvát, který byl čerstvě ředěn (tabulka 10).

**Tabulka 10: Příprava pracovních roztoků značených substrátů pro metodu KMEM.**

	$[1-^{14}\text{C}]$ pyruvát	$\text{U}-^{14}\text{C}$ malát	$[1,4-^{14}\text{C}]$ sukcinát
zásobní roztok příslušného substrátu [ $\mu\text{l}$ ]	3,5	2	2,4
100mM HCl [ $\mu\text{l}$ ]	13,92	8	9,6
100mM pyruvát [ $\mu\text{l}$ ]	8,7		
20mM Tris pH = 8 [ $\mu\text{l}$ ]	148	90	48
výsledný objem [ $\mu\text{l}$ ]	174	100	60

Inkubace byly prováděny v třepací vodní lázni (Třepací vodní lázeň Elphin+) při  $37\text{ }^\circ\text{C}$  v 0,2ml skleněných lahvičkách s víčky s filtrem a gumovým septem. Měření bylo startováno přidáním 5  $\mu\text{l}$  vzorku (inkubace 1–20) nebo KTEA roztoku (inkubace 20–24) a stopováno 50  $\mu\text{l}$  3M  $\text{HClO}_4$  přes gumové septum pomocí mikrodávkače Hamilton. Množství vzniklého  $^{14}\text{CO}_2$  bylo následně jímáno na filtrační papírek nasycený 1M NaOH po dobu jedné hodiny při  $4\text{ }^\circ\text{C}$ . Poté byl filtr přenesen do scintilační lahvičky se 3 ml roztoku BCS a druhý den byla změřena hodnota radioaktivity pomocí přístroje

Beckman Counter (Scintilační analyzátor LS 6 500). Celkem bylo na jedno měření potřeba 100  $\mu\text{l}$  buněčného lyzátu a dalších 120  $\mu\text{l}$  buněčného lyzátu bylo uskladněno při  $-20^\circ\text{C}$  na pozdější spektrofotometrické stanovení koncentrace proteinu (Lowry et al., 1951) a aktivity citrát syntázy (Srere, 1969), nezbytné pro vyhodnocení analýzy KMEM. Katalytická aktivita jednotlivých inkubací byla vypočtena podle vzorce 1 a výsledky KMEM byly vyhodnoceny pomocí programu Microsoft Excel.

**Vzorec 1: Výpočet katalytické aktivity ( $A_{kat}$ ) KMEM**

$$A_{kat} = \frac{\frac{A_v}{A_{p,m,s}} - 3}{V \cdot c_{proteinu}} \quad [\text{nmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}]$$

$A_v$  = radioaktivita vzorku [ $\text{DPM} \cdot \text{blank} \cdot \text{nmol}^{-1} \cdot 20 \text{ min}^{-1}$ ];  $A_{p,m,s}$  = radioaktivita pyruvátu, malátu anebo sukcinátu [ $\text{DPM} \cdot \text{nmol}^{-1} \cdot 20 \text{ min}^{-1}$ ];  $V$  = objem vzorku ( $5 \cdot 10^{-3} \text{ ml}$ );  $c_{proteinu}$  = koncentrace proteinu [ $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ]

**4.2.4. Stanovení koncentrace proteinu dle Lowryho**

K 20  $\mu\text{l}$  vzorku lyzátu fibroblastů bylo přidáno 60  $\mu\text{l}$   $\text{dH}_2\text{O}$  a vzorek byl důkladně resuspendován. Poté bylo ze vzorku odebráno  $2 \times 5 \mu\text{l}$  a  $2 \times 10 \mu\text{l}$  a naředěno  $\text{dH}_2\text{O}$  do výsledného objemu 200  $\mu\text{l}$ . Koncentrace proteinu byla odečtena z kalibrační křivky (tabulka 11) a přepočtena podle vzorce 2.

**Tabulka 11: Objem BSA a  $\text{dH}_2\text{O}$  pro vytvoření kalibrační křivky pro měření koncentrace proteinů dle Lowryho.**

koncentrace [ $\mu\text{g}$ ]	množství BSA [ $\mu\text{l}$ ]	množství $\text{dH}_2\text{O}$ [ $\mu\text{l}$ ]
0	0	200
5	25	175
10	50	150
15	75	125
20	100	100
25	125	75

K našim vzorkům i vzorkům kalibrační křivky byl přidán 1 ml roztoku MIX, připraveného smícháním zásobních roztoků A + B + C (4.1.2.) v poměru 45 : 1 : 1. Vzorky byly zamíchány (Vortex  $2x^3$ ) a inkubovány 15 min, RT. Poté bylo ke všem vzorkům přidáno 100  $\mu\text{l}$  Folinova reagens (čerstvě naředěný  $\text{dH}_2\text{O}$  v poměru 1 : 1) a okamžitě promícháno (Vortex  $2x^3$ ). Vzorky byly inkubovány 30 min, RT a poté byla změřena absorbance při 700 nm (Spektrofotometr UV-2401PC).

### Vzorec 2: Výpočet koncentrace proteinu ( $c_{proteinu}$ ).

$$c_{proteinu} = \frac{c}{V} \cdot \text{ředění} \quad [\text{mg/ml}]$$

$c$  = koncentrace změřená pomocí spektrofotometru [ $\text{mg} \cdot 10^{-3}$ ];  $V$  = objem vzorku [ $\text{ml} \cdot 10^{-3}$ ])

#### 4.2.5. Stanovení aktivity citrátsyntázy (CS)

Hodnota citrátsyntázy (CS) se běžně používá jako kvantitativní marker intaktních mitochondrií. Principem stanovení aktivity CS je měření absorbance SH skupiny volného CoA-SH pomocí DTNB (Ellmanovo reagens). Tato reakce se sleduje při 412 nm, kdy má mercaptidový ion největší absorbanci.

**Princip stanovení aktivity citrátsyntázy:**



K 100  $\mu\text{l}$  vzorku bylo přidáno 10  $\mu\text{l}$  15% (w/v) laurylmaltosidu a směs byla inkubována 15 min na ledu. Poté byla směs centrifugována (3 min, 9 000 g, RT, Centrifuga Mikro 200). Následně byl supernatant přenesen do nové zkumavky a poté bylo odebráno  $2 \times 30 \mu\text{l}$  na stanovení aktivity CS. Aktivita CS byla stanovena v reakční směsi obsahující 100mM TRIS/HCl (pH = 8,1), 0,1mM DTNB, 30  $\mu\text{l}$  fibroblastů a 0,5mM acetyl-CoA. Po zaznamenání pozadí při 412 nm (Spektrofotometr UV-2401PC) po dobu 120 sekund byla reakce startována přidávkem 0,5mM oxalacetátu. Výpočet specifické aktivity (vzorec 3) byl proveden po odečtení pozadí.

### Vzorec 3: Výpočet specifické aktivity (SA) citrátsyntázy

$$SA = \frac{\bar{A} \cdot 10^3}{\varepsilon \cdot l \cdot c_{proteinu} \cdot V} \quad [\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}]$$

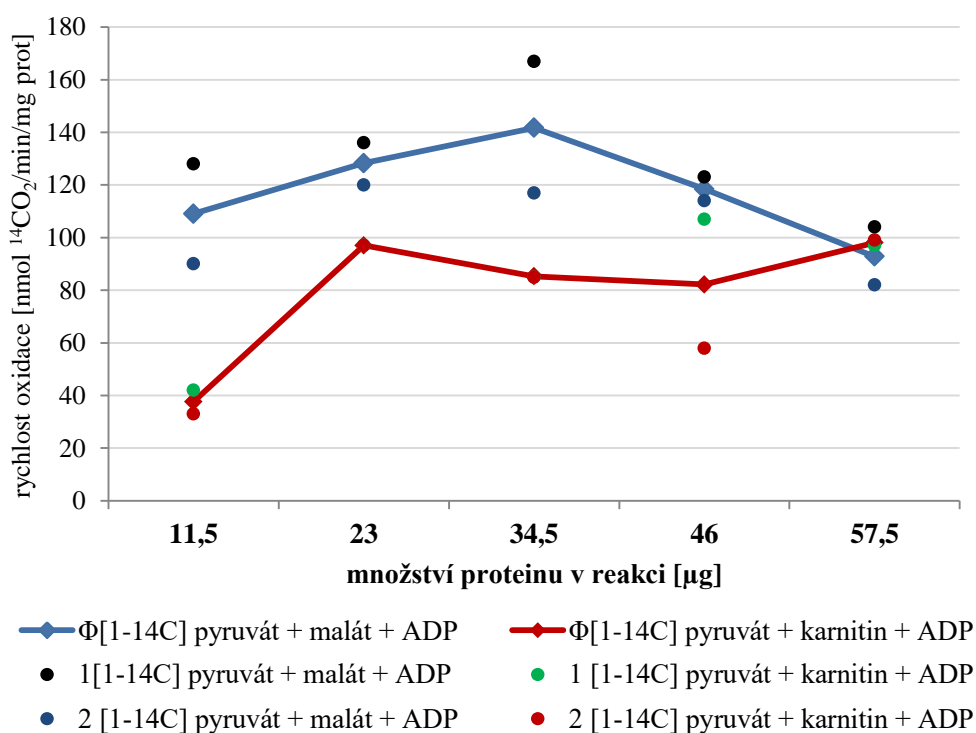
$\bar{A}$  = aritmetický průměr naměřených hodnot;  $\varepsilon$  = molární absorpční koeficient [ $\text{dm}^3 \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ ] (13,6);  
 $l$  = délka absorpčního prostředí (1 cm);  $c_{proteinu}$  = koncentrace proteinu [mg/ml];  
 $V$  = objem vzorku ( $30 \cdot 10^{-3}$  ml)

## 5. Výsledky

### 5.1. Optimalizace metody KMEM ve fibroblastech

#### 5.1.1. Závislost aktivity na množství proteinu v metodě analýzy KMEM

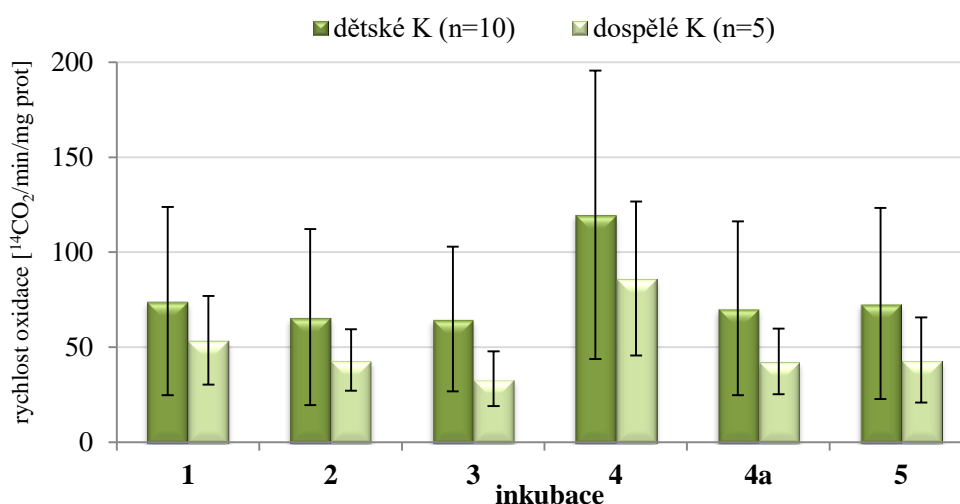
V rámci optimalizace metody KMEM v kultivovaných kožních fibroblastech jsme testovali závislost množství proteinu na míře oxidace jednotlivých inkubací (množství vzniklého produktu). Pro testování jsme zvolili měření aktivit v reakcích 1 a 2 (tabulka 2) a rozmezí vzorku ~ 10–60  $\mu\text{g}$  proteinu na reakci (graf 1). Jako optimální bylo vybráno množství ~ 35  $\mu\text{g}$  proteinu v jedné reakci. Toto množství odpovídá následujícímu ředění buněčné pelety: 200  $\mu\text{l}$  PBS/50  $\mu\text{g}$  vlhké váhy pelety. Pro jedno měření KMEM a následné stanovení koncentrace proteinu a aktivity citrát syntázy potřebujeme celkem 6 kultivačních lahví (75  $\text{cm}^2$ ) s konfluencí buněk ~ 80 %.



**Graf 1:** Míra oxidace reakcí 1 ([1- $^{14}\text{C}$ ] pyruvát + malát + ADP) a (2 [1- $^{14}\text{C}$ ] pyruvát + karnitin + ADP) v závislosti na množství proteinu (celkem 5 různých koncentrací proteinu v rozmezí 11,5–57,5  $\text{mg}$ ) ve vzorku. Míra oxidace inkubací 1 a 2 byla měřena v doubletech.

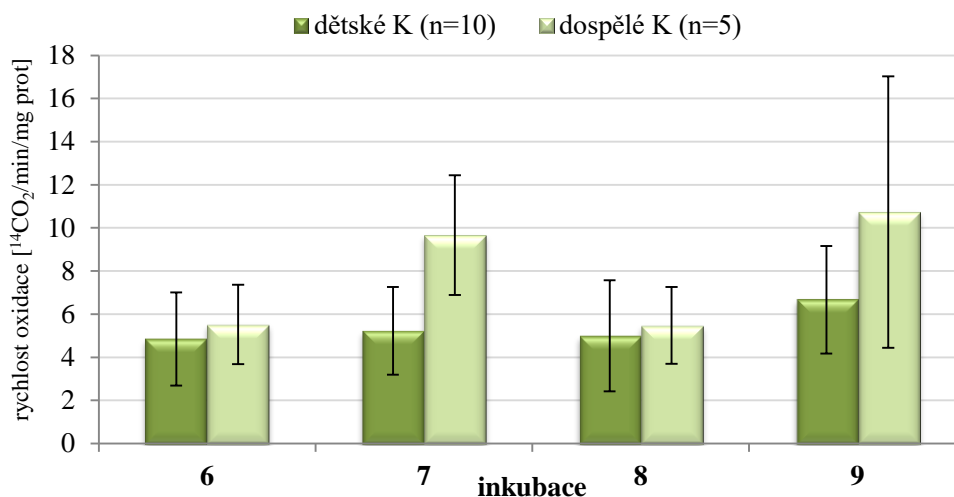
### 5.1.2. Vliv věku pacientů na KMEM

Následně jsme testovali, zda jsou hodnoty KMEM pro jednotlivé inkubace ovlivňované věkem osoby v době odběru fibroblastů. Celkem jsme provedli analýzu KMEM u 10 kontrolních linií fibroblastů v rozmezí novorozeneckého věku až pátého roku života (K1–K10) a u 5 kontrolních linií fibroblastů dospělého věku (K11–K15) (tabulka 3), pro každou linii (kromě K2 a K14) jsme provedli analýzu KMEM minimálně dvakrát nezávisle na sobě. Výsledné naměřené hodnoty byly normalizovány na množství proteinu a aktivitu CS (viz příloha 1 a 2, hodnoty poměrů inkubací viz příloha 3 a 4). Z aktivity jednotlivých inkubací analýzy KMEM (tabulka 2) pro každou linii kontrolních fibroblastů byla následně spočítána průměrná aktivita pro skupinu K1–K10 (dětské K) a pro skupinu K11–K15 (dospělé K) a její směrodatná odchylka. Tyto hodnoty byly vyneseny do grafů (graf 2 a 3). Byly také vyneseny hodnoty poměrů jednotlivých inkubací pro obě skupiny spolu se směrodatnými odchylkami (graf 4).



**Graf 2: Porovnání rychlosti oxidace [1-<sup>14</sup>C] pyruvátu v inkubacích 1–5 kontrolních linií K1–K10 a K11–K15.** Vysvětlení zkratk: K kontrola, n počet měření. Složení inkubací analýzy KMEM: 1 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP, 2 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + karnitin + ADP, 3 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát – ADP, 4 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát – ADP + CCCP, 4a [1-<sup>14</sup>C] pyruvát – karnitin + ADP, 5 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP + atraktylosid.

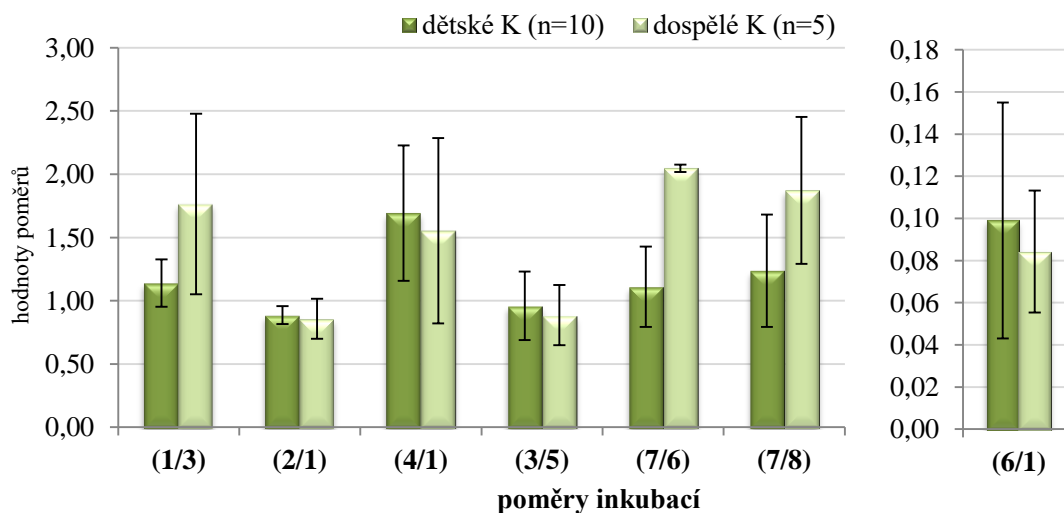




**Graf 3: Porovnání rychlosti oxidace  $[\text{U-}^{14}\text{C}]$  malátu a  $[\text{1,4-}^{14}\text{C}]$  sukcinátu v inkubacích 6–9 kontrolních linií K1–K10 a K11–K15.** Vysvětlení zkratk: K kontrola, n počet měření. Složení inkubací analýzy KMEM:

6  $[\text{U-}^{14}\text{C}]$  malát + pyruvát + malonát + ADP, 7  $[\text{U-}^{14}\text{C}]$  malát + acetylkarnitin + malonát + ADP, 8  $[\text{U-}^{14}\text{C}]$  malát + acetylkarnitin + arsenit + ADP, 9  $[\text{1,4-}^{14}\text{C}]$  sukcinát + acetylkarnitin + ADP.

Míra oxidace jednotlivých inkubací KMEM se v rámci věkových skupin liší. U dospělé kontrolní skupiny pozorujeme nižší metabolický obrat v případě inkubací obsahujících  $[\text{1-}^{14}\text{C}]$  pyruvát (graf 2) a vyšší metabolický obrat v případě inkubací obsahujících  $[\text{U-}^{14}\text{C}]$  malát a  $[\text{1,4-}^{14}\text{C}]$  sukcinát (graf 3). Též se liší poměry jednotlivých inkubací (graf 4). Proto je potřeba měření KMEM patientských vzorků vždy korelovat s kontrolní skupinou vzorků odpovídajícího věku.



**Graf 4: Porovnání poměrů jednotlivých inkubací K1–K10 a K11–K15.** Vysvětlení zkratk:

K kontrola, n počet měření. Složení inkubací analýzy KMEM:

- 1  $[\text{1-}^{14}\text{C}]$  pyruvát + malát + ADP, 2  $[\text{1-}^{14}\text{C}]$  pyruvát + karnitin + ADP,
- 3  $[\text{1-}^{14}\text{C}]$  pyruvát + malát – ADP, 4  $[\text{1-}^{14}\text{C}]$  pyruvát + malát – ADP + CCCP,
- 5  $[\text{1-}^{14}\text{C}]$  pyruvát + malát + ADP + atraktylosid, 6  $[\text{U-}^{14}\text{C}]$  malát + pyruvát + malonát + ADP,
- 7  $[\text{U-}^{14}\text{C}]$  malát + acetylkarnitin + malonát + ADP, 8  $[\text{U-}^{14}\text{C}]$  malát + acetylkarnitin + arsenit + ADP.

## 5.2. Identifikace poruch OXPHOS na úrovni kultivovaných kožních fibroblastů pomocí metody KMEM

### 5.2.1. Analýza KMEM u pacientů s primární mitochondriální poruchou

Analýzu KMEM jsme provedli celkem u 23 pacientů s primární poruchou OXPHOS. Soubor pacientů se skládá z 9 pacientů s deficitem OXPHOS na úrovni KI (2 × mutace v genu *ND1*, 1 × mutace v genu *ND3*, 6 × mutace v genu *ND5*, tabulka 4 a tabulka 5). Dále z 6 pacientů s deficitem OXPHOS na úrovni KIV (3 × mutace v genu *SURF1*, 3 × mutace v genu *SCO2*, tabulka 6), 3 pacientů s deficitem F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>ATP syntázy (3 × mutace v genu *TMEM70*, tabulka 7) a 5 pacientů s kombinovaným deficitem OXPHOS (1 × mutace v genu *TSMF*, 2 × mutace v genu *OPA1*, 1 × mutace v genu *TYMP*, 1 × mutace v genu *FH*, tabulka 8).

#### 5.2.1.1. KMEM u pacientů s poruchou OXPHOS na úrovni komplexu I

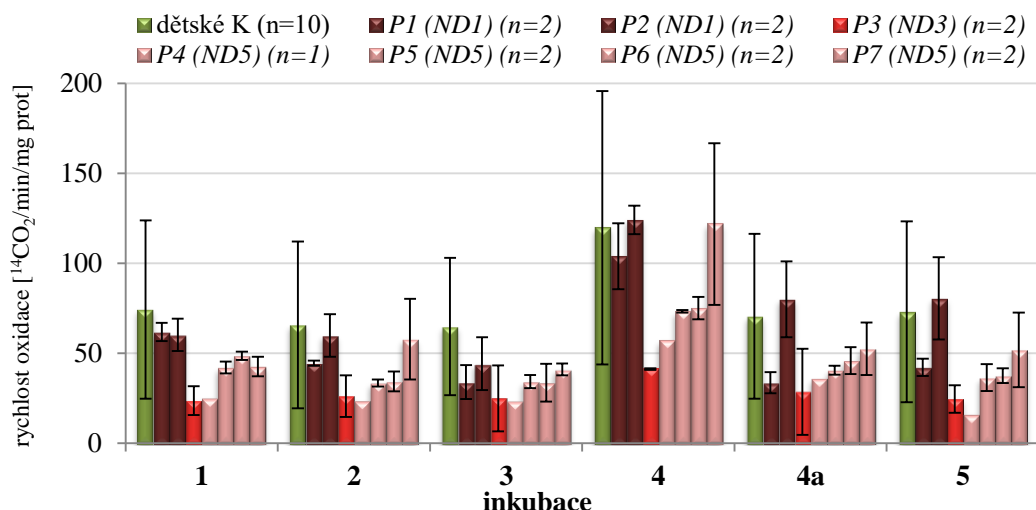
Soubor pacientů s deficitem KI byl rozdělen do dvou skupin. První skupinu pacientů představují pacienti P1–P7 ve věku do 10 let, druhou pak pacienti dospělí P8–P9. Naměřené hodnoty analýzy KMEM viz příloha 5–8.

##### *Pacienti ve věku do 10 let s poruchou KI*

V případě skupiny dětských pacientů pozorujeme sníženou oxidaci všech šesti reakcí obsahujících [1-<sup>14</sup>C] pyruvát (tabulka 2) u 6 (P1, P3–P7) ze 7 pacientů. U P2 pozorujeme tendenci ke snížení oxidace pouze u inkubací 1, 2 a 3 (graf 5).

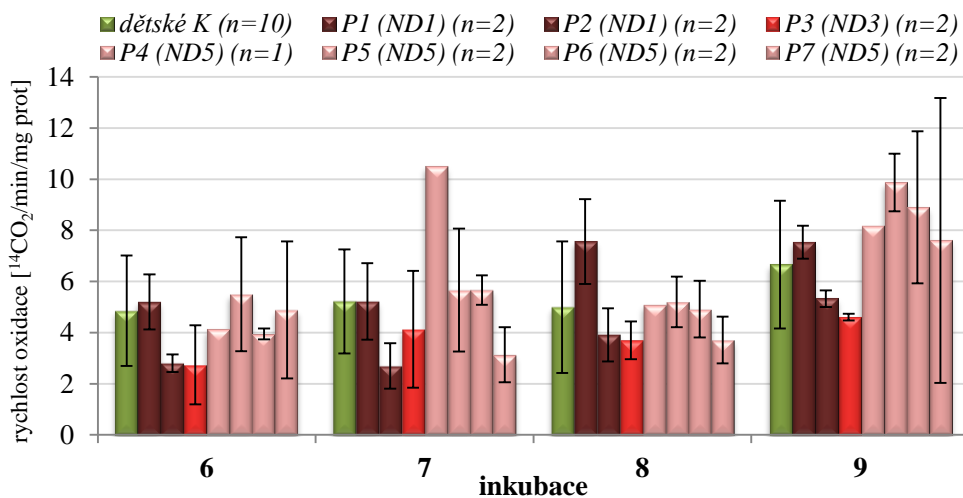
U inkubací obsahujících [U-<sup>14</sup>C] malát a [1,4-<sup>14</sup>C] sukcinát (tabulka 2) pozorujeme snížení pouze u P2 (*ND1*) a P3 (*ND3*), graf 6.

Z poměrů jednotlivých inkubací nedetekujeme žádné výrazné rozdíly, které by naznačovaly deficit KI, ale pozorujeme určitý trend. U 3 pacientů (P2, P3 a P7) ze 7 dochází k mírnému zvýšení poměru 2/1, který naznačuje deficit OXPHOS. U 4 pacientů (P2, P3, P4, P7) ze 7 byla detekována tendence ke zvýšení poměru inkubací 4/1 naznačující deficit KV či ANT. U pacienta P4 byl zjištěn zvýšený poměr 3/5. U pacienta P2 pozorujeme snížený poměr 6/1 naznačující též deficit OXPHOS. Tendenci ke snížení poměru 2/1 má i pacient P6. V případě P1 a P2 (mutace v genu *ND1*) dochází ke snížení poměru 7/8 naznačující deficit Krebsova cyklu ( $\alpha$ -KGD). U pacientů P3, P4 a P6 detekujeme zvýšený poměr inkubací 7/6 naznačující sníženou aktivitu PDHc (graf 7).



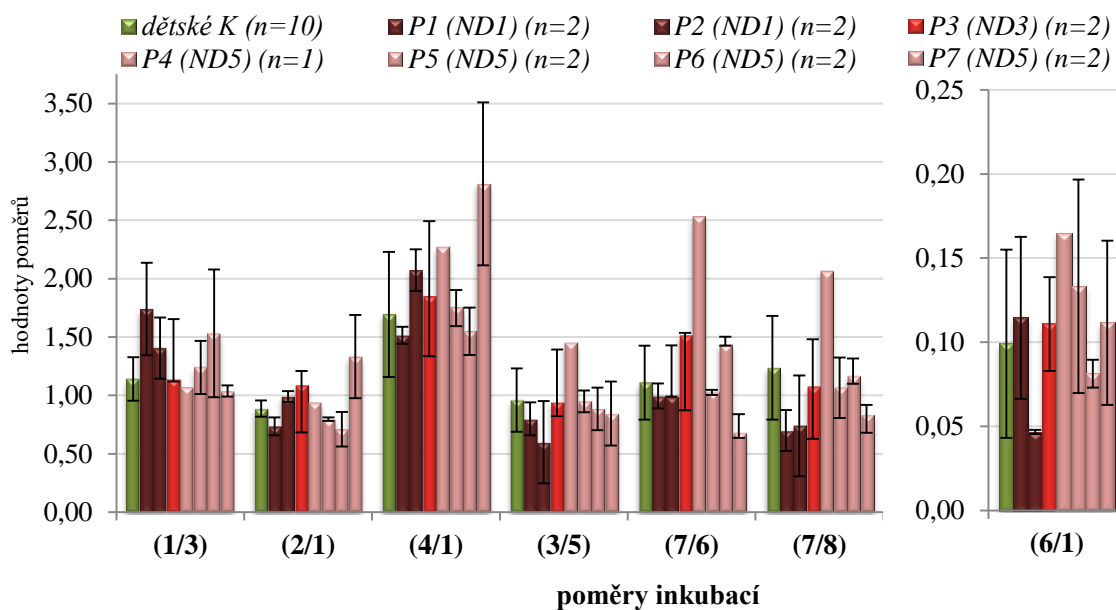
**Graf 5: Rychlosti oxidace [1-<sup>14</sup>C] pyruvátu v inkubacích 1–5 u pacientů s deficitem komplexu I (P1–P7) a kontrol K1–K10 (dětské K). P1–P2 (mutace v *ND1* genu), P3 (mutace v *ND3* genu) a P4–P7 (mutace v *ND5* genu). Vysvětlení zkratk: K kontrola, n počet měření. Složení inkubační analýzy KMEM:**

1 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP, 2 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + karnitin + ADP, 3 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát – ADP, 4 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát – ADP + CCCP, 4a [1-<sup>14</sup>C] pyruvát – karnitin + ADP, 5 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP + atraktylosid.



**Graf 6: Rychlost oxidace [U-<sup>14</sup>C] malátu a [1,4-<sup>14</sup>C] sukcinátu v inkubacích 6–9 u pacientů s deficitem komplexu I (P1–P7) a kontrol K1–K10 (dětské K). P1–P2 (mutace v *ND1* genu), P3 (mutace v *ND3* genu) a P4–P7 (mutace v *ND5* genu). Vysvětlení zkratk: K kontrola, n počet měření. Složení inkubační analýzy KMEM:**

6 [U-<sup>14</sup>C] malát + pyruvát + malonát + ADP, 7 [U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + malonát + ADP, 8 [U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + arsenit + ADP, 9 [1,4-<sup>14</sup>C] sukcinát + acetylkarnitin + ADP.

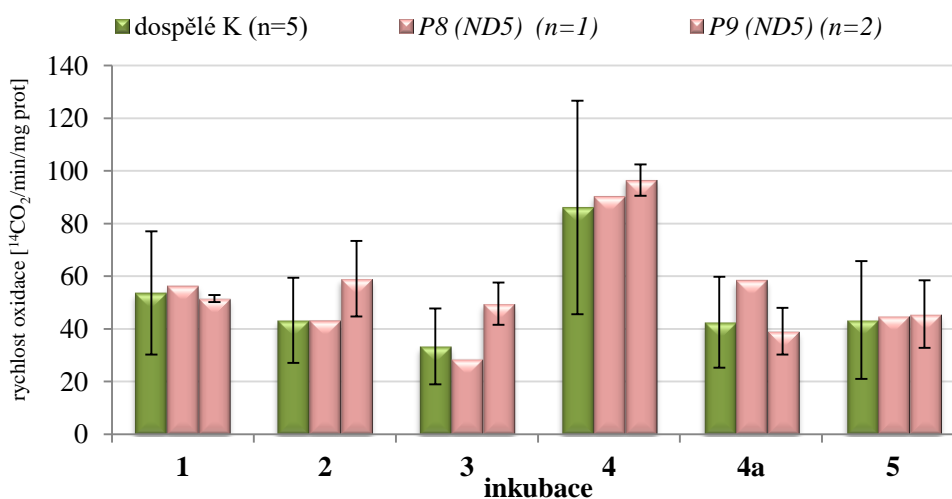


**Graf 7: Poměry jednotlivých inkubací u pacientů (P1–P7) s deficitem komplexu I a kontrol K1– K10 (dětské K). P1–P2 (mutacev *ND1* genu), P3 (mutace v *ND3* genu) a P4–P7 (mutace v *ND5* genu).** Vysvětlení zkratk: K kontrola, n počet měření. Složení inkubací analýzy KMEM:

- 1 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát +ADP, 2 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + karnitin + ADP,
- 3 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát – ADP, 4 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát – ADP + CCCP,
- 5 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP + atraktylosid, 6 [U-<sup>14</sup>C] malát + pyruvát + malonát + ADP,
- 7 [U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + malonát + ADP, 8 [U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + arsenit + ADP.

#### *Dospělí pacienti s deficitem KI*

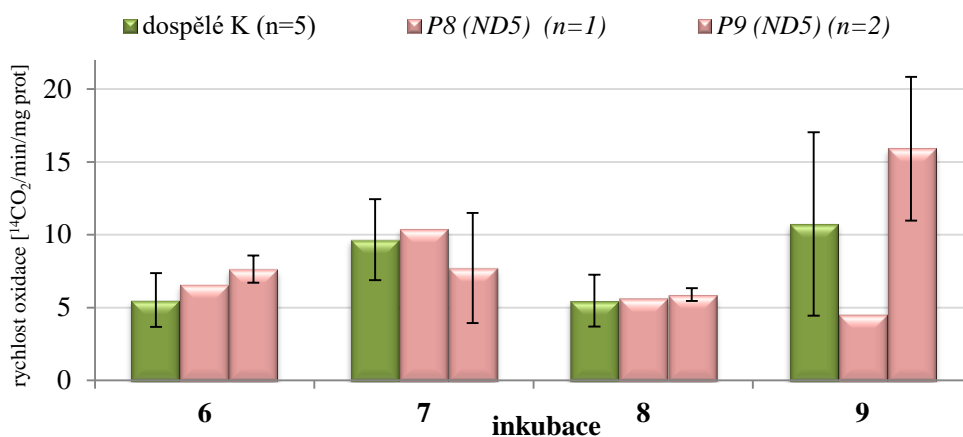
Skupinu dospělých pacientů s deficitem KI tvoří dva pacienti s mutací *ND5* genu (P8 a P9). Míra oxidace [1-<sup>14</sup>C] pyruvátu se oproti kontrolnímu souboru vzorků (K11–K15) významně neliší (graf 8).



**Graf 8: Rychlosti oxidace [1-<sup>14</sup>C] pyruvátu v inkubacích 1–5 u dospělých pacientů s deficitem komplexu I (P8–P9, mutace *ND5* genu) a kontrol K11–K15 (dospělé K).** Vysvětlení zkratk: K kontrola, n počet měření. Složení inkubací analýzy KMEM:

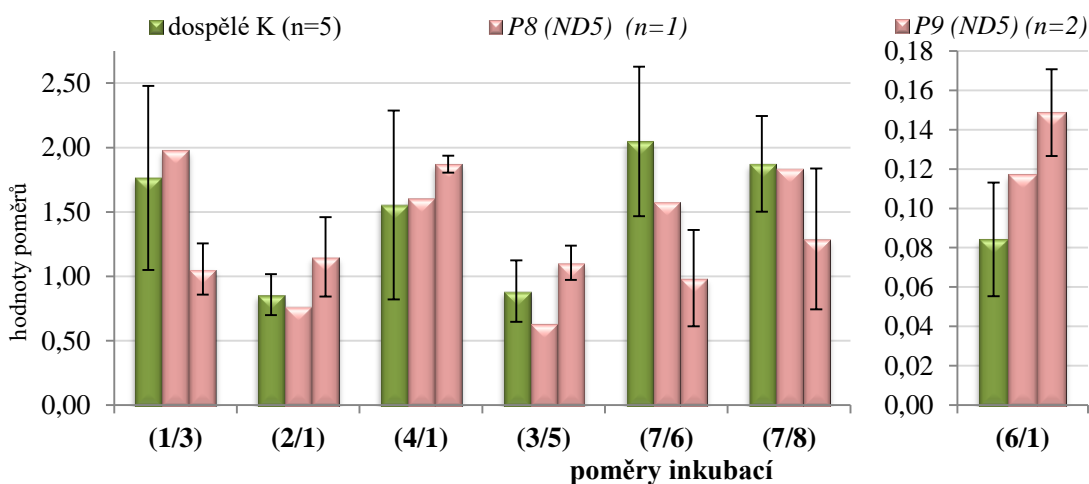
- 1 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP, 2 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + karnitin + ADP, 3 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát – ADP,
- 4 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát – ADP + CCCP, 4a [1-<sup>14</sup>C] pyruvát – karnitin + ADP,
- 5 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP + atraktylosid.

V případě oxidace inkubací obsahujících [U-<sup>14</sup>C] malát a [1,4-<sup>14</sup>C] sukcinát jsme detekovali rozdíl pouze u inkubace 9 ([1,4-<sup>14</sup>C] sukcinát + acetylkarnitin + ADP), kdy u pacienta P8 dochází k snížení oproti kontrolnímu vzorku a u P9 byla zjištěna naopak tendence ke zvýšení oxidace této inkubace (graf 9).



**Graf 9: Rychlosti oxidace [U-<sup>14</sup>C] malátu a [1,4-<sup>14</sup>C] sukcinátu v inkubacích 6–9 u dospělých pacientů s deficitem komplexu I (P8–P9, mutace ND5 genu) a kontrol K11–K15 (dospělé K).** Vysvětlení zkratk: K kontrola, n počet měření. Složení inkubací analýzy KMEM: 6 [U-<sup>14</sup>C] malát + pyruvát + malonát + ADP, 7 [U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + malonát + ADP, 8 [U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + arsenit + ADP, 9 [1,4-<sup>14</sup>C] sukcinát + acetylkarnitin + ADP.

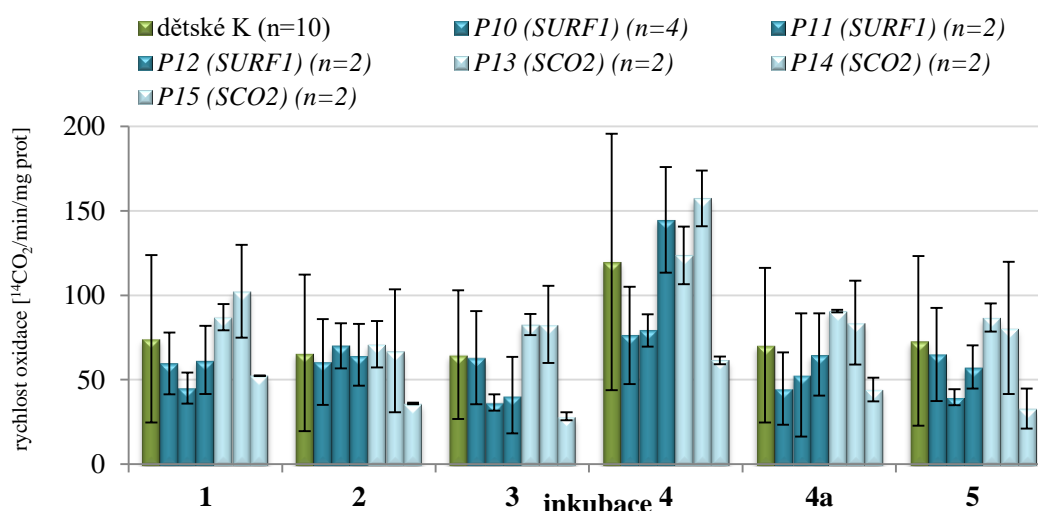
Z pohledu poměrů inkubací detekujeme u pacienta P9 tendenci ke snížení poměru 1/3 určující spřažení oxidativní fosforylace, tendenci ke zvýšení poměru 2/1 naznačující deficit OPXHOS a tendenci ke snížení poměru 7/8 určující sníženou aktivitu  $\alpha$ -KGD. U P8 jsme zjistili mírně snížený poměr 3/5 naznačující deficit OXPPOS.



**Graf 10: Poměry jednotlivých inkubací u dospělých pacientů s deficitem komplexu I (P8–P9, mutace ND5 genu) a kontrol K11–K15 (dospělé K).** Vysvětlení zkratk: K kontrola, n počet měření. Složení inkubací analýzy KMEM:: 1 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát +ADP, 2 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + karnitin + ADP, 3 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát – ADP, 4 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát – ADP + CCCP, 5 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP + atraktylosid, 6 [U-<sup>14</sup>C] malát + pyruvát + malonát + ADP, 7 [U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + malonát + ADP, 8 [U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + arsenit + ADP.

### 5.2.1.2. KMEM u pacientů s poruchou OXPHOS na úrovni komplexu IV

Soubor pacientů s deficitem KIV tvoří dvě podskupiny, první z nich P10–P12 nesou mutaci v genu *SURF1*, zbylí (P13–P15) pak mutaci v genu *SCO2*. Jednotlivé hodnoty analýzy KMEM viz příloha 9 a 10. U pacientů s mutací *SURF1* (P10–P12) detekujeme tendenci ke snížení oxidace inkubací obsahujících [1-<sup>14</sup>C] pyruvát. V případě skupiny pacientů s mutací *SCO2* genu (P13–P15) dochází ke snížení inkubací 1–5 pouze u 1 pacienta (P15) ze 3. V rámci skupin *SURF1* (P10–P12) i *SCO2* (P13–P15) bylo zjištěno podobné chování (graf 11).



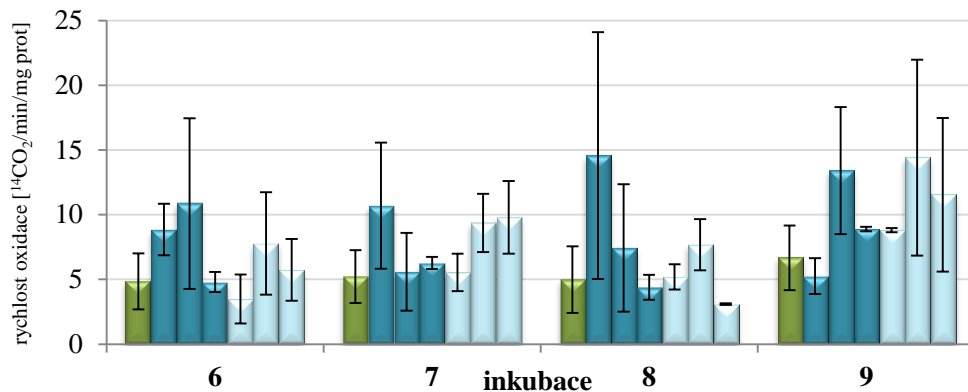
**Graf 11: Rychlosti oxidace [1-<sup>14</sup>C] pyruvátu v inkubacích 1–5 u pacientů s deficitem komplexu IV (P10–P15) a u kontrol K1–K10 (dětské K). P10–P12 (mutace v *SURF1* genu), P13–P15 (mutace ve *SCO2* genu).** Vysvětlení zkratk: K kontrola, n počet měření. Složení inkubací analýzy KMEM:

1 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP, 2 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + karnitin + ADP, 3 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát – ADP, 4 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát – ADP + CCCP, 4a [1-<sup>14</sup>C] pyruvát – karnitin + ADP, 5 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP + atraktylosid.

V případě inkubací obsahujících [U-<sup>14</sup>C] malát a [1,4-<sup>14</sup>C] sukcinát detekujeme u pacientů P10–P15 tendenci ke zvýšení oxidace inkubací 6–9 oproti kontrolnímu vzorku (K1–10), graf 12.

V případě poměrů inkubací u skupiny P10–P12 (mutace *SURF1* genu) byla zjištěna tendence ke zvýšení poměru 2/1 naznačující deficit OXPHOS. V případě skupiny P13–P15 (mutace ve *SCO2* genu) detekujeme tendenci ke snížení poměru 6/1, u pacienta P13 dochází k výraznému snížení poměru 6/1 naznačující deficit OXPHOS. Dále pak u skupiny P13–P15 detekujeme tendenci ke zvýšení poměru 7/6, naznačující sekundární narušení PDHc. U pacienta P15 pozorujeme narušení Krebsova cyklu (na úrovni  $\alpha$ -KGD), poměr 7/8.

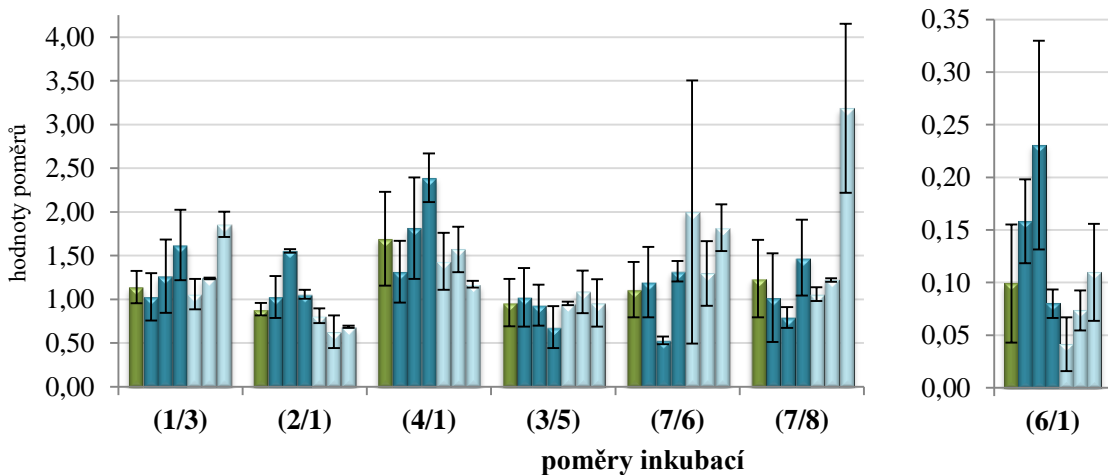
■ dětské K (n=10)   ■ P10 (SURF1) (n=4)   ■ P11 (SURF1) (n=2)   ■ P12 (SURF1) (n=2)  
 ■ P13 (SCO2) (n=2)   ■ P14 (SCO2) (n=2)   ■ P15 (SCO2) (n=2)



**Graf 12: Rychlosti oxidace [U-<sup>14</sup>C] malátu a [1,4-<sup>14</sup>C] sukcinátu v inkubacích 6–9 u pacientů s deficitem komplexu IV (P10–P15) a u kontrol K1–K10 (dětské K). P10–P12 (mutace v *SURF1* genu), P13–P15 (mutace ve *SCO2* genu).** Vysvětlení zkratk: K kontrola, n počet měření. Složení inkubací analýzy KMEM:

6 [U-<sup>14</sup>C] malát + pyruvát + malonát + ADP, 7 [U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + malonát + ADP,  
 8 [U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + arsenit + ADP, 9 [1,4-<sup>14</sup>C] sukcinát + acetylkarnitin + ADP.

■ dětské K (n=10)   ■ P10 (SURF1) (n=4)   ■ P11 (SURF1) (n=2)   ■ P12 (SURF1) (n=2)  
 ■ P13 (SCO2) (n=2)   ■ P14 (SCO2) (n=2)   ■ P15 (SCO2) (n=2)

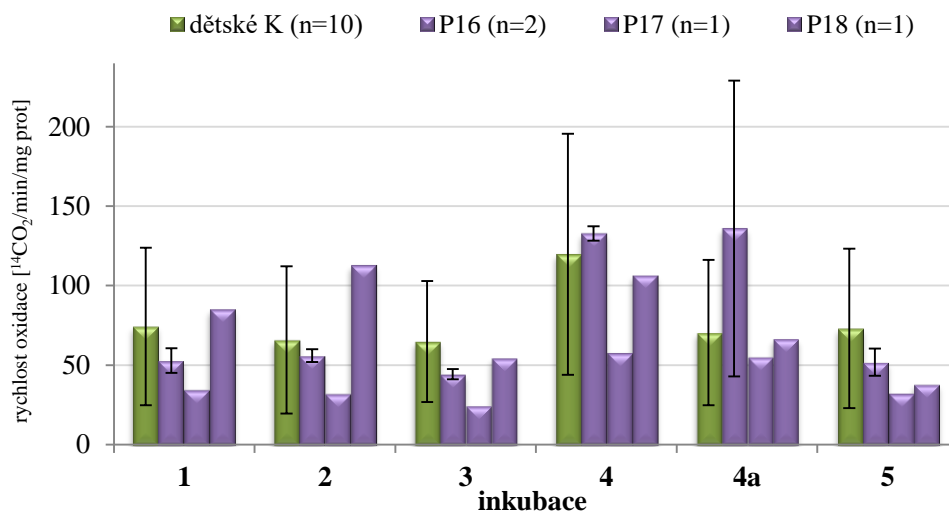


**Graf 13: Poměry jednotlivých inkubací u pacientů s deficitem komplexu IV (P10–P15) a u kontrol K1–K10 (dětské K). P10–P12 (mutace v *SURF1* genu), P13–P15 (mutace ve *SCO2* genu).** Vysvětlení zkratk: K kontrola, n počet měření. Složení inkubací analýzy KMEM:

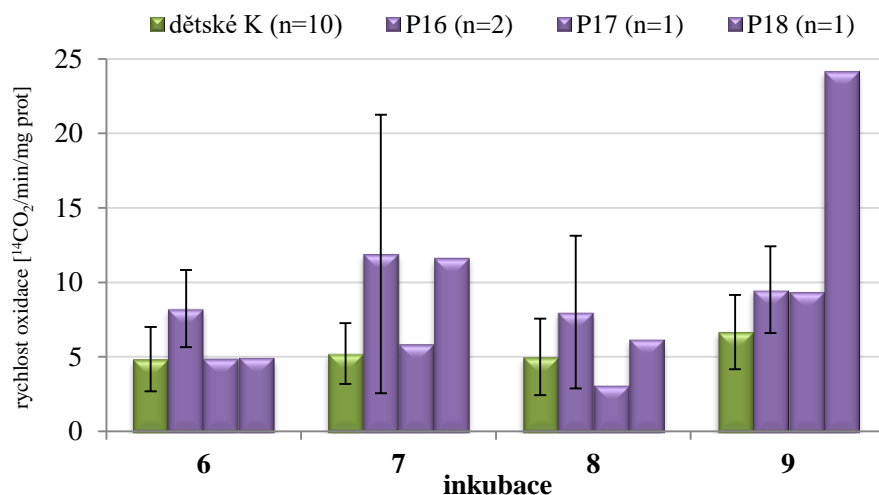
1 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP, 2 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + karnitin + ADP,  
 3 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát - ADP, 4 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát - ADP + CCCP,  
 5 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP + atraktylosid, 6 [U-<sup>14</sup>C] malát + pyruvát + malonát + ADP,  
 7 [U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + malonát + ADP, 8 [U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + arsenit + ADP.

### 5.2.1.3. KMEM u pacientů s poruchou OXPHOS na úrovni $F_1F_0$ ATP syntázy

Soubor pacientů s deficitem  $F_1F_0$  ATP syntázy tvoří 3 pacienti (P16–P18) s mutací v genu *TMEM70*. Naměřené hodnoty analýzy KMEM viz příloha 9 a 10. V případě inkubací obsahujících  $[1-^{14}C]$  pyruvát pozorujeme sníženou oxidaci pouze u P17. U ostatních pacientů je oxidace v normě (graf 14).



**Graf 14: Rychlosti oxidace  $[1-^{14}C]$  pyruvátu v inkubacích 1–5 u pacientů s deficitem ATP syntázy (P16–P18, mutace v genu *TMEM70*) a u kontrol K1–K10 (dětské K).** Vysvětlení zkratk: K kontrola, n počet měření. Složení inkubací analýzy KMEM: 1  $[1-^{14}C]$  pyruvát + malát + ADP, 2  $[1-^{14}C]$  pyruvát + karnitin + ADP, 3  $[1-^{14}C]$  pyruvát + malát – ADP, 4  $[1-^{14}C]$  pyruvát + malát – ADP + CCCP, 4a  $[1-^{14}C]$  pyruvát – karnitin + ADP, 5  $[1-^{14}C]$  pyruvát + malát + ADP + atraktylosid.

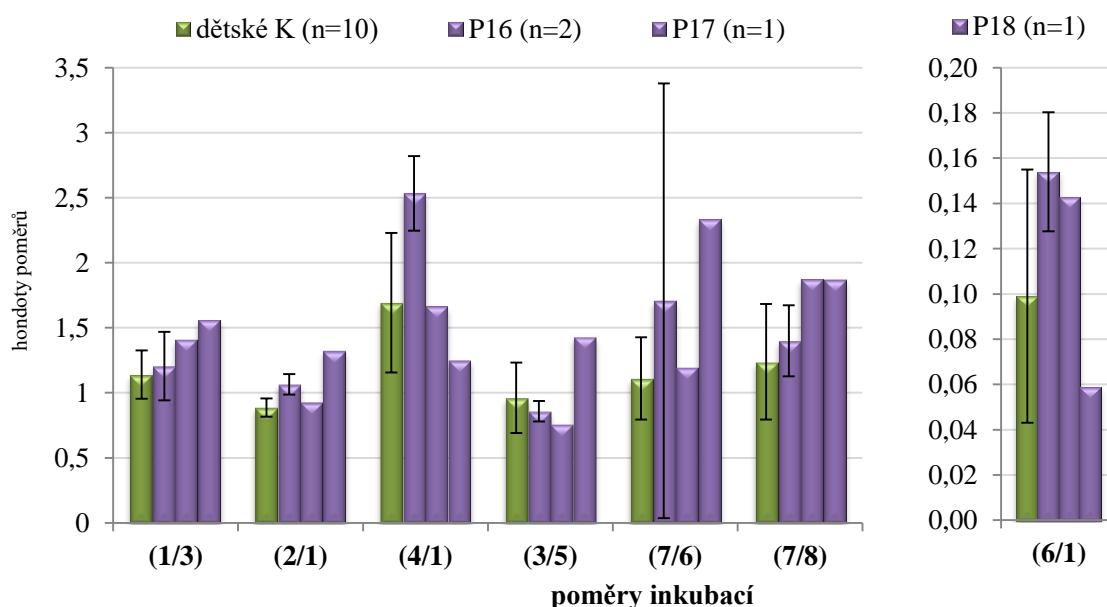


**Graf 15: Rychlosti oxidace  $[U-^{14}C]$  malátu a  $[1,4-^{14}C]$  sukcinátu v inkubacích 6–9 u pacientů s deficitem ATP syntázy (P16–P18, mutace v genu *TMEM70*) a u kontrol K1–K10 (dětské K).** Vysvětlení zkratk: K kontrola, n počet měření. Složení inkubací analýzy KMEM: 6  $[U-^{14}C]$  malát + pyruvát + malonát + ADP, 7  $[U-^{14}C]$  malát + acetylkarnitin + malonát + ADP, 8  $[U-^{14}C]$  malát + acetylkarnitin + arsenit + ADP, 9  $[1,4-^{14}C]$  sukcinát + acetylkarnitin + ADP.



V případě inkubací obsahujících [U-<sup>14</sup>C] malát pozorujeme tendenci ke zvýšení oxidace těchto inkubací u pacienta P16, oxidace inkubace 7 je zvýšena i u P18. U inkubace 9, která obsahuje [1,4-<sup>14</sup>C] sukcinát, pozorujeme výrazně zvýšenou oxidaci u P18 (graf 15).

Z poměrů inkubací pak byla zjištěna tendence ke zvýšení poměru 1/3 u P17 a P18. Poměr 2/1, naznačující deficit OXPHOS je mírně zvýšený u P16 a P18. Zvýšený poměr 4/1 naznačující deficit ATP syntázy či ANT detekujeme pouze u 1 pacienta (P16) ze 3. Pacient P17 má tendenci ke snížení poměru 3/5 naznačující též deficit na úrovni KV či ANT. Dále detekujeme tendenci ke zvýšení poměru 7/6 udávající sníženou aktivitu PDHc. U P18 bylo zjištěno výrazné snížení poměru 6/1 naznačující deficit MEM (graf 16).



**Graf 16: Poměry jednotlivých inkubací u pacientů s deficitem ATP syntázy (P16–P18, mutace v genu *TMEM70*) a u kontrol K1–K10 (dětské K).** Vysvětlení zkratk: K kontrola, n počet měření.

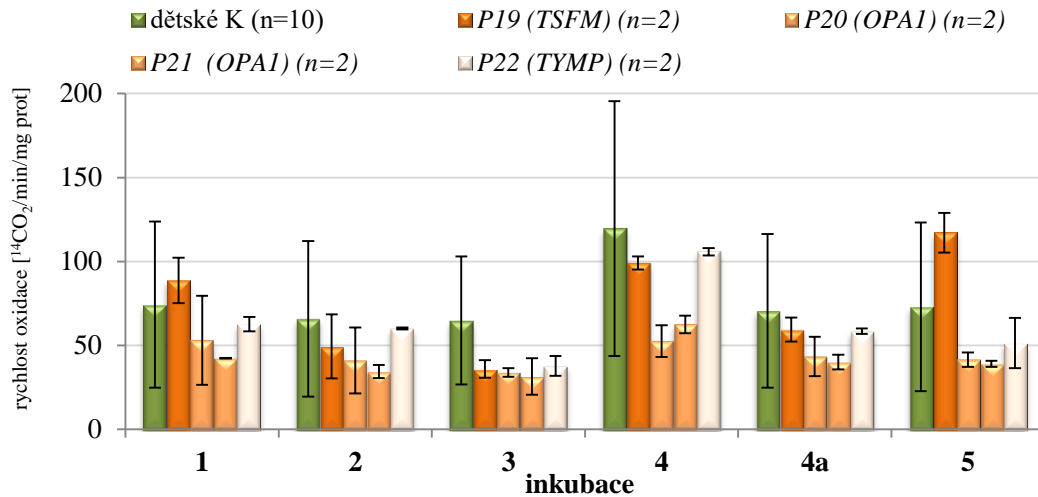
Složení inkubací analýzy KMEM:

- 1 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP, 2 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + karnitin + ADP,
- 3 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát - ADP, 4 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát - ADP + CCCP,
- 5 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP + atraktylosid, 6 [U-<sup>14</sup>C] malát + pyruvát + malonát + ADP,
- 7 [U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + malonát + ADP, 8 [U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + arsenit + ADP.

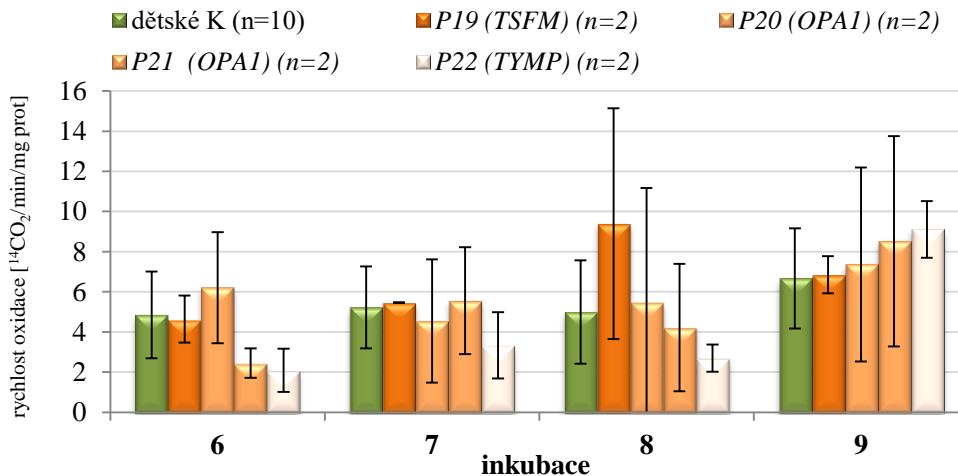
#### 5.2.1.4. KMEM u pacientů s kombinovanou poruchou OXPHOS

Skupinu pacientů s kombinovaným deficitem OXPHOS tvoří 5 pacientů (P19–23). Pacient s mutací *TSMF* genu (P19), dva pacienti s mutací v *OPA1* genu (bratři, P20 a P21), pacient s mutací *TYMP* genu (P22) a pacientka s mutací *FH* genu (P23), deficit KC, výsledky vyneseny zvlášť na samostatných grafech. Jednotlivé naměřené hodnoty analýzy KMEM viz příloha 11 a 12.

U pacientů s mutací v *OPA1* genu (P20 a P21) byla zjištěna snížená oxidace všech inkubací obsahujících [1-<sup>14</sup>C] pyruvát. U pacienta P19 (*TSFM*) byla zjištěna tendence ke snížení oxidace u 4 ze 6 inkubací (inkubace 2–4a). U P22 (*TYMP*) také detekujeme tendenci ke snížení oxidace inkubací obsahujících [1-<sup>14</sup>C] pyruvát (graf 17).



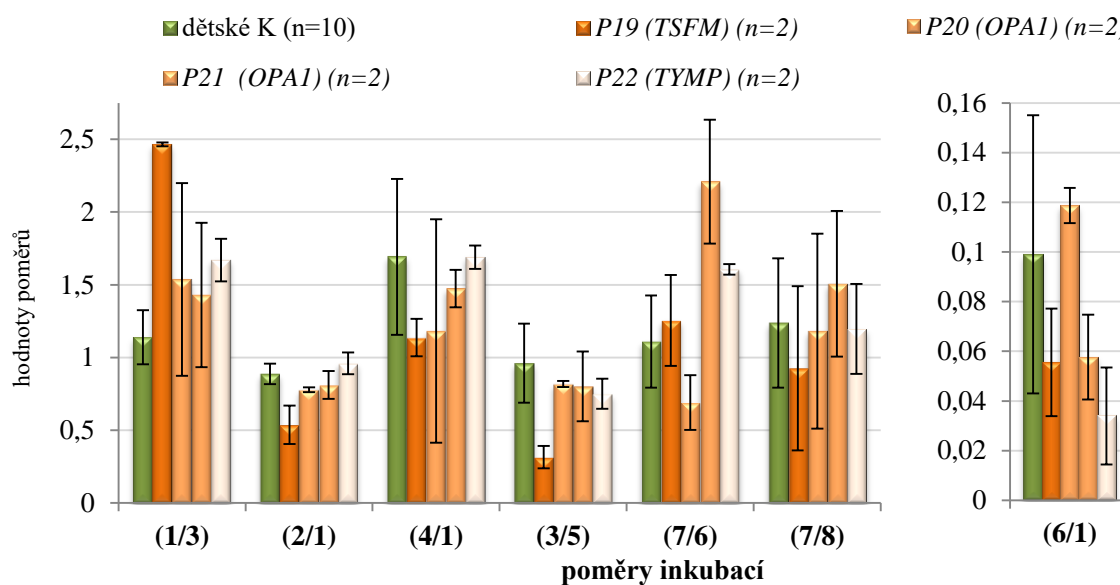
**Graf 17: Rychlosti oxidace [1-<sup>14</sup>C] pyruvátu v inkubacích 1–5 u pacientů s kombinovaým deficitem systému oxidativní fosforylace (P19–P22) a kontrol K1–K10 (dětské K). P19 (mutace v *TSFM* genu), P20 a P21 (mutace v *OPA1* genu), P22 (mutace v *TYMP* genu).** Vysvětlení zkratk: K kontrola, n počet měření. Složení inkubací analýzy KMEM: 1 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP, 2 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + karnitin + ADP, 3 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát – ADP, 4 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát – ADP + CCCP, 4a [1-<sup>14</sup>C] pyruvát – karnitin + ADP, 5 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP + atraktylosid.



**Graf 18: Rychlosti oxidace [U-<sup>14</sup>C] malátu a [1,4-<sup>14</sup>C] sukcinátu v inkubacích 6–9 u pacientů s kombinovaým deficitem systému oxidativní fosforylace (P19–P22) a kontrol K1–K10 (dětské K). P19 (mutace v *TSFM* genu), P20 a P21 (mutace v *OPA1* genu), P22 (mutace v *TYMP* genu).** Vysvětlení zkratk: K kontrola, n počet měření. Složení inkubací analýzy KMEM: 6 [U-<sup>14</sup>C] malát + pyruvát + malonát + ADP, 7 [U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + malonát + ADP, 8 [U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + arsenit + ADP, 9 [1,4-<sup>14</sup>C] sukcinát + acetylkarnitin + ADP.

V případě inkubací obsahujících [U-<sup>14</sup>C] malát byla zjištěna snížená oxidace ve všech třech reakcích (6–8) u P22 (*TYMP*). Snížená oxidace inkubace 6 ([U-<sup>14</sup>C] malát + pyruvát + malonát + ADP) byla zjištěna také u jednoho pacienta s mutací v *OPA1* genu (P21). U inkubace 8 ([U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + arsenit + ADP) detekujeme zvýšení oxidace u P19 (*TSFM*). Oproti tomu u pacienta P22 (*TYMP*) byla zjištěna snížená oxidace inkubace 8. V případě inkubace 9 obsahující [1,4-<sup>14</sup>C]sukcinát byla zjištěna tendence ke zvýšení oxidace u skupiny P19–P22 (graf 18).

U pacientů s kombinovaným deficitem OXPHOS (P19–P22) byl zjištěn zvýšený poměr 1/3 naznačující určité narušení na úrovni oxidativní fosforylace. Dále pak byla detekována tendence ke snížení 3/5, kdy u pacienta P19 (*TSFM*) pozorujeme výrazně snížený poměr 3/5. U 2 pacientů (P21 a P22) ze 4 detekujeme zvýšený poměr 7/6 naznačující snížení aktivity PDHc. Též u 3 pacientů (P19, P21 a P22) ze 4 byl zjištěn snížený poměr 6/1 naznačující deficit MEM (graf 19).



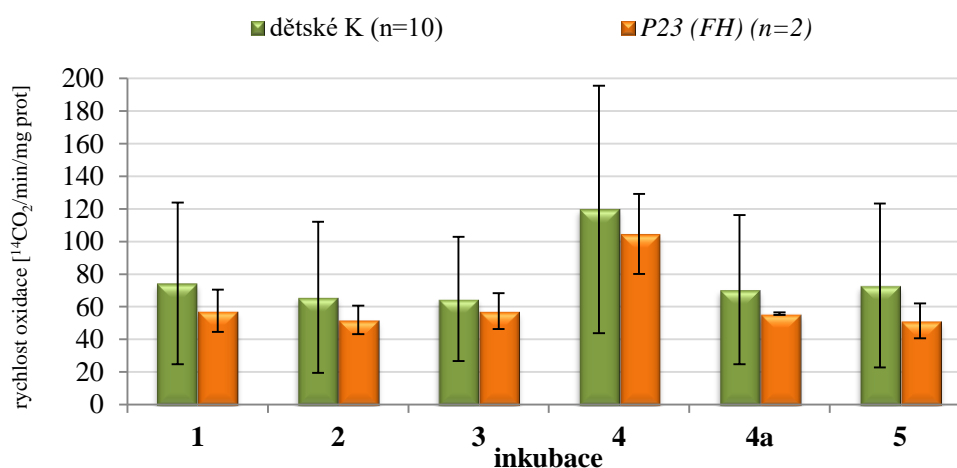
**Graf 19: Poměry jednotlivých inkubací u pacientů s kombinovaným deficitem systému oxidativní fosforylace (P19–P22) a kontrol K1–K10 (dětské K). P19 (mutace v *TSFM* genu), P20 a P21 (mutace v *OPA1* genu), P22 (mutace v *TYMP* genu).** Vysvětlení zkratk: K kontrola, n počet měření. Složení inkubací analýzy KMEM:

- 1 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP, 2 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + karnitin + ADP,
- 3 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát – ADP, 4 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát – ADP + CCCP,
- 5 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP + atraktylosid, 6 [U-<sup>14</sup>C] malát + pyruvát + malonát + ADP,
- 7 [U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + malonát + ADP, 8 [U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + arsenit + ADP.

### KMEM u pacientky s poruchou Krebsova cyklu (FH)

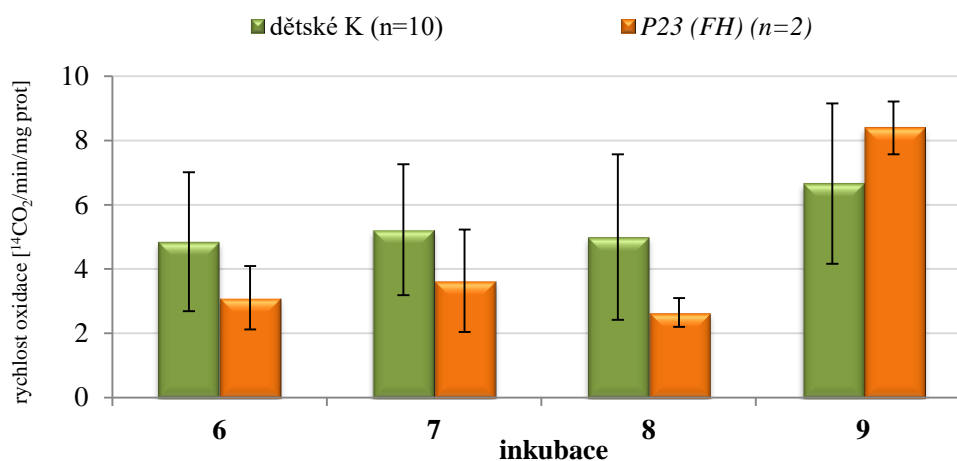
U pacientky P23 s deficitem fumaráthydratázy nebyly zjištěny významné rozdíly v oxidaci inkubací 1–5 obsahující [1-<sup>14</sup>C] pyruvát, zjistili jsme však určitou tendenci ke snížení všech šesti inkubací (graf 20). Též byla detekována tendence ke snížení oxidace inkubací 6–8 obsahujících [U-<sup>14</sup>C] malát (graf 21).

Z poměrů inkubací pozorujeme tendenci ke snížení 1/3 určující spřažení oxidativní fosforylace a dále pak snížený poměr 6/1 naznačující deficit MEM (graf 22).



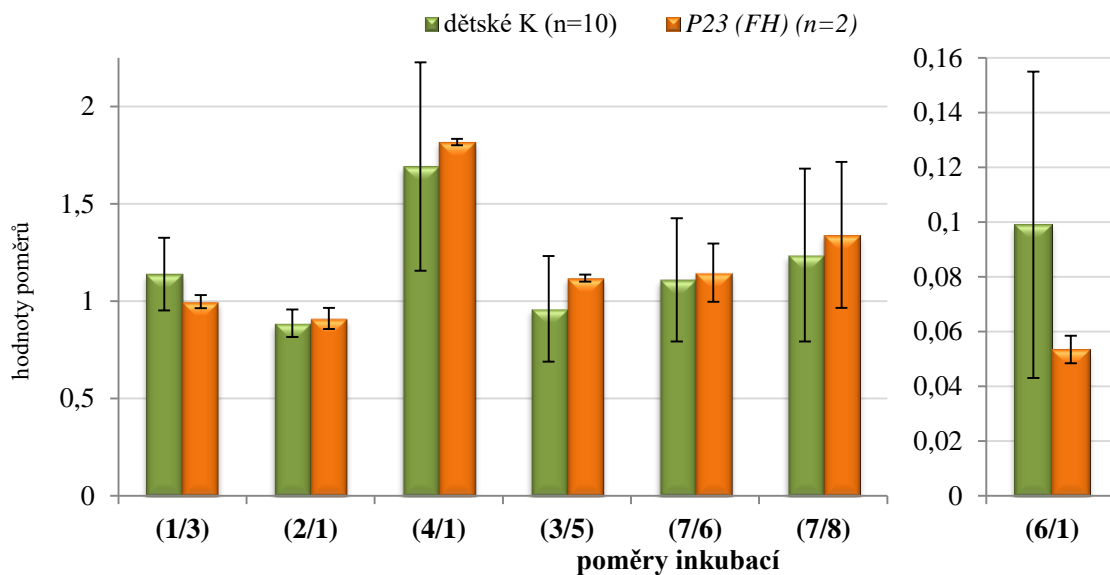
**Graf 20: Rychlosti oxidace [1-<sup>14</sup>C] pyruvátu v inkubacích 1–5 u pacientky (P23) s poruchou fumaráthydratázy (FH) a kontrol K1–K10 (dětské K).** Vysvětlení zkratk: K kontrola, n počet měření, složení inkubací analýzy KMEM:

1 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP, 2 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + karnitin + ADP, 3 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát – ADP, 4 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát – ADP + CCCP, 4a [1-<sup>14</sup>C] pyruvát – karnitin + ADP, 5 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP + atraktylosid.



**Graf 21: Rychlosti oxidace [U-<sup>14</sup>C] malátu a [1,4-<sup>14</sup>C] sukcinátu v inkubacích 6–9 u pacientky (P23) s poruchou fumaráthydratázy (FH) a u kontrol K1–K10 (dětské K).** Vysvětlení zkratk: K kontrola, n počet měření. Složení inkubací analýzy KMEM:

6 [U-<sup>14</sup>C] malát + pyruvát + malonát + ADP, 7 [U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + malonát + ADP, 8 [U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + arsenit + ADP, 9 [1,4-<sup>14</sup>C] sukcinát + acetylkarnitin + ADP.

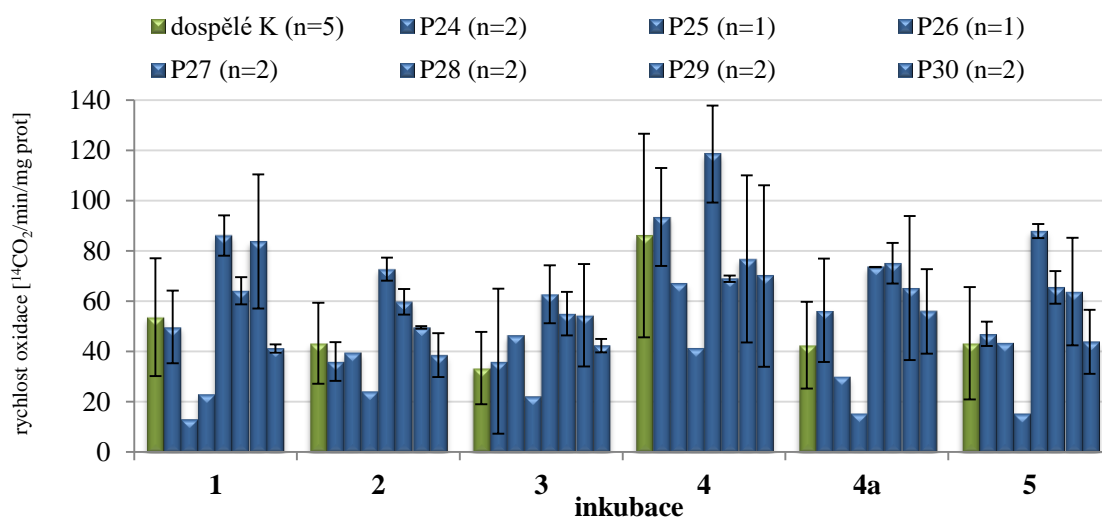


**Graf 22: Poměry jednotlivých inkubací u pacientky (P23) s poruchou fumaráthydratázy (FH) a kontrol K1–K10 (dětské K).** Vysvětlení zkratk: K kontrola, n počet měření. Složení inkubací analýzy KMEM:

- 1 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP, 2 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + karnitin + ADP,
- 3 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát - ADP, 4 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát - ADP + CCCP,
- 5 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP + atraktylosid, 6 [U-<sup>14</sup>C] malát + pyruvát + malonát + ADP,
- 7 [U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + malonát + ADP, 8 [U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + arsenit + ADP.

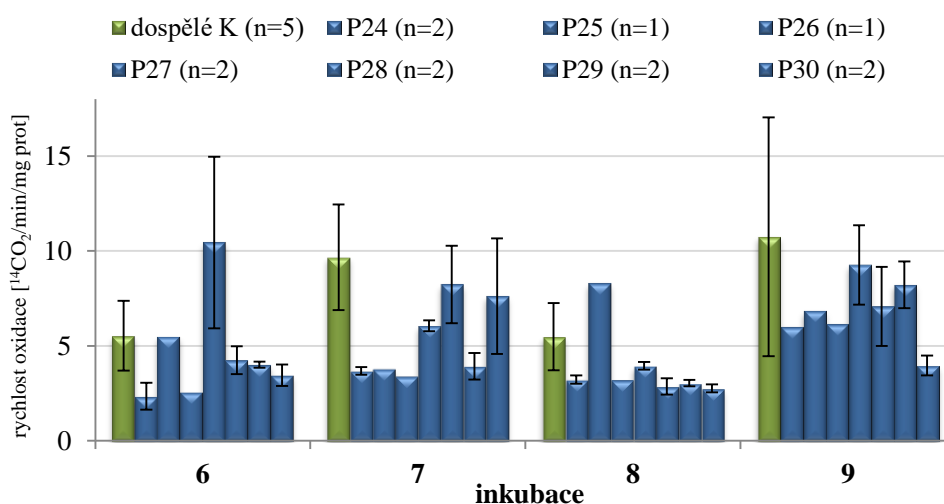
## 5.2.2. Analýza KMEM u pacientů se sekundární mitochondriální poruchou (HD)

Soubor pacientů s HD je tvořen 7 pacienty (P24–P30) (tabulka 9), jednotlivé hodnoty analýzy KMEM viz příloha 13 a 14. V případě inkubací obsahujících [1-<sup>14</sup>C] pyruvát byla zjištěna tendence ke snížení oxidace všech šesti reakcí u 2 pacientů (P25 a P26) ze 7. U P30 byla detekována mírně snížená oxidace u 3 inkubací ze 6 (inkubace 1, 2 a 4) a v případě P28 a P29 též mírné snížení inkubace 4 (graf 23).



**Graf 23: Rychlosti oxidace [1-<sup>14</sup>C] pyruvátu v inkubacích 1–5 u pacientů s Huntingtonovou chorobou (P24–P30) a kontrol K11–K15 (dospělé K).** Vysvětlení zkratk: K kontrola, n počet měření. Složení inkubací analýzy KMEM:

1 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP, 2 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + karnitin + ADP,  
 3 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát – ADP, 4 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát – ADP + CCCP,  
 4a [1-<sup>14</sup>C] pyruvát – karnitin + ADP, 5 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP + atraktylosid.

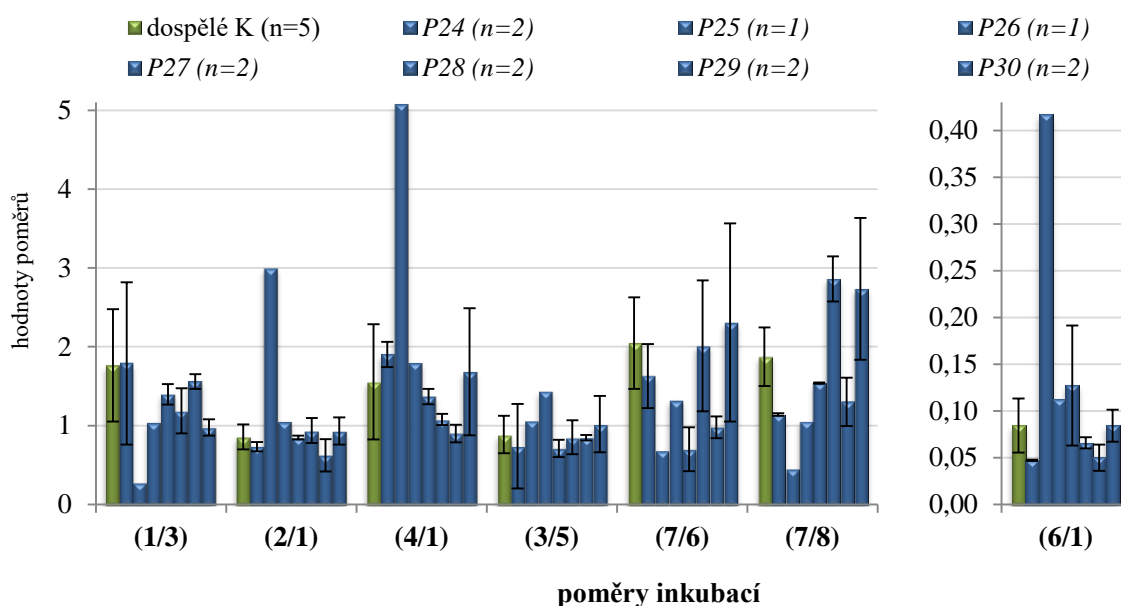


**Graf 24: Rychlosti oxidace [U-<sup>14</sup>C] malátu a [1,4-<sup>14</sup>C] sukcinátu v inkubacích 6–9 u pacientů s Huntingtonovou chorobou (P24–P30) a kontrol K11–K15 (dospělé K).** Vysvětlení zkratk: K kontrola, n počet měření. Složení inkubací analýzy KMEM:

6 [U-<sup>14</sup>C] malát + pyruvát + malonát + ADP, 7 [U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + malonát + ADP,  
 8 [U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + arsenit + ADP, 9 [1,4-<sup>14</sup>C] sukcinát + acetylkarnitin + ADP.

V případě inkubací obsahujících [U-<sup>14</sup>C] malát byla zjištěna snížená oxidace inkubace 6 u 5 pacientů (P24, P26, P28–P30) ze 7. U inkubace 7 detekujeme snížení u všech 7 pacientů, přičemž u 5 pacientů (P24–P27 a P29) je oxidace této inkubace snížena výrazně. Oxidace inkubace 8 je významně snížena u 6 (P24 a P26–P30) ze 7 pacientů. V případě inkubace obsahující [1,4-<sup>14</sup>C] sukcinát byla zjištěna snížená oxidace u všech 7 pacientů, přičemž u 4 pacientů (P24–P26 a P30) byla oxidace snížena o více než 35 % kontrolní hodnoty (KH), graf 24.

Z poměrů inkubací byl zjištěn snížený poměr 1/3 u 6 pacientů (P25–P30) ze 7, přičemž u 3 pacientů (P25, P26 a P30) se jedná o významné snížení (o 41–84 % KH). U pacienta P25 byl zjištěn výrazně zvýšený (na 350 % KH) poměr 2/1, ukazující porochu OXPHOS. Též pozorujeme tendenci ke snížení poměru 3/5 u 2 pacientů (P24 a P27) ze 7, tendenci ke snížení poměru 7/6 u 5 (P24–P27 a P29) ze 7 pacientů a snížení poměru 7/8 u 5 pacientů ze 7 (P24–P27 a P29). Poměr 6/1 je snížený u 3 pacientů (P24, P28 a P29) ze 7.



**Graf 25: Poměry jednotlivých inkubací u pacientů s Huntingtonovou chorobou (P24–P30) a kontrol K11–K15.** Vysvětlení zkratk: K kontrola, n počet měření. Složení inkubací analýzy KMEM:

- 1 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP, 2 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + karnitin + ADP,
- 3 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát – ADP, 4 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát – ADP + CCCP,
- 5 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP + atraktylosid, 6 [U-<sup>14</sup>C] malát + pyruvát + malonát + ADP,
- 7 [U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + malonát + ADP, 8 [U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + arsenit + ADP.

## 6. Diskuze

Mitochondriální onemocnění zasahují zejména orgány a tkáně, které mají vysokou energetickou poptávku (mozek, srdce či svalová tkáň). Oproti tomu v periferních tkáních se onemocnění nemusí vždy manifestovat. I přesto jsou však kultivované kožní fibroblasty vhodným materiálem pro studium mitopatií a to nejen vzhledem k jejich snadné dostupnosti a kultivovatelnosti. Odběr fibroblastů je oproti svalové bipsii pro pacienta méně invazivní zákrok. Proto bylo snahou této diplomové práce optimalizovat metodu KMEM, která se běžně používá při diagnostice mitopatií z nativního svalu, na kultivované kožní fibroblasty.

Kapacita MEM byla stanovena celkem u 15 kontrolních vzorků, u 23 pacientů s primární mitochondriální poruchou a u 7 pacientů se sekundární mitochondriální poruchou (HD). Výsledky analýzy KMEM ve fibroblastech byly následně korelovány s dalšími biochemickými analýzami ve fibroblastech (spektrofotometrické stanovení aktivit jednotlivých enzymů OXPHOS a s výsledky polarografie, jsou-li k dispozici) a dále pak u vybraných pacientů s analýzou KMEM ze svalové tkáně.

Všechny linie byly pěstovány za stejných podmínek v DMEM mediu s 10% iFBS při 37 °C a 5% CO<sub>2</sub>. Buňky nepřesáhly 15. pasáž a byly sklizeny při ~ 80% konfluenci.

Poté co bylo optimalizováno množství proteinu v reakci, jsme se zaměřili na to, zda je KMEM závislá na věku pacienta. Detekovali jsme rozdíly v oxidaci substrátů pyruvátu, malátu a sukcinátu mezi dvěmi věkovými skupinami. První skupinu tvořili kontrolní linie fibroblastů ve věku několika dnů života až 4 let (dětské K). Druhou skupinu pak tvořily kontrolní linie ve věku 26–49 let (dospělé K). Oxidace pyruvátu byla v případě skupiny dospělých K nižší než u skupiny dětských K, oxidace malátu a sukcinátu byla naopak vyšší v případě skupiny dospělých kontrol. Naše zjištění korespondují s výsledky mnoha výzkumů, ukazujících na změny aktivity MEM v závislosti na věku. Během stárnutí organismu dochází ke snížení aktivity OXPHOS, k redukci syntézy mitochondriálních proteinů, k snížené respiraci a spřažení OXPHOS. Skupina Grecoové (Greco et al., 2003) zaznamenala výraznou změnu v MEM v kultivovaných kožních fibroblastech od jedinců starších 40. let a spojuje snížený MEM u starších osob se zvyšující se produkcí ROS. Reaktivní formy kyslíku by podle nich měly přímo či pomocí změn na mtDNA či jaderné DNA způsobovat pozměněnou nebo nedostatečnou syntézu produktů těchto dvou genomů. Rozdílný mitochondriální



metabolismus však můžeme pozorovat i mezi dětmi, dospívajícími a dospělými. V dětství a během puberty dochází k rychlému vývoji a ten s sebou samozřejmě nese i vysokou energetickou poptávku. Není tudíž překvapivé, že je MEM u těchto věkových skupin odlišný oproti MEM dospělých, kdy už nedochází k vývoji a růstu. Proto je třeba vždy srovnávat výsledky biochemických analýz pacientů s kontrolní skupinou odpovídajícího věku.

## 6.1. KMEM u pacientů s primárním deficitem OXPHOS

Výsledky analýzy KMEM, které jsou součástí této diplomové práce, byly v této kapitole srovnány s výsledky spektrofotometrického měření aktivit jednotlivých komplexů OXPHOS. Enzymatické měření bylo provedeno pracovníky Laboratoře pro studium mitochondriálních poruch v rámci rutinní diagnostiky pacientů s podezřením na mitochondriální onemocnění. U každého pacienta byly měřeny následující enzymatické aktivity: *NADH:koenzym Q reductáza* (KI), *NADH:cytochrom c reductáza* (KI+III), *sukcinát:koenzym Q reductáza* (KII), *sukcinát:cytochrom c reductáza* (KII+III), *QH<sub>2</sub>:cytochrom c reductáza* (KIII), *cytochrom c oxidáza* (KIV) a aktivita *citrátsyntázy*.

### 6.1.1. Pacienti s poruchou komplexu I

Soubor pacientů s deficitem KI tvořilo celkem 9 pacientů (P1–P9), výsledky spektrofotometrie a analýzy KMEM v kožních fibroblastech shrnuje tabulka 12. U 4 pacientů (P3–P6) z 9 byla zjištěna snížená oxidace všech inkubací obsahujících pyruvát (na 22–65 % KH). U dvou pacientů (P1 a P7) byla zjištěna snížená oxidace 4 ze 6 inkubací obsahujících pyruvát (na 48–74 % KH). Pacienti P2, P8 a P9 měli oxidace inkubací obsahujících pyruvát v normě či hraniční. Tento jev by mohl být dán tím, že u pacientky P9 byla zjištěna velmi nízká hladina heteroplasmie (pouze 4%) ve fibroblastech, u pacienta P8 však hladinu heteroplasmie ve fibroblastech neznáme. U 3 pacientů (P3, P7 a P9) z 9 byl zjištěn zvýšený poměr 2/1 (na 123–150 % KH) indikující sníženou aktivitu dýchacího řetězce. Poměr 3/5 byl u pacientů P1, P2 a P8 snížený (62–83 % KH), u pacientů P4 a P9 zvýšený (125 a 151 % KH). Podobný jev pozoroval i Antoon Janssen v kosterním svalu. Jeho soubor pacientů s deficitem KI tvořilo 12 jedinců a u 3 z nich pozoroval snížený poměr 3/5 a u 1 pacienta naopak zvýšený poměr 3/5 (A. J. M. Janssen et al., 2006). Podobně jako v publikaci Antoon J. M. Janssen et al., 2006, i my pozorujeme u 4 pacientů (P2, P4, P7 a P9) z 9 zvýšený poměr 4/1 (na 122–166 % KH) což naznačuje, že rozpřahovač CCCP inhibuje proton-motivní aktivitu KI (Antoon J. M. Janssen et al., 2006). U 3 pacientů (P3, P4 a P6) byl zjištěn zvýšený poměr 7/6 (na 129–228 % KH) indikující sníženou aktivitu PDHc. Janssen a kolektiv tento jev pozoroval ve svalu u 9 z 12 pacientů s deficitem KI. U 5 pacientů (P1, P2, P5, P7 a P9) z 9 pozorujeme snížený poměr 7/8 (na 57–69 % KH) určující sníženou aktivitu  $\alpha$ -KGD, v publikaci Antoon J. M. Janssen et al., 2006 mělo sníženou aktivitu  $\alpha$ -KGD 6 z 10 pacientů. Snížená aktivita enzymů PDHc a  $\alpha$ -KGD je pravděpodobně způsobena sekundárně, deficit KI pravděpodobně vede ke zvýšenému

poměru NADH/NAD<sup>+</sup> a tím dochází k inhibici PDHc a  $\alpha$ -KGD (A. J. M. Janssen et al., 2006).

**Tabulka 12: Porovnání výsledků analýzy KMEM a spektrofotometrického měření aktivit jednotlivých enzymů OXPHOS v kultivovaných kožních fibroblastech od pacientů s deficitem KI, hladiny heteroplasmie ve fibroblastech a ve svalové tkáni.**

pacient	věk	diagnóza (mutace v genu)	SPR ve F	KMEM ve F	hetero- plasmie ve S [%]	hetero- plasmie ve F [%]
P1	6 m.	<i>MTND1</i> (m.3697G>A)	↓↓ KI+III	↓↓ pyruvát, ↑↑ ink. 8 (malát), ↓3/5, ↓↓7/8	93	81
P2	10 m.	<i>MTND1</i> (m.3697G>A)	v normě	↓ ink. 1 a 2 (pyruvát) a sukcinát, ↓↓ ink. 3 (pyruvát) a malát, ↑2/1, ↑4/1, ↓↓ 3/5, ↓↓ 6/1, ↓↓7/8	NA	79
P3	7 m.	<i>MTND3</i> (m.10158T>C)	v normě	↓↓↓ pyruvát, ↓↓ malát a sukcinát, ↑ 2/1, ↑↑7/6	95	85
P4	10 r.	<i>MTND5</i> (m.13513G>A)	v normě	↓↓↓ pyruvát, ↑↑↑↑ ink. 7 (malát), ↑ sukcinát, ↑4/1, ↑↑3/5, ↑↑↑↑7/6	48	40
P5	3 r.	<i>MTND5</i> (m.13513G>A)	↓KI, ↓↓KIV, ↓↓CS, ↓↓KV/CS	↓↓ pyruvát, ↑↑ sukcinát, ↓7/8	67	65
P6	12 r.	<i>MTND5</i> (m.13046T>C)	↓↓KIV, ↓↓CS	↓↓ pyruvát, ↑ sukcinát, ↓3/5, ↑7/6	70	43
P7	2 r.	<i>MTND5</i> (m.13042G>A)	v normě	↓↓ pyruvát, ↓↓ ink. 7 a 8 (malát), ↑↑2/1, ↑↑4/1, ↓3/5, ↓↓7/8	96	65
P8	35 r.	<i>MTND5</i> (m.12706T>C)	↓↓KI, ↓↓KIV, ↓↓CS	↓↓ sukcinát, ↓3/5	83	NA
P9	17 r.	<i>MTND5</i> (m.13513G>A)	↓↓KI	↑↑ ink. 6 (malát) a sukcinát, ↓ ink. 7 (malát), ↓↓1/3, ↑2/1, ↑4/1, ↑↑3/5, ↓↓7/8	97	4

↓↓↓ pokles na 0–35 %, ↓↓ pokles na 36–70 %, ↓ pokles na 71–100 %, ↑ nárůst na 101–135 %, ↑↑ nárůst na 136–170 %, ↑↑↑nárůst na 171–200 %, ↑↑↑↑ nárůst na 201–300 %, ↑↑↑↑↑ nárůst na 301–400 % kontrolních hodnot. Vysvětlení zkratk: CS citrátsyntáza, F fibroblasty, ink inkubace, KI NADH:ubichinonoxidoreduktáza, KI+III NADH:cytochrom *c* reduktáza, KIV cytochrom *c* oxidáza, m měsíc, NA nebylo analyzováno, r rok, S sval, SPR spektrofotometrie. Složení inkubační analýzy KMEM:

1 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP, 2 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + karnitin + ADP, 3 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát – ADP,

4 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát – ADP + CCCP, 5 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP + atraktylosid,

6 [U-<sup>14</sup>C] malát + pyruvát + malonát + ADP, 7 [U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + malonát + ADP,

8 [U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + arsenit + ADP

V analyzovaném vzorku pacientů s deficitem KI (P1–P9) ne vždy spektrofotometrická měření aktivit komplexů OXPHOS poukazovala na poruchu právě prvního komplexu. U 4 pacientů (P2, P3, P4 a P7) byly aktivity všech měřených

enzymů v normě. V případě P1 byla snížena pouze aktivita *NADH:cytochrom c reductázy* (KI+III) a v případě P6 byla snižená pouze aktivita KIV a CS.

### 6.1.2. Pacienti s poruchou komplexu IV

Soubor pacientů s deficitem komplexu KIV tvořilo šest pacientů, tři (P10–P12) nesou mutaci v genu *SURF1* a tři (P13–P15) nesou mutaci v genu *SCO2*. V případě obou genů se jedná o asemblační faktory cytochrom *c* oxidázy. Výsledky spektrofotometrické analýzy a analýzy KMEM shrnuje tabulka 13.

**Tabulka 13: Porovnání výsledků analýzy KMEM a spektrofotometrického měření aktivit jednotlivých enzymů OXPHOS v kultivovaných kožních fibroblastech od pacientů s deficitem KIV.**

pacient	věk	diagnóza (mutace v genu)	SPR ve F	KMEM ve F
P10	1 r.	<i>SURF1</i> (c.[312_321del10insAT]; [845_846delCT])	↓↓↓KIV, ↓↓↓KIV/CS	↓↓ pyruvát, ↑↑↑↑ malát, ↓ sukcinát, ↓↓1/3, ↑2/1
P11	1 r.	<i>SURF1</i> (c.[792_793delAG]; [845_846delCT])	↓↓↓KIV, ↓↓↓KIV/CS	↓↓ ink. 1, 3, 4 a 5 (pyruvát), ↑↑↑↑ ink. 6 (malát), ↑↑ ink. 7 (malát), ↑↑↑↑ ink. 8 (malát) a ink. 9 (sukcinát), ↑↑↑ 2/1, ↓3/5
P12	1 r.	<i>SURF1</i> (c.[469C>T]; [845_846delCT])	↓↓↓KIV, ↓CS, ↓↓↓KIV/CS	↓ ink. 1, 2, 4a a 5 (pyruvát), ↓↓ink. 3 (pyruvát), ↑ ink. 7 (malát) a ink. 9 (sukcinát), ↑2/1, ↑↑4/1, ↓3/5, ↓6/1, ↑↑7/6
P13	1 r.	<i>SCO2</i> (c.[418G>A];[418G>A])	v normě	↑ sukcinát, ↓1/3, ↓↓6/1, ↑↑↑7/6
P14	1 r.	<i>SCO2</i> (c.[418G>A];[418G>A])	↓↓KIV, ↓↓KIV/CS, ↓↓↓KI	↑↑ malát, ↑↑↑↑ sukcinát, ↓6/1, ↑↑↑7/6
P15	1 r.	<i>SCO2</i> (c.[667G>A] + Chr22:del49275958_494 51008)	↓↓KIV	↓↓ pyruvát, ↑↑7/6

↓↓↓ pokles na 0–35 %, ↓↓ pokles na 36–70 %, ↓ pokles na 71–100 %, ↑ nárůst na 101–135 %, ↑↑ nárůst na 136–170 %, ↑↑↑ nárůst na 171–200 %, ↑↑↑↑ nárůst na 201–300 %, ↑↑↑↑↑ nárůst na 301–400 % kontrolních hodnot. Vysvětlení zkratk: CS citrát syntáza, F fibroblasty, ink inkubace, KI NADH:ubichinonoxidoreduktáza, KIV cytochrom *c* oxidáza, r rok, SPR spektrofotometrie. Složení inkubací analýzy KMEM:

- 1 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP, 2 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + karnitin + ADP, 3 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát – ADP,
- 4 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát – ADP + CCCP, 4a [1-<sup>14</sup>C] pyruvát – karnitin + ADP,
- 5 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP + atraktylosid, 6 [U-<sup>14</sup>C] malát + pyruvát + malonát + ADP,
- 7 [U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + malonát + ADP, 8 [U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + arsenit + ADP,
- 9 [1,4-<sup>14</sup>C] sukcinát + acetylkarnitin + ADP

V případě skupiny pacientů s mutací v genu *SURF1* byla pozorována snížená oxidace některých inkubací obsahujících pyruvát (na 45–80 % KH), zatímco u pacientů s mutací v genu *SCO2* jsme sníženou oxidací pyruvátu pozorovali pouze u pacienta P15 (na 44–70 % KH). U dvou pacientů s mutací v *SURF1* genu (P11 a P12) byl zvýšený

poměr 2/1 (174 a 119 % KH) určující aktivitu dýchacího řetězce a u pacienta P12 byl navíc snížený poměr 3/5 (na 71 % KH) naznačující deficit OXPHOS. U 2 pacientů (P13 a P15) s mutací ve *SCO2* genu byl detekován, podobně jako v případě některých pacientů s deficitem KI, zvýšený poměr 7/6 (180 a 164 % KH) určující sekundárně sníženou aktivitu PDHc. Zajímavým zjištěním je fakt, že u 4 pacientů (P10–P12 a P14) ze 6 dochází k zvýšené oxidaci inkubací obsahujících malát (na 120–320 % KH) a u 5 pacientů (P10–14) jsme zjistili zvýšenou oxidaci inkubace obsahující sukcinát (na 132–253 % KH). Z výsledků analýzy KMEM se jeví, že mutace v *SURF1* genu se ve fibroblastech manifestuje více než mutace v genu *SCO2*, což koresponduje s výsledky analýzy buněčné respirace pomocí Seahorse (Invernizzi et al., 2012), kdy u pacientů s mutací v *SURF1* genu byla ve fibroblastech zbytková aktivita dýchacího řetězce 10–15%, zatímco u pacienta s mutací ve *SCO2* byla ve fibroblastech detekována normální aktivita dýchacího řetězce. Též se naše výsledky shodují s dříve publikovanými články, které označují mutaci v genu *SCO2* jako tkáňově specifické onemocnění, které se ve fibroblastech nemanifestuje s takovou mírou, jako v jiných tkáních (Jaksch et al., 2000; Stiburek et al., 2005; Vesela et al., 2004).

U pacientů s deficitem KIV (P10–P15) byly pozorovány změny jak na úrovni KMEM tak i na úrovni spektrofotometrického měření. U 5 pacientů (P10–P12 a P14–P15) ze 6 byla naměřena snížená aktivita KIV. U jednoho pacienta (P14) byla spolu se sníženou aktivitou KIV detekována i sekundárně snížená aktivita KI. Pouze u pacienta P13 byly aktivity komplexů OXHOS v rámci spektrofotometrické analýzy v normě.

### **6.1.3. Pacienti s poruchou $F_1F_0$ ATP syntázy**

Soubor pacientů s deficitem  $F_1F_0$  ATP syntázy byl tvořen 3 pacienty (P16–P18) s mutací v asemblačním faktoru ATP syntázy, v genu *TMEM70*. Spektrofotometrické měření aktivit enzymů KI, KI+III, KII, KII+III, KIII, KIV, CS v případě skupiny pacientů s mutací v genu *TMEM70* byla v normě. U všech pacientů jsme detekovali sníženou oxidaci některých z inkubací obsahujících pyruvát (na 38–85% KH). U pacientů P16 a P18 byla zjištěna zvýšená oxidace inkubací obsahujících malát (na 125–228 % KH) a u všech 3 pacientů byla zvýšená oxidace sukcinátu (na 141–363 % KH). U 2 pacientů (P16 a P18) ze 3 byl zjištěn zvýšený poměr 2/1 (120 a 149 % KH) udávající sníženou aktivitu dýchacího řetězce a zároveň byl u těchto pacientů zvýšený poměr 7/6 (154 a 210 % KH) určující sníženou aktivitu PDHc.

U pacienta P17 byl snížen poměr 3/5 (na 79 % KH) značící deficit ATP syntázy či ANT a pouze u pacienta P16 byl ve fibroblastech zvýšený poměr 4/1 (na 150 % KH) určující sníženou aktivitu ATP syntázy či ANT. Skupina Janssenova pozorovala ve svalu zvýšený poměr 4/1 u 2 ze 3 pacientů s deficitem ATP syntázy (mutace v genu *MT-ATP6* pro mtDNA kódovanou strukturní podjednotku a), stejně tak i zvýšený poměr 2/1 a též u jednoho pacienta detekovali zvýšený poměr 7/6 (A. J. M. Janssen et al., 2006).

**Tabulka 14: Porovnání výsledků analýzy KMEM a spektrofotometrického měření aktivit jednotlivých enzymů OXPHOS v kultivovaných kožních fibroblastech od pacientů s deficitem ATP syntázy.**

pacient	věk	diagnóza (mutace v genu)	SPR ve F	KMEM ve F	poznámka
P16	4 m.	<i>TMEM70</i> (c.[317-2A>G]; [317-2A>G])	v normě	↓↓ ink. 1, 3 a 5, ↓ ink. 2 (pyruvát), ↑↑↑ malát, ↑↑ sukcinát, ↑2/1, ↑↑4/1, ↓3/5, ↑↑7/6	† 1 r. a 4 m.
P17	6 m.	<i>TMEM70</i> (c.[317-2A>G]; [317-2A>G])	v normě	↓ pyruvát, ↑↑ sukcinát, ↓3/5	
P18	4 m.	<i>TMEM70</i> (c.[317-2A>G]; [317-2A>G])	v normě	↓ ink. (3, 4 a 4a), ↓↓ ink. 5 (pyruvát), ↑↑2/1, ↓↓ 6/1, ↑↑↑↑7/6	† 2 r.

↓↓↓ pokles na 0–35 %, ↓↓ pokles na 36–70 %, ↓ pokles na 71–100 %, ↑ nárůst na 101–135 %, ↑↑ nárůst na 136–170 %, ↑↑↑nárůst na 171–200 % kontrolních hodnot. Vysvětlení zkratk: F fibroblasty, ink inkubace, m měsíc, SPR spektrofotometrie, r rok, † úmrtí. Složení inkubační analýzy KMEM: 1 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP, 2 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + karnitin + ADP, 3 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát – ADP, 4 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát – ADP + CCCP, 4a [1-<sup>14</sup>C] pyruvát – karnitin + ADP, 5 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP + atraktylosid, 6 [U-<sup>14</sup>C] malát + pyruvát + malonát + ADP, 7 [U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + malonát + ADP, 8 [U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + arsenit + ADP, 9 [1,4-<sup>14</sup>C] sukcinát + acetylkarnitin + ADP

#### 6.1.4. Pacienti s kombinovanou poruchou OXPHOS

Zvláštní skupinu pacientů tvořili 4 pacienti s kombinovanou poruchou OXPHOS (P19–P22; 1 × *TSMF*, 2 × *OPA1* a 1 × *TYMP*) a jedna pacientka s poruchou Krebsova cyklu (P23, *FH*). U všech 5 pacientů jsme pozorovali sníženou oxidaci některých inkubačních obsahujících pyruvát (na 44–79 % KH), přičemž pacienti P20 a P21 (*OPA1* mutace) mají sníženou oxidaci všech inkubačních obsahujících pyruvát a to na 44–71 % KH. Pacient P19 (*TSMF*) má sníženou oxidaci inkubací 2 a 3 (na 75 a 55 % KH), pacient P22 (*TYMP*) má sníženou oxidaci inkubace 3 a 5 (58 a 70 % KH). U pacientů P22 (*TYMP*) a P23 (*FH*) byla snížená oxidace inkubačních obsahujících malát (na 43–70 %) a zároveň zvýšená oxidace sukcinátu (126 a 137 % KH). U pacienta P19 byla naopak zvýšená oxidace inkubace 8 (malát) na 188 % KH. U pacientů s mutací v *OPA1* genu byla inkubace 6 (malát) u jednoho lehce zvýšená (na 128 % KH)

a u druhého naopak snižená (na 50 %). U 4 (P19–P22) z 5 pacientů byl lehce či výrazně snižen poměr 3/5 (na 33–85%), u 4 pacientů (P19, P21–P23) byl snižený poměr 6/1 (34–58 %) značící poruchu OXPHOS. U dvou pacientů (P21 a P22) jsme pak pozorovali sníženou aktivitu PDHc (zvýšený poměr 7/6, na 199 a 145%) a u pacienta P19 naopak sníženou aktivitu  $\alpha$ -KGD (poměr 7/8 snižen na 75 % KH).

Pacienti P19–P22 měli velmi vážné klinické projevy (mezi které patří hypotonie, časná metabolická acidóza, apatie, hypertrofická kardiomyopatie, atd) a dožili se pouze několika málo týdnů až měsíců života, pacientka P23 pouze 6 let života (tabulka 15). U pacientů P19–P22 bylo vážné podezření na mitochondriální poruchu, avšak spektrofotometrická měření aktivit jednotlivých komplexů OXPHOS byla ve fibroblastech u těchto pacientů v normě. V případě analýzy KMEM jsme však detekovali výrazné rozdíly mitochondriálního metabolismu oproti kontrole a to zejména sníženou oxidaci pyruvátu, snížený poměr 3/5 a 6/1 značící defekt MEM. Též jsme u 2 pacientů pozorovali sníženou aktivitu PDHc a u jednoho naopak sníženou aktivitu  $\alpha$ -KGD.

**Tabulka 15: Porovnání výsledků analýzy KMEM a spektrofotometrického měření aktivit jednotlivých enzymů OXPHOS v kultivovaných kožních fibroblastech od pacientů s kombinovaným deficitem systému oxidativní fosforace a Krebsova cyklu.**

pacient	věk	diagnóza (mutace v genu)	SPR ve F	KMEM ve F	poznámka
P19	7 t. †	<i>TSMF</i> (c.[446G>A];[856C>T])	v normě	↓ ink. 2, 3, a 5 (pyruvát), ↑↑↑ ink. 9 (malát), ↓↓↓3/5, ↓↓6/1, ↓7/8	† 7. t.
P20	4 m.	<i>OPA1</i> (c.[1062_1064delAGA]; [1768C>T])	v normě	↓↓ pyruvát, ↓3/5	† 10 m., bratr P22
P21	9 m.	<i>OPA1</i> (c.[1062_1064delAGA]; [1768C>T])	v normě	↓↓ pyruvát, ↓↓ ink. 6 (malát), ↓3/5, ↓↓6/1, ↑↑↑7/6	† 12 m., bratr P21
P22	13 r.	<i>TYMP</i> (c.[261G>T] + Chr22:del492275958_49 362964)	↓↓↓ TYMP	↓↓ ink. 3 a 5(pyruvát), ↓↓ malát, ↓1/3, ↓↓6/1	
P23	2 m.	<i>FH</i> (c.[1127A>C]; [1127A>C])	↓↓↓ FH	↓ ink. 1, 2, 4a a 5, ↓↓ malát, ↓3/5, ↓↓↓6/1, ↑↑7/6	6 r.

↓↓↓ pokles na 0–35 %, ↓↓ pokles na 36–70 %, ↓ pokles na 71–100 %, ↑ nárůst na 101–135 %, ↑↑ nárůst na 136–170 %, ↑↑↑nárůst na 171–200 %, kontrolních hodnot. Vysvětlení zkratk: F fibroblasty, FH *fumaráthydratáza*, ink inkubace, m měsíc, r rok, SPR spektrofotometrie, t týden, TYMP *thymidinofosforyláza*, † úmrtí. Složení inkubací analýzy KMEM:

- 1 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP, 2 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + karnitin + ADP, 3 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát – ADP,
- 4 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát – ADP + CCCP, 4a [1-<sup>14</sup>C] pyruvát – karnitin + ADP,
- 5 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP + atraktylosid, 6 [U-<sup>14</sup>C] malát + pyruvát + malonát + ADP,
- 7 [U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + malonát + ADP, 8 [U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + arsenit + ADP,
- 9 [1,4-<sup>14</sup>C] sukcinát + acetylkarnitin + ADP

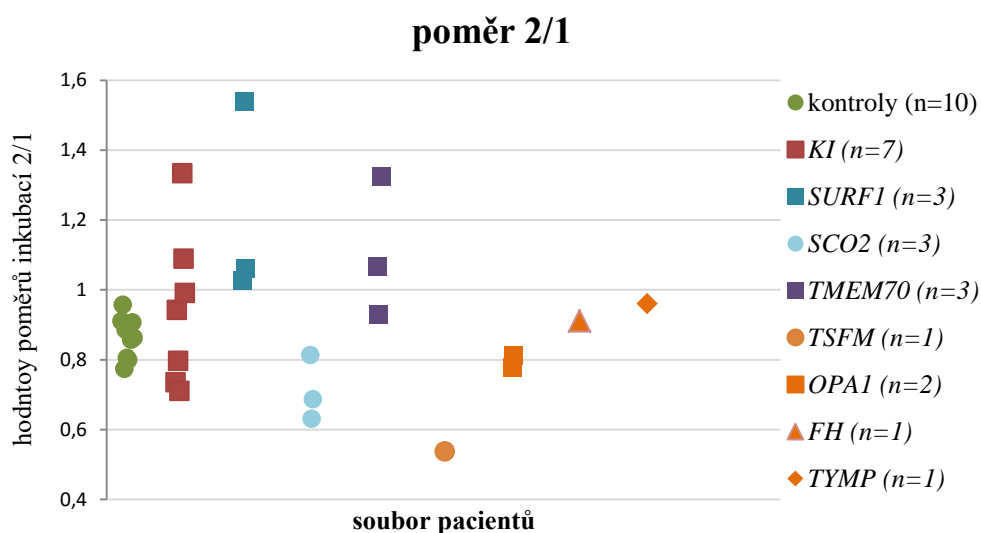
Naše výsledky korespondují s publikací A. J. M. Janssen et al., 2006, kde KMEM analyzovali ve svalové tkáni u 24 pacientů s mutací m.3243A>G, způsobující syndrom MELAS. Jedná se o mutaci v genu *MT-TL1* kódujícím mitochondriální tRNA pro leucin. Vlivem mutace dochází ke snížené mitochondriální proteosyntézy a jedná se tedy o kombinovaný deficit OXPHOS. V této publikaci jsou demonstrovány výsledky měření KMEM inkubace 1, 2 a 3, poměry 2/1 a 1/3. Dále jsou zde srovnány výsledky analýzy KMEM se spektrofotometrickým měřením aktivit komplexů I, III a IV. Sníženou rychlost oxidace inkubace 1 pozorovali u 14 z 23 pacientů (u jednoho není hodnota uvedena), sníženou inkubaci 2 zjistili u 18 z 24 pacientů, zvýšený poměr 2/1 u 10 z 23 pacientů a snížený poměr 1/3 u 10 z 23 pacientů. Snížená aktivita KI byla u 14 z 24 pacientů, aktivita KIII byla pod spodní hranicí normy u 6 z 22 pacientů a snížená aktivita cytochrom *c* oxidázy byla u 7 z 22 pacientů. Závěrem jejich práce bylo, že analýza KMEM je citlivější na predikci mitochondriálních onemocnění, respektive MELAS syndromu, než samostatná enzymologická měření. Avšak kombinace analýzy KMEM spolu se spektrofotometrií přináší více informací o MEM a je tak vhodným nástrojem k diagnostice mitochondriálních onemocnění (Janssen et al., 2008). Tento závěr jsme potvrdili i na měření KMEM z kultivovaných kožních fibroblastů, jak je patrné z demonstrovaných výsledků výše.

#### **6.1.5. Porovnání výsledků analýzy KMEM mezi různými primárními mitopatiemi**

V této podkapitole bych ráda zmínila dva z poměrů inkubací analýzy KMEM, poměr 2/1 indikující aktivitu dýchacího řetězce a poměr 7/6 určující aktivitu PDHc. Srovnání hodnot těchto poměrů mezi jednotlivými skupinami mitopatií shrnují grafy 26 (poměr 2/1) a 27 (poměr 7/6).

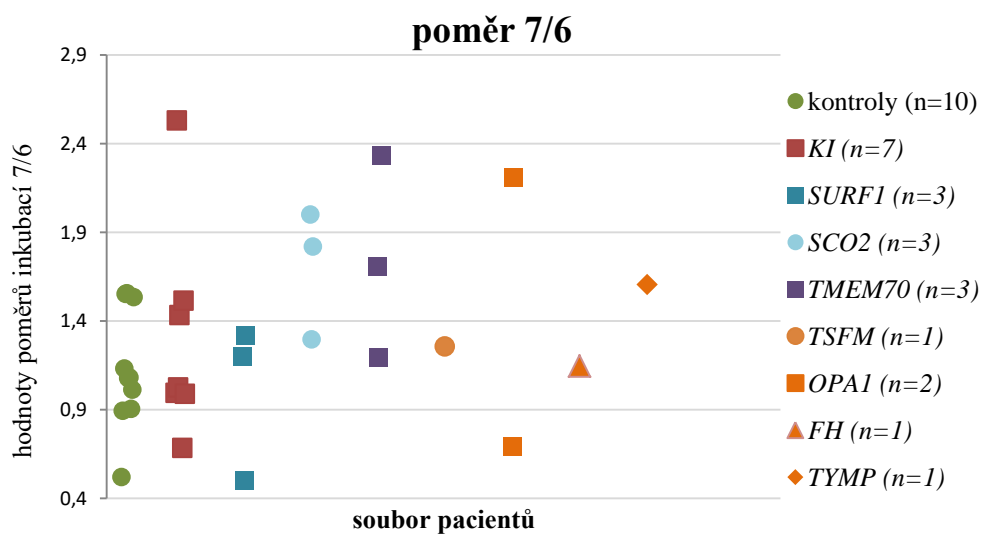
Zvýšený poměr 2/1 má dohromady 9 z 23 pacientů, 3 pacienti ze 7 s deficitem KI (mutace v mtDNA), všichni 3 pacienti s mutací v genu *SURF1* a 2 ze 3 pacientů s deficitem ATP syntázy, nesoucí mutaci v genu *TMEM70*. Skupina pacientů s kombinovaným deficitem má tento poměr v normě či snížený (*TSMF*), pacienti s mutací *SCO2* mají tento poměr na spodní hranici normy či snížený. Data korespondují s měřeními holandské skupiny Antoona Janssena. V jejich souboru detekovali ve svalové tkáni zvýšený poměr 2/1 u 10 z 23 pacientů s mutací m.3243A>G (gen *MT-TL1*) (Janssen et al., 2008) a u 13 z 18 pacientů s deficitem OXPHOS (A. J. M. Janssen et al., 2006).





**Graf 26: Porovnání parametru 2/1 (poměr inkubací 2/1 určující aktivitu dýchacího řetězce) analýzy KMEM u jednotlivých skupin mitopatií a kontrol.**

U pacientů s deficitem OXHOS jsme metodou KMEM často pozorovali sekundárně sníženou aktivitu PDHc ve fibroblastech. Snížená aktivita PDHc se projevuje jako zvýšený poměr 7/6 a byla zjištěna u 7 z 23 pacientů s primární poruchou OXPHOS. Jedná se o 2 pacienty s mutací v genu *SCO2*, 2 pacienty s mutací v genu *TMEM70*, 1 pacienta s mutací v *OPA1* genu, u 1 pacienta s mutací *TYMP* genu a u 1 pacienta s poruchou KI. U dalších 2 pacientů s poruchou komplexu I byla aktivita PDHc (zvýšený poměr 7/6) na horní hranici normy. Ve studii skupiny Antoona Janssen byl detekován zvýšený poměr 7/6 u 9 z 11 pacientů s deficitem KI, u 1 pacienta s deficitem KIII a u 1 pacienta s deficitem ATP syntázy. Celkem u 11 ze 17 pacientů s deficitem OXPHOS (A. J. M. Janssen et al., 2006).



**Graf 27: Porovnání parametru 7/6 (poměr inkubací 7/6 určující aktivitu PDHc) analýzy KMEM u jednotlivých skupin mitopatií a kontrol.**

## 6.2. KMEM u pacientů se sekundárním deficitem OXPHOS

Analyzovaný soubor pacientů se sekundárním deficitem OXPHOS tvořilo 7 pacientů (P24–P30) s Huntingtonovou chorobou. U jednoho pacienta (P26) byly sníženy všechny inkubace obsahující pyruvát (na 35–66 % KH). U čtyř pacientů (P25, P26, P28 a P30) byla snížena oxidace inkubace 4 ([1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát – ADP + CCCP) na 78–81 % KH. U třech pacientů (P25, P26 a P30) byla snížena oxidace inkubace 1 ([1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP) na 25–77 % KH a u pacienta P25 byla navíc ještě lehce snížena oxidace inkubace 4a ([1-<sup>14</sup>C] pyruvát – karnitin + ADP) na 71 % KH. U všech 7 pacientů byla snížena alespoň jedna z inkubací obsahujících malát (na 38–79 % KH), přičemž u 4 pacientů (P24, P26, P29 a P30) byly sníženy všechny 3 inkubace obsahující malát. Snížená oxidace sukcinátu byla zjištěna u 6 (P24–P26 a P28–P30) ze 7 pacientů a to na 37–76 % KH.

Snížený poměr 1/3 určující spřažení OXPHOS byl snížen u 5 (P25–P28 a P30) ze 7 pacientů (na 16–79 % KH), zvýšený poměr 2/1 značící sníženou aktivitu dýchacího řetězce byl zjištěn u 2 pacientů (P25 a P26; 350 a 123 % KH), snížený poměr 6/1 značící deficit OXPHOS byl zjištěn u 3 pacientů (P24, P28 a P29; 56–78 % KH). Zvýšený poměr 4/1 byl zjištěn u pacientů P24 a P25 (122 a 326 % KH) a mírně snížený poměr 3/5 byl detekován u P24 a P27 (83 a 80 % KH). Sníženou aktivitu  $\alpha$ -KGD (snížený poměr 7/8) jsme zjistili u 4 (P24–P26 a P29) ze 7 pacientů a to na 24–70 % KH.

Jak je patrné z tabulky 16, analýza KMEM pacientů s HD potvrzuje, že u těchto pacientů dochází k narušení MEM i na úrovni periferních tkání, jako jsou kultivované kožní fibroblasty. Pozorujeme zejména snížení oxidací malátu a sukcinátu, dále pak snížený poměr 1/3 u většiny pacientů a u některých i disbalanci jiných poměrů inkubací KMEM. Naše výsledky spolu s výsledky spektrofotometrických měření ukazují na narušení nejen systému oxidativní fosforylace, ale i určitá narušení na úrovni Krebsova cyklu. U 5 pacientů (P24 a P27–P30) ze 6 byla zjištěna snížená aktivita CS (na 36–74 % KH), u pacienta P25 byla aktivita CS naopak zvýšená (na 170 % KH) a u 4 pacientů (P24–P26 a P29) ze 7 byla snížena aktivita  $\alpha$ -KGD (diskutováno výše).

**Tabulka 16: Porovnání výsledků analýzy KMEM a spektrofotometrického měření aktivit jednotlivých enzymů OXPHOS v kultivovaných kožních fibroblastech od pacientů s Huntingtonovou chorobou.**

pacient	věk	počet CAG repetice	SPR ve F	KMEM ve F	věk nástupu nemoci	poznámka
P24	34 r.	20/53	↓↓KIV, ↓↓CS	↓↓ malát, ↓↓ sukcinát, ↑4/1, ↓3/5, ↓↓6/1, ↓7/6, ↓↓7/8	27 r.	
P25	40 r.	19/48	↑↑↑KIV, ↑↑CS	↓↓↓ ink. 1 (pyruvát), ↓ ink. 2, 4 a 5 (pyruvát), ↓↓ ink. 8 (malát) a sukcinát, ↓↓↓1/3, ↑↑↑↑2/1, ↑↑↑↑4/1, ↓↓↓7/6, ↓↓↓7/8	35 r.	
P26	42 r.	24/42	NA	↓↓ pyruvát, malát a sukcinát, ↓↓1/3, ↑2/1, ↑4/1, ↓3/5, ↓↓7/6, ↓↓7/8	28 r.	
P27	74 r.	17/40	↑↑↑KI, ↓↓↓KIV, ↓↓CS	↓↓ ink. 8 a 9 (malát), ↓ sukcinát, ↓1/3, ↓3/5, ↓↓↓7/6, ↓7/8	70 r.	† 75 r.
P28	39 r.	28/49	↓↓KIV, ↓↓CS, ↑↑KIV/CS	↓↓ ink. 4 (pyruvát), ↓↓ malát, ↓↓ sukcinát, ↓↓1/3, ↑2/1, ↓6/1, ↑↑7/8	neznámý	
P29	48 r.	20/44	↑↑↑KI, ↓↓↓KIV, ↓↓CS	↓↓ ink. 4 (pyruvát), ↓↓ malát, ↓ sukcinát, ↓1/3, ↓↓6/1, ↓↓7/6, ↓↓7/8	neznámý	† 48 r.
P30	62 r. †	19/44	↓↓CS	↓↓ ink. 1, 2 a 4 (pyruvát), ↓↓ malát, ↓↓ sukcinát, ↓↓1/3, ↑2/1, ↑4/1, ↑↑7/8	neznámý	† 62 r.

↓↓↓ pokles na 0–35 %, ↓↓ pokles na 36–70 %, ↓ pokles na 71–100 %, ↑ nárůst na 101–135 %, ↑↑ nárůst na 136–170 %, ↑↑↑ nárůst na 171–200 %, ↑↑↑↑ nárůst na 201–300 %, ↑↑↑↑↑ nárůst na 301–400 % kontrolních hodnot. Vysvětlení zkratk: CS citrátsyntáza, F fibroblasty, ink inkubace, KI NADH:ubichinonoxidoreduktáza, KIV cytochrom *c* oxidáza, NA nebylo analyzováno, r rok, SPR spektrofotometrie, † úmrtí. Složení inkubací analýzy KMEM:  
 1 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP, 2 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + karnitin + ADP, 3 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát – ADP, 4 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát – ADP + CCCP, 4a [1-<sup>14</sup>C] pyruvát – karnitin + ADP, 5 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP + atraktylosid, 6 [U-<sup>14</sup>C] malát + pyruvát + malonát + ADP, 7 [U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + malonát + ADP, 8 [U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + arsenit + ADP, 9 [1,4-<sup>14</sup>C] sukcinát + acetylkarnitin + ADP

### 6.3. Porovnání výsledků KMEM v kosterním svalu a v kultivovaných kožních fibroblastech od vybraných pacientů s deficitem OXPHOS

Analýza KMEM ve svalové tkáni byla provedena celkem u 6 pacientů s primárním deficitem OXPHOS (P5, P6, P8, P16, P18 a P21) v rámci rutinní diagnostiky pacientů s podezřením na mitochondriální onemocnění pracovníky Laboratoře pro studium mitochondriálních poruch.

Tabulka 17 srovnává výsledky analýzy KMEM mezi svalovou tkání (*musculus tibialis anterior*) a kultivovanými kožními fibroblasty. Z tabulky je patrné, že výsledky analýz KMEM obou tkání mezi sebou korelují. V případě svalové tkáně však většinou detekujeme více indikátorů, naznačujících narušení OXPHOS než v případě fibroblastů. Tento jev je dán zejména tím, že svalová tkáň je působením mitochondriální poruchy postižena daleko více než kožní fibroblasty, které jsou na energii méně náročné. Z tabulky je však patrné, že i z kultivovaných fibroblastů lze detekovat poškození MEM.

**Tabulka 17: Srovnání výsledků analýzy KMEM ve svalu a v kultivovaných kožních fibroblastech u vybraných pacientů s mitochondriálním onemocněním.**

pacient	diagnóza (mutace v genu)	KMEM ve F	KMEM ve S
P5	<i>MTND5</i> (m.13513G>A)	↓↓ pyruvát, ↑↑ sukcinát, ↓7/8	↓↓ pyruvát a sukcinát, ↓↓1/3, ↑↑2/1, ↓↓3/5
P6	<i>MTND5</i> (m.13046T>C)	↓↓ pyruvát, ↑ sukcinát, ↓3/5, ↑7/6	↓↓ pyruvát a sukcinát, ↓↓1/3, ↑↑↑↑2/1, ↓↓3/5, ↓↓6/1, ↑↑↑↑7/6
P8	<i>MTND5</i> (m.12706T>C)	↓ sukcinát, ↓3/5	↓↓1/3, ↑↑2/1, ↓↓3/5
P16	<i>TMEM70</i> (c.[317-2A>G]; [317-2A>G])	↓↓ ink. 1, 3 a 5 (pyruvát), ↓ ink. 2 (pyruvát), ↑↑↑ malát, ↑↑ sukcinát, ↑2/1, ↑↑4/1, ↓3/5, ↑↑7/6	↓↓↓ pyruvát, malát a sukcinát, ↓↓1/3, ↑↑4/1
P18	<i>TMEM70</i> (c.[317-2A>G]; [317-2A>G])	↓ pyruvát, ↑↑2/1, ↓↓ 6/1, ↑↑↑↑7/6	↓↓↓ pyruvát a sukcinát, ↓↓↓1/3, ↑↑↑2/1, ↑↑↑↑4/1, ↓↓3/5
P21	<i>OPA1</i> (c.[1062_1064delAGA]; [1768C>T])	↓↓ pyruvát, ↓3/5, ↓↓6/1, ↑↑↑7/6	↓↓ pyruvát, malát a sukcinát, ↓↓↓1/3, ↑2/1, ↓3/5, ↓↓6/1

↓↓↓ pokles na 0–35 %, ↓↓ pokles na 36–70 %, ↓ pokles na 71–100 %, ↑ nárůst na 101–135 %, ↑↑ nárůst na 136–170 %, ↑↑↑ nárůst na 171–200 %, ↑↑↑↑ nárůst na 201–300 %, ↑↑↑↑↑ nárůst na 301–400 % kontrolních hodnot. Vysvětlení zkratk: F fibroblasty, ink inkubace, S sval. Složení inkubací analýzy KMEM:

1 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP, 2 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + karnitin + ADP, 3 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát – ADP, 5 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP + atraktylosid, 6 [U-<sup>14</sup>C] malát + pyruvát + malonát + ADP, 7 [U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + malonát + ADP

**Zeleně je znázorněna shoda výsledků analýzy KMEM mezi svaem a kultivovanými kožními fibroblasty.**

Zajímavým zjištěním je, že ve fibroblastech oproti svalové tkáni dochází často ke snížení aktivity PDHc (zvýšený poměr 7/6 na 150–210 % u P16 (*TMEM70*), P18 (*TMEM70*) a P21 (*OPA1*)). V případě pacienta P6 (*ND5*) byl poměr 7/6 zvýšen výrazně více (na více než 400 % KH) ve svalu a pouze mírně (na 130 % KH) ve fibroblastech.

#### 6.4. Porovnání výsledků analýzy KMEM s výsledky polarografie v kultivovaných kožních fibroblastech od vybraných pacientů s deficitem OXPHOS

Měření spotřeby kyslíku (polarografie, respirometrie) je vedle analýzy KMEM další funkční analýzou, která se rutinně používá v rámci diagnostiky mitochondriálních poruch. Respirometrická analýza byla ve fibroblastech provedena u čtyř pacientů z našeho souboru (P1, P7, P10 a P13) v rámci diplomové práce Mgr. Michaely Markové (Marková, 2015). Výsledky respirometrie a analýzy KMEM byly dále porovnávány s výsledky spektrofotometrického měření aktivit jednotlivých komplexů OXPHOS ve fibroblastech (tabulka 18). Ty byly provedeny pracovníky Laboratoře pro studium mitochondriálních poruch v rámci rutinní diagnostiky.

**Tabulka 18: Srovnání výsledků analýzy KMEM, polarografie a spektrofotometrie ve fibroblastech vybraných pacientů s mitochondriálním onemocněním.**

pacient	diagnóza (mutace v genu)	SPR ve F	KMEM ve F	polarografie ve F
P1	<i>MTND1</i> (m.3697G>A)	↓↓ KI+III	↓↓ pyruvát, ↓3/5	respirace po přidání substrátů: ↓↓KI+ADP
P7	<i>MTND5</i> (m.13042G>A)	v normě	↓↓ pyruvát, ↑↑2/1, ↑↑4/1, ↓3/5	respirace po přidání substrátů: ↓↓KI+ADP
P10	<i>SURF1</i> (c.[312_321del10insAT]; [845_846delCT])	↓↓↓KIV, ↓↓↓KIV/CS	↓↓ pyruvát, ↑↑↑ malát, ↓ sukcinát, ↓↓1/3, ↑2/1	respirace po přidání substrátů: ↓↓KI, ↓↓KI+ADP, ↓↓KII, ↓KIV
P13	<i>SCO2</i> (c.[418G>A];[418G>A])	v normě	↑ sukcinát, ↓1/3, ↓↓6/1, ↑↑↑7/6	respirace po přidání substrátů: ↓↓KI+ADP, ↓↓KII a ↓↓KIV

↓↓↓ pokles na 0–35 %, ↓↓ pokles na 36–70 %, ↓ pokles na 71–100 %, ↑ nárůst na 101–135 %, ↑↑ nárůst na 136–170 %, ↑↑↑ nárůst na 171–200 %, ↑↑↑↑ nárůst na 201–300 %, ↑↑↑↑↑ nárůst na 301–400 % kontrolních hodnot. Vysvětlení zkratk: CS citrátsyntáza, F fibroblasty, KI NADH:ubichinonoxidoreduktáza, KII sukcinát:ubichinonoxidoreduktáza, KI+III NADH:cytochrom *c* reduktáza, KIV cytochrom *c* oxidáza, SPR spektrofotometrie. Složení inkubační analýzy KMEM: 1 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP, 2 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + karnitin + ADP, 3 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát – ADP, 5 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP + atraktylosid, 6 [U-<sup>14</sup>C] malát + pyruvát + malonát + ADP, 7 [U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + malonát + ADP

Následující příklad ukazuje, jak je v některých případech diagnostika mitochondriálních onemocnění náročná. U pacientky P1 s mutací v podjednotce KI (ND1) bylo původně vzhledem k výsledkům BN-PAGE podezření na deficit KV (data nejsou uvedena). Toto podezření bylo však následně vyvráceno dalšími analýzami. V případě polarografie byla pozorována snížená respirace po přidání substrátu KI+ADP (na 50 % KH), tyto výsledky naznačují deficit KI. V rámci analýzy KMEM jsme pozorovali sníženou oxidaci 4 ze 6 inkubací obsahujících pyruvát (na 48–68 % KH), která se vyskytuje často u pacientů s deficitem KI a mírně snížený poměr 3/5 (na 83 % KH). Snížený poměr 3/5 naznačuje deficit na úrovni ATP syntázy či ANT, avšak snížený poměr 3/5 pozorujeme i u některých pacientů s deficitem KI (P2 a P8), KIV (P11 a P12) a s deficitem kombinovanými (P19, P21 a P22). U P1 navíc nebyl detekován zvýšený poměr 4/1, naznačující deficit KV či ANT. Analýza KMEM tedy vyvracela podezření na deficit ATP syntázy. Spektrofotometrická měření pak také naznačovala deficit KI (snížená aktivita KI+III).

Pacientka P7 nese mutaci ve strukturní podjednotce KI (ND5). U této pacientky byla zjištěna snížená respirace po přidání substrátů KI+ADP (na 60 % KH). Z analýzy KMEM jsme zjistili sníženou oxidaci 4 ze 6 inkubací obsahujících pyruvát (na 57–74 % KH), zvýšený poměr 2/1 (na 150 % KH) a zvýšený poměr 4/1 (na 166 % KH). Z výsledků analýzy KMEM by se mohlo zdát, že se jedná o deficit KV či ANT, zvýšený poměr 4/1 je však někdy i u pacientů s poruchou KI (diskutováno výše). Spektrofotometrie u této pacientky nevykazovala žádné rozdíly oproti kontrolnímu vzorku.

U pacienta P10 s mutací v assembly faktoru KIV (SURF1) výsledky respirometrie poukazovaly na deficit OXPHOS, ale nebyly zcela kontrétně směřovány na KIV, jelikož byla snížená respirace po přidání substrátů KI (na 33 % KH), KI+ADP (na 25 % KH), KII (na 20 % KH) a KIV (na 77 % KH). Analýzou KMEM jsme zjistili sníženou oxidaci 3 ze 6 inkubací obsahujících pyruvát (na 64–80 % KH), zvýšenou oxidaci malátu (na 182–292 % KH), sníženou oxidaci sukcinátu (na 79 % KH) a lehce zvýšený poměr 2/1 (na 116 % KH). Tato zjištění naznačují podobně jako výsledky respirometrie narušení OXPHOS, ale ne zcela přesnou lokalizaci defektu a mohli bychom mít podezření na kombinovaný deficit OXPHOS. Oproti tomu výsledky spektrofotometrie ve fibroblastech u tohoto pacienta poukazují jasně na deficit KIV, jelikož je výrazně snížená aktivita KIV (na 21 % KH) i poměr KIV/CS (na 25 % KH).

U pacienta s mutací v genu pro asemblační faktor KIV, *SCO2*, byla pozorována snížená respirace po přidání substrátů KI+ADP (na 46 % KH), KII (na 49 % KH) a KIV (na 34 % KH) zatímco analýza KMEM detekovala zvýšenou oxidaci sukcinátu (na 132 % KH), snížený poměr 6/1 (na 42 % KH) naznačující deficit na úrovni OXHOS a zvýšený poměr 7/6 (na 180 % KH) určující sníženou aktivitu PHDc. Obě dvě funkční analýzy poukazují na deficit systému OXPHOS avšak ne zcela konkrétně. Oproti tomu spektrofotometrická měření aktivit komplexů dýchacího řetězce ve fibroblastech nevykazují žádné rozdíly oproti kontrolnímu souboru.

Srovnání funkčních biochemických měření (respirometrie a analýza KMEM) spolu se spektrofotometrickým měřením poukazuje na to, že k diagnostice mitopatií je třeba více metod a výsledky jednotlivých z nich se mezi sebou ne vždy zcela shodují.

## 7. Souhrn

V této diplomové práci byla provedena rozsáhlá studie KMEM v kultivovaných kožních fibroblastech od 23 pacientů s primární mitochondriální poruchou, od sedmi pacientů se sekundární mitochondriální poruchou (HD) a od 15 kontrol.

Bylo optimalizováno množství proteinu v inkubaci analýzy KMEM a následně byly změřeny hodnoty KMEM pro 15 kontrol ve věku několika dnů života až 49 let. Bylo zjištěno, že parametry analýzy KMEM se liší v závislosti na věku a že je třeba výsledky analýzy KMEM pacientů s podezřením na mitochondriální onemocnění srovnávat s parametry KMEM kontrol obdobného věku.

Byla změřena KMEM u 9 pacientů s deficitem KI, u 6 pacientů s deficitem KIV, u 3 pacientů s deficitem  $F_1F_0$  ATP syntázy, u 4 pacientů s kombinovaným deficitem OXPHOS a u jedné pacientky s deficitem Krebsova cyklu.

Ukázalo se, že analýza KMEM ve fibroblastech ne vždy jasně ukazuje místo zasažení dýchacího řetězce avšak většinou je u pacientů s primární mitochondriální poruchou snižená oxidace inkubací obsahujících  $[1-^{14}C]$  pyruvát. Z našich výsledků se zdá, že nejlépe jsou pomocí analýzy KMEM ve fibroblastech detekovány pacienti s deficitem KI, s mutací v mtDNA, pacienti s mutací v *SURF1* genu a pacienti s mutací v *TMEM70* genu (poměr 2/1).

Dále jsme zjistili, že u pacientů s mitochondriální poruchou dochází často k sekundárnímu snížení aktivity PDHc na úrovni kultivovaných kožních fibroblastů. Zejména u pacientů s mutací v genu *SCO2* a *TMEM70*. Snižovaná aktivita PDHc však byla zjištěna i u jednoho pacienta s mutací v mtDNA pro strukturní podjednotku KI a u pacienta s mutací v *OPA1* genu.

U pacientů se sekundární poruchou OXPHOS (HD) jsme úspěšně detekovali změny v MEM na úrovni kultivovaných kožních fibroblastů. U pacientů s HD jsme pozorovali sníženou oxidaci inkubací obsahujících  $[U-^{14}C]$  malát a  $[1,4-^{14}C]$  sukcinát a u některých pacientů jsme zjistili sníženou aktivitu  $\alpha$ -KGD.

Byly srovnány výsledky analýzy KMEM ve fibroblastech spolu s výsledky analýzy KMEM v kosterním svalu. Zjistili jsme, že výsledky mezi těmito dvěma tkáněmi korelují, avšak v případě svalové tkáně detekujeme více indikátorů ukazujících na deficit OXPHOS.



Dále byly výsledky analýzy KMEM korelovány s výsledky spektrofotometrického měření aktivit jednotlivých enzymů OXPHOS a ukázalo se, že analýza KMEM je citlivější na detekci disbalance MEM oproti spektrofotometrii avšak sama o sobě není dostatečným nástrojem k diagnostice mitochondriálních poruch. K přesné lokalizaci deficitu systému OXPHOS nám napomůže kombinace více biochemických metod spolu s klinickými daty a molekulárně-genetickou studií kandidátních genů.

## 8. Literatura

- Abdulhag, U.N., Soiferman, D., Schueler-Furman, O., Miller, C., Shaag, A., Elpeleg, O., Edvardson, S., Saada, A., 2015. Mitochondrial complex IV deficiency, caused by mutated COX6B1, is associated with encephalomyopathy, hydrocephalus and cardiomyopathy. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 23, 159–164.
- Alfadhel, M., Lillquist, Y.P., Waters, P.J., Sinclair, G., Struys, E., McFadden, D., Henderson, G., Hyams, L., Shoffner, J., Vallance, H.D., 2011. Infantile cardioencephalopathy due to a COX15 gene defect: report and review. *Am. J. Med. Genet. A* 155A, 840–844.
- Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J., Staden, R., Young, I.G., 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290, 457–465.
- Antonicka, H., Mattman, A., Carlson, C.G., Glerum, D.M., Hoffbuhr, K.C., Leary, S.C., Kennaway, N.G., Shoubridge, E.A., 2003. Mutations in COX15 produce a defect in the mitochondrial heme biosynthetic pathway, causing early-onset fatal hypertrophic cardiomyopathy. *Am. J. Hum. Genet.* 72, 101–114.
- Balsa, E., Marco, R., Perales-Clemente, E., Szklarczyk, R., Calvo, E., Landázuri, M.O., Enríquez, J.A., 2012. NDUFA4 is a subunit of complex IV of the mammalian electron transport chain. *Cell Metab.* 16, 378–386.
- Benchoua, A., Trioulier, Y., Zala, D., Gaillard, M.-C., Lefort, N., Dufour, N., Saudou, F., Elalouf, J.-M., Hirsch, E., Hantraye, P., Déglon, N., Brouillet, E., 2006. Involvement of mitochondrial complex II defects in neuronal death produced by N-terminus fragment of mutated huntingtin. *Mol. Biol. Cell* 17, 1652–1663.
- Bossy-Wetzell, E., Petrilli, A., Knott, A.B., 2008. Mutant huntingtin and mitochondrial dysfunction. *Trends Neurosci.* 31, 609–616.
- Bourens, M., Boulet, A., Leary, S.C., Barrientos, A., 2014. Human COX20 cooperates with SCO1 and SCO2 to mature COX2 and promote the assembly of cytochrome c oxidase. *Hum. Mol. Genet.* 23, 2901–2913.
- Bugiani, M., Tiranti, V., Farina, L., Uziel, G., Zeviani, M., 2005. Novel mutations in COX15 in a long surviving Leigh syndrome patient with cytochrome c oxidase deficiency. *J. Med. Genet.* 42, e28–e28.
- Bundschuh, F.A., Hannappel, A., Anderka, O., Ludwig, B., 2009. Surf1, associated with Leigh syndrome in humans, is a heme-binding protein in bacterial oxidase biogenesis. *J. Biol. Chem.* 284, 25735–25741.
- Cairns, R.A., Harris, I.S., Mak, T.W., 2011. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat. Rev. Cancer* 11, 85–95.
- Calvo, S., Jain, M., Xie, X., Sheth, S.A., Chang, B., Goldberger, O.A., Spinazzola, A., Zeviani, M., Carr, S.A., Mootha, V.K., 2006. Systematic identification of human mitochondrial disease genes through integrative genomics. *Nat. Genet.* 38, 576–582.
- Chevrollier, A., Guillet, V., Loiseau, D., Gueguen, N., de Crescenzo, M.-A.P., Verny, C., Ferre, M., Dollfus, H., Odent, S., Milea, D., Goizet, C., Amati-Bonneau, P., Procaccio, V., Bonneau, D., Reynier, P., 2008. Hereditary optic neuropathies share a common mitochondrial coupling defect. *Ann. Neurol.* 63, 794–798.
- Čížková, A., Stránecký, V., Mayr, J.A., Tesarová, M., Havlíčková, V., Paul, J., Ivánek, R., Kuss, A.W., Hansíková, H., Kaplanová, V., Vrbacký, M., Hartmannová, H., Nosková, L., Honzík, T., Drahotka, Z., Magner, M., Hejzlarová, K., Sperl, W., Zeman, J., Houstek,

- J., Kmoch, S., 2008. TMEM70 mutations cause isolated ATP synthase deficiency and neonatal mitochondrial encephalomyopathy. *Nat. Genet.* 40, 1288–1290.
- Costa, V., Scorrano, L., 2012. Shaping the role of mitochondria in the pathogenesis of Huntington's disease. *EMBO J.* 31, 1853–1864.
- Davies, K.M., Strauss, M., Daum, B., Kief, J.H., Osiewacz, H.D., Rycovska, A., Zickermann, V., Kühlbrandt, W., 2011. Macromolecular organization of ATP synthase and complex I in whole mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 14121–14126.
- Diaz, F., Kotarsky, H., Fellman, V., Moraes, C.T., 2011. Mitochondrial disorders caused by mutations in respiratory chain assembly factors. *Semin. Fetal. Neonatal Med.* 16, 197–204.
- DiMauro, S., Schon, E.A., 2003. Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N. Engl. J. Med.* 348, 2656–2668.
- Doss, S., Lohmann, K., Seibler, P., Arns, B., Klopstock, T., Zühlke, C., Freimann, K., Winkler, S., Lohnau, T., Drungowski, M., Nürnberg, P., Wiegers, K., Lohmann, E., Naz, S., Kasten, M., Bohner, G., Ramirez, A., Endres, M., Klein, C., 2014. Recessive dystonia-ataxia syndrome in a Turkish family caused by a COX20 (FAM36A) mutation. *J. Neurol.* 261, 207–212.
- Duyao, M., Ambrose, C., Myers, R., Novelletto, A., Persichetti, F., Frontali, M., Folstein, S., Ross, C., Franz, M., Abbott, M., 1993. Trinucleotide repeat length instability and age of onset in Huntington's disease. *Nat. Genet.* 4, 387–392.
- Fassone, E., Rahman, S., 2012. Complex I deficiency: clinical features, biochemistry and molecular genetics. *J. Med. Genet.* 49, 578–590.
- Frezza, C., Cipolat, S., Martins de Brito, O., Micaroni, M., Beznoussenko, G.V., Rudka, T., Bartoli, D., Polishuck, R.S., Danial, N.N., De Strooper, B., Scorrano, L., 2006. OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell* 126, 177–189.
- Granata, S., Zaza, G., Simone, S., Villani, G., Latorre, D., Pontrelli, P., Carella, M., Schena, F.P., Grandaliano, G., Pertosa, G., 2009. Mitochondrial dysregulation and oxidative stress in patients with chronic kidney disease. *BMC Genomics* 10, 388.
- Gray, M.W., 2012. Mitochondrial evolution. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, a011403.
- Greco, M., Villani, G., Mazzucchelli, F., Bresolin, N., Papa, S., Attardi, G., 2003. Marked aging-related decline in efficiency of oxidative phosphorylation in human skin fibroblasts. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 17, 1706–1708.
- Gu, M., Gash, M.T., Mann, V.M., Javoy-Agid, F., Cooper, J.M., Schapira, A.H., 1996. Mitochondrial defect in Huntington's disease caudate nucleus. *Ann. Neurol.* 39, 385–389.
- Haack, T.B., Haberberger, B., Frisch, E.-M., Wieland, T., Iuso, A., Gorza, M., Strecker, V., Graf, E., Mayr, J.A., Herberg, U., Hennermann, J.B., Klopstock, T., Kuhn, K.A., Ahting, U., Sperl, W., Wilichowski, E., Hoffmann, G.F., Tesarova, M., Hansikova, H., Zeman, J., Plecko, B., Zeviani, M., Wittig, I., Strom, T.M., Schuelke, M., Freisinger, P., Meitinger, T., Prokisch, H., 2012. Molecular diagnosis in mitochondrial complex I deficiency using exome sequencing. *J. Med. Genet.* 49, 277–283.
- Haas, R.H., Parikh, S., Falk, M.J., Saneto, R.P., Wolf, N.I., Darin, N., Wong, L.-J., Cohen, B.H., Naviaux, R.K., 2008. The in-depth evaluation of suspected mitochondrial disease. *Mol. Genet. Metab.* 94, 16–37.
- Hallmann, K., Kudin, A.P., Zsurka, G., Kornblum, C., Reimann, J., Stüve, B., Waltz, S., Hattingen, E., Thiele, H., Nürnberg, P., Rüb, C., Voos, W., Kopatz, J., Neumann, H.,

- Kunz, W.S., 2016. Loss of the smallest subunit of cytochrome c oxidase, COX8A, causes Leigh-like syndrome and epilepsy. *Brain J. Neurol.* 139, 338–345.
- Hejzlarová, K., Mráček, T., Vrbacký, M., Kaplanová, V., Karbanová, V., Nůsková, H., Pecina, P., Houšťek, J., 2014. Nuclear genetic defects of mitochondrial ATP synthase. *Physiol. Res. Acad. Sci. Bohemoslov.* 63 Suppl 1, S57-71.
- Hirst, J., 2013. Mitochondrial complex I. *Annu. Rev. Biochem.* 82, 551–575. doi:10.1146/annurev-biochem-070511-103700
- Ho, L.W., Carmichael, J., Swartz, J., Wyttenbach, A., Rankin, J., Rubinsztein, D.C., 2001. The molecular biology of Huntington's disease. *Psychol. Med.* 31, 3–14.
- Honzík, T., Tesarová, M., Mayr, J.A., Hansíková, H., Jesina, P., Bodamer, O., Koch, J., Magner, M., Freisinger, P., Huemer, M., Kostková, O., van Coster, R., Kmoch, S., Houstek, J., Sperl, W., Zeman, J., 2010. Mitochondrial encephalocardio-myopathy with early neonatal onset due to TMEM70 mutation. *Arch. Dis. Child.* 95, 296–301.
- Houstek, J., Klement, P., Floryk, D., Antonická, H., Hermanská, J., Kalous, M., Hansíková, H., Hout'ková, H., Chowdhury, S.K., Rosipal, T., Kmoch, S., Stratilová, L., Zeman, J., 1999. A novel deficiency of mitochondrial ATPase of nuclear origin. *Hum. Mol. Genet.* 8, 1967–1974.
- Houstek, J., Mráček, T., Vojtisková, A., Zeman, J., 2004. Mitochondrial diseases and ATPase defects of nuclear origin. *Biochim. Biophys. Acta* 1658, 115–121.
- Huigsloot, M., Nijtmans, L.G., Szklarczyk, R., Baars, M.J.H., van den Brand, M.A.M., Hendriksfranssen, M.G.M., van den Heuvel, L.P., Smeitink, J.A.M., Huynen, M.A., Rodenburg, R.J.T., 2011. A mutation in C2orf64 causes impaired cytochrome c oxidase assembly and mitochondrial cardiomyopathy. *Am. J. Hum. Genet.* 88, 488–493.
- Indrieri, A., van Rahden, V.A., Tiranti, V., Morleo, M., Iaconis, D., Tammara, R., D'Amato, I., Conte, I., Maystadt, I., Demuth, S., Zvulunov, A., Kutsche, K., Zeviani, M., Franco, B., 2012. Mutations in COX7B cause microphthalmia with linear skin lesions, an unconventional mitochondrial disease. *Am. J. Hum. Genet.* 91, 942–949.
- Invernizzi, F., D'Amato, I., Jensen, P.B., Ravaglia, S., Zeviani, M., Tiranti, V., 2012. Microscale oxygraphy reveals OXPHOS impairment in MRC mutant cells. *Mitochondrion* 12, 328–335.
- Iwata, S., Lee, J.W., Okada, K., Lee, J.K., Iwata, M., Rasmussen, B., Link, T.A., Ramaswamy, S., Jap, B.K., 1998. Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc1 complex. *Science* 281, 64–71.
- Jaksch, M., Ogilvie, I., Yao, J., Kortenhaus, G., Bresser, H.G., Gerbitz, K.D., Shoubridge, E.A., 2000. Mutations in SCO2 are associated with a distinct form of hypertrophic cardiomyopathy and cytochrome c oxidase deficiency. *Hum. Mol. Genet.* 9, 795–801.
- Janssen, A.J.M., Schuelke, M., Smeitink, J.A.M., Trijbels, F.J.M., Sengers, R.C.A., Lucke, B., Wintjes, L.T.M., Morava, E., van Engelen, B.G.M., Smits, B.W., Hol, F.A., Siers, M.H., Ter Laak, H., van der Knaap, M.S., Van Spronsen, F.J., Rodenburg, R.J.T., van den Heuvel, L.P., 2008. Muscle 3243A->G mutation load and capacity of the mitochondrial energy-generating system. *Ann. Neurol.* 63, 473–481.
- Janssen, A.J.M., Trijbels, F.J.M., Sengers, R.C.A., Wintjes, L.T.M., Ruitenbeek, W., Smeitink, J.A.M., Morava, E., Engelen, B.G.M. van, Heuvel, L.P. van den, Rodenburg, R.J.T., 2006. Measurement of the Energy-Generating Capacity of Human Muscle Mitochondria: Diagnostic Procedure and Application to Human Pathology. *Clin. Chem.* 52, 860–871.
- Janssen, R.J.R.J., Nijtmans, L.G., van den Heuvel, L.P., Smeitink, J.A.M., 2006. Mitochondrial complex I: structure, function and pathology. *J. Inherit. Metab. Dis.* 29, 499–515.

- Jonckheere, A.I., Smeitink, J.A.M., Rodenburg, R.J.T., 2012. Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology. *J. Inherit. Metab. Dis.* 35, 211–225.
- Kerrigan, J.F., Aleck, K.A., Tarby, T.J., Bird, C.R., Heidenreich, R.A., 2000. Fumaric aciduria: clinical and imaging features. *Ann. Neurol.* 47, 583–588.
- Kratochvílová, H., Hejzlarová, K., Vrbacký, M., Mráček, T., Karbanová, V., Tesařová, M., Gombitová, A., Cmarko, D., Wittig, I., Zeman, J., Houštěk, J., 2014. Mitochondrial membrane assembly of TMEM70 protein. *Mitochondrion* 15, 1–9.
- Lapuate-Brun, E., Moreno-Loshuertos, R., Acín-Pérez, R., Latorre-Pellicer, A., Colás, C., Balsa, E., Perales-Clemente, E., Quirós, P.M., Calvo, E., Rodríguez-Hernández, M.A., Navas, P., Cruz, R., Carracedo, Á., López-Otín, C., Pérez-Martos, A., Fernández-Silva, P., Fernández-Vizarra, E., Enríquez, J.A., 2013. Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain. *Science* 340, 1567–1570.
- Leary, S.C., Kaufman, B.A., Pellicchia, G., Guercin, G.-H., Mattman, A., Jaksch, M., Shoubridge, E.A., 2004. Human SCO1 and SCO2 have independent, cooperative functions in copper delivery to cytochrome c oxidase. *Hum. Mol. Genet.* 13, 1839–1848.
- Lim, S.C., Smith, K.R., Stroud, D.A., Compton, A.G., Tucker, E.J., Dasvarma, A., Gandolfo, L.C., Marum, J.E., McKenzie, M., Peters, H.L., Mowat, D., Procopis, P.G., Wilcken, B., Christodoulou, J., Brown, G.K., Ryan, M.T., Bahlo, M., Thorburn, D.R., 2014. A founder mutation in PET100 causes isolated complex IV deficiency in Lebanese individuals with Leigh syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 94, 209–222.
- Loeffen, J.L., Smeitink, J.A., Trijbels, J.M., Janssen, A.J., Triepels, R.H., Sengers, R.C., van den Heuvel, L.P., 2000. Isolated complex I deficiency in children: clinical, biochemical and genetic aspects. *Hum. Mutat.* 15, 123–134.
- Logan, D.C., 2006. The mitochondrial compartment. *J. Exp. Bot.* 57, 1225–1243.
- Lönnqvist, T., Paetau, A., Valanne, L., Pihko, H., 2009. Recessive twinkle mutations cause severe epileptic encephalopathy. *Brain J. Neurol.* 132, 1553–1562.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Magner, M., Dvorakova, V., Tesarova, M., Mazurova, S., Hansikova, H., Zahorec, M., Brennerova, K., Bzduch, V., Spiegel, R., Horovitz, Y., Mandel, H., Eminoglu, F.T., Mayr, J.A., Koch, J., Martinelli, D., Bertini, E., Konstantopoulou, V., Smet, J., Rahman, S., Broomfield, A., Stojanović, V., Dionisi-Vici, C., van Coster, R., Morava, E., Morava-Kozicz, E., Sperl, W., Zeman, J., Honzik, T., 2015. TMEM70 deficiency: long-term outcome of 48 patients. *J. Inherit. Metab. Dis.* 38, 417–426.
- Marková, M., 2015. Expres vybraných defektů oxidativní fosforylace na úrovni kultivovaných fibroblastů (Diplomová práce). Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Praha.
- Massa, V., Fernandez-Vizarra, E., Alshahwan, S., Bakhsh, E., Goffrini, P., Ferrero, I., Mereghetti, P., D'Adamo, P., Gasparini, P., Zeviani, M., 2008. Severe Infantile Encephalomyopathy Caused by a Mutation in COX6B1, a Nucleus-Encoded Subunit of Cytochrome C Oxidase. *Am. J. Hum. Genet.* 82, 1281–1289.
- Mayr, J.A., Haack, T.B., Freisinger, P., Karall, D., Makowski, C., Koch, J., Feichtinger, R.G., Zimmermann, F.A., Rolinski, B., Ahting, U., Meitinger, T., Prokisch, H., Sperl, W., 2015. Spectrum of combined respiratory chain defects. *J. Inherit. Metab. Dis.* 38, 629–640.
- McFarland, K.N., Cha, J.-H.J., 2011. Molecular biology of Huntington's disease. *Handb. Clin. Neurol.* 100, 25–81.

- McKinstry, S.U., Karadeniz, Y.B., Worthington, A.K., Hayrapetyan, V.Y., Ozlu, M.I., Serafin-Molina, K., Risher, W.C., Ustunkaya, T., Dragatsis, I., Zeitlin, S., Yin, H.H., Eroglu, C., 2014. Huntingtin is required for normal excitatory synapse development in cortical and striatal circuits. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 34, 9455–9472.
- Melchionda, L., Haack, T.B., Hardy, S., Abbink, T.E.M., Fernandez-Vizarra, E., Lamantea, E., Marchet, S., Morandi, L., Moggio, M., Carozzo, R., Torraco, A., Diodato, D., Strom, T.M., Meitinger, T., Tekturk, P., Yapici, Z., Al-Murshedi, F., Stevens, R., Rodenburg, R.J., Lamperti, C., Ardissone, A., Moroni, I., Uziel, G., Prokisch, H., Taylor, R.W., Bertini, E., van der Knaap, M.S., Ghezzi, D., Zeviani, M., 2014. Mutations in APOPT1, encoding a mitochondrial protein, cause cavitating leukoencephalopathy with cytochrome c oxidase deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* 95, 315–325.
- Mineri, R., Rimoldi, M., Burlina, A.B., Koskull, S., Perletti, C., Heese, B., von Döbeln, U., Mereghetti, P., Di Meo, I., Invernizzi, F., Zeviani, M., Uziel, G., Tiranti, V., 2008. Identification of new mutations in the ETHE1 gene in a cohort of 14 patients presenting with ethylmalonic encephalopathy. *J. Med. Genet.* 45, 473–478.
- Mootha, V.K., Lepage, P., Miller, K., Bunkenborg, J., Reich, M., Hjerrild, M., Delmonte, T., Villeneuve, A., Sladek, R., Xu, F., Mitchell, G.A., Morin, C., Mann, M., Hudson, T.J., Robinson, B., Rioux, J.D., Lander, E.S., 2003. Identification of a gene causing human cytochrome c oxidase deficiency by integrative genomics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 605–610.
- Mroch, A.R., Laudenschlager, M., Flanagan, J.D., 2012. Detection of a novel FH whole gene deletion in the propositus leading to subsequent prenatal diagnosis in a sibship with fumarase deficiency. *Am. J. Med. Genet. A.* 158A, 155–158.
- Nelson, D.L., Cox, M.M., Lehninger, A.L., 2008. *Lehninger principles of biochemistry.* Freeman, New York, NY [u.a].
- Nicholls, D.G., 2009. Mitochondrial calcium function and dysfunction in the central nervous system. *Biochim. Biophys. Acta* 1787, 1416–1424.
- Nishigaki, Y., Martí, R., Copeland, W.C., Hirano, M., 2003. Site-specific somatic mitochondrial DNA point mutations in patients with thymidine phosphorylase deficiency. *J. Clin. Invest.* 111, 1913–1921.
- Oquendo, C.E., Antonicka, H., Shoubridge, E.A., Reardon, W., Brown, G.K., 2004. Functional and genetic studies demonstrate that mutation in the COX15 gene can cause Leigh syndrome. *J. Med. Genet.* 41, 540–544.
- Ostergaard, E., Weraarpachai, W., Ravn, K., Born, A.P., Jønson, L., Duno, M., Wibrand, F., Shoubridge, E.A., Vissing, J., 2015. Mutations in COA3 cause isolated complex IV deficiency associated with neuropathy, exercise intolerance, obesity, and short stature. *J. Med. Genet.* 52, 203–207.
- Palade, G.E., 1952. The fine structure of mitochondria. *Anat. Rec.* 114, 427–451.
- Panov, A.V., Gutekunst, C.-A., Leavitt, B.R., Hayden, M.R., Burke, J.R., Strittmatter, W.J., Greenamyre, J.T., 2002. Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines. *Nat. Neurosci.* 5, 731–736.
- Pitceathly, R.D.S., Rahman, S., Wedatilake, Y., Polke, J.M., Cirak, S., Foley, A.R., Sailer, A., Hurler, M.E., Stalker, J., Hargreaves, I., Woodward, C.E., Sweeney, M.G., Muntoni, F., Houlden, H., Taanman, J.-W., Hanna, M.G., UK10K Consortium, 2013. NDUFA4 mutations underlie dysfunction of a cytochrome c oxidase subunit linked to human neurological disease. *Cell Rep.* 3, 1795–1805. doi:10.1016/j.celrep.2013.05.005
- Quinzii, C.M., Hirano, M., 2010. Coenzyme Q and mitochondrial disease. *Dev. Disabil. Res. Rev.* 16, 183–188.

- Robertson, D.E., Ding, H., Chelminski, P.R., Slaughter, C., Hsu, J., Moomaw, C., Tokito, M., Daldal, F., Dutton, P.L., 1993. Hydroubiquinone-cytochrome c2 oxidoreductase from *Rhodobacter capsulatus*: definition of a minimal, functional isolated preparation. *Biochemistry (Mosc.)* 32, 1310–1317.
- Rodenburg, R.J.T., 2011. Biochemical diagnosis of mitochondrial disorders. *J. Inherit. Metab. Dis.* 34, 283–292.
- Rustin, P., Chretien, D., Bourgeron, T., Gérard, B., Rötig, A., Saudubray, J.M., Munnich, A., 1994. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 228, 35–51.
- Schaefer, A.M., Taylor, R.W., Turnbull, D.M., Chinnery, P.F., 2004. The epidemiology of mitochondrial disorders--past, present and future. *Biochim. Biophys. Acta* 1659, 115–120.
- Schägger, H., 2001. Respiratory chain supercomplexes. *IUBMB Life* 52, 119–128.
- Schägger, H., de Coo, R., Bauer, M.F., Hofmann, S., Godinot, C., Brandt, U., 2004. Significance of respirasomes for the assembly/stability of human respiratory chain complex I. *J. Biol. Chem.* 279, 36349–36353.
- Schapira, A.H.V., 2002. Primary and secondary defects of the mitochondrial respiratory chain. *J. Inherit. Metab. Dis.* 25, 207–214.
- Sharp, A.H., Loev, S.J., Schilling, G., Li, S.H., Li, X.J., Bao, J., Wagster, M.V., Kotzuk, J.A., Steiner, J.P., Lo, A., 1995. Widespread expression of Huntington's disease gene (IT15) protein product. *Neuron* 14, 1065–1074.
- Shirendeb, U., Reddy, A.P., Manczak, M., Calkins, M.J., Mao, P., Tagle, D.A., Reddy, P.H., 2011. Abnormal mitochondrial dynamics, mitochondrial loss and mutant huntingtin oligomers in Huntington's disease: implications for selective neuronal damage. *Hum. Mol. Genet.* 20, 1438–1455.
- Shoubridge, E.A., 2001. Cytochrome c oxidase deficiency. *Am. J. Med. Genet.* 106, 46–52.
- Shteyer, E., Saada, A., Shaag, A., Al-Hijawi, F.A., Kidess, R., Revel-Vilk, S., Elpeleg, O., 2009. Exocrine pancreatic insufficiency, dyserythropoietic anemia, and calvarial hyperostosis are caused by a mutation in the COX4I2 gene. *Am. J. Hum. Genet.* 84, 412–417.
- Sleigh, A., Raymond-Barker, P., Thackray, K., Porter, D., Hatunic, M., Vottero, A., Burren, C., Mitchell, C., McIntyre, M., Brage, S., Carpenter, T.A., Murgatroyd, P.R., Brindle, K.M., Kemp, G.J., O'Rahilly, S., Semple, R.K., Savage, D.B., 2011. Mitochondrial dysfunction in patients with primary congenital insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 121, 2457–2461.
- Smeitink, J.A.M., Elpeleg, O., Antonicka, H., Diepstra, H., Saada, A., Smits, P., Sasarman, F., Vriend, G., Jacob-Hirsch, J., Shaag, A., Rechavi, G., Welling, B., Horst, J., Rodenburg, R.J., van den Heuvel, B., Shoubridge, E.A., 2006. Distinct clinical phenotypes associated with a mutation in the mitochondrial translation elongation factor EFTs. *Am. J. Hum. Genet.* 79, 869–877.
- Song, W., Chen, J., Petrilli, A., Liot, G., Klinglmayr, E., Zhou, Y., Poquiz, P., Tjong, J., Pouladi, M.A., Hayden, M.R., Masliah, E., Ellisman, M., Rouiller, I., Schwarzenbacher, R., Bossy, B., Perkins, G., Bossy-Wetzel, E., 2011. Mutant huntingtin binds the mitochondrial fission GTPase dynamin-related protein-1 and increases its enzymatic activity. *Nat. Med.* 17, 377–382.
- Sperl, W., Jesina, P., Zeman, J., Mayr, J.A., Demeirleir, L., VanCoster, R., Pícková, A., Hansíková, H., Houst'ková, H., Krejčík, Z., Koch, J., Smet, J., Muss, W., Holme, E.,

- Houstek, J., 2006. Deficiency of mitochondrial ATP synthase of nuclear genetic origin. *Neuromuscul. Disord.* NMD 16, 821–829.
- Srere, P.A., 1969. [1] Citrate synthase: [EC 4.1.3.7. Citrate oxaloacetate-lyase (CoA-acetylating)], in: Lowenstein, J.M. (Ed.), *Methods in Enzymology, Citric Acid Cycle*. Academic Press, pp. 3–11.
- Srinivasan, S., Avadhani, N.G., 2012. Cytochrome c oxidase dysfunction in oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 53, 1252–1263.
- Stiburek, L., Hansikova, H., Tesarova, M., Cerna, L., Zeman, J., 2006. Biogenesis of eukaryotic cytochrome c oxidase. *Physiol. Res. Acad. Sci. Bohemoslov.* 55 Suppl 2, S27-41.
- Stiburek, L., Vesela, K., Hansikova, H., Hulkova, H., Zeman, J., 2009. Loss of function of Sco1 and its interaction with cytochrome c oxidase. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 296, C1218-1226.
- Stiburek, L., Vesela, K., Hansikova, H., Pecina, P., Tesarova, M., Cerna, L., Houstek, J., Zeman, J., 2005. Tissue-specific cytochrome c oxidase assembly defects due to mutations in SCO2 and SURF1. *Biochem. J.* 392, 625–632. doi:10.1042/BJ20050807
- Sun, F., Huo, X., Zhai, Y., Wang, A., Xu, J., Su, D., Bartlam, M., Rao, Z., 2005. Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell* 121, 1043–1057.
- Szigeti, K., Wong, L.-J.C., Perng, C.-L., Saifi, G.M., Eldin, K., Adesina, A.M., Cass, D.L., Hirano, M., Lupski, J.R., Scaglia, F., 2004. MNGIE with lack of skeletal muscle involvement and a novel TP splice site mutation. *J. Med. Genet.* 41, 125–129.
- Tamiya, G., Makino, S., Hayashi, M., Abe, A., Numakura, C., Ueki, M., Tanaka, A., Ito, C., Toshimori, K., Ogawa, N., Terashima, T., Maegawa, H., Yanagisawa, D., Tooyama, I., Tada, M., Onodera, O., Hayasaka, K., 2014. A mutation of COX6A1 causes a recessive axonal or mixed form of Charcot-Marie-Tooth disease. *Am. J. Hum. Genet.* 95, 294–300.
- Telenius, H., Kremer, H.P., Theilmann, J., Andrew, S.E., Almqvist, E., Anvret, M., Greenberg, C., Greenberg, J., Lucotte, G., Squitieri, F., 1993. Molecular analysis of juvenile Huntington disease: the major influence on (CAG)<sub>n</sub> repeat length is the sex of the affected parent. *Hum. Mol. Genet.* 2, 1535–1540.
- Tiranti, V., Hoertnagel, K., Carozzo, R., Galimberti, C., Munaro, M., Granatiero, M., Zelante, L., Gasparini, P., Marzella, R., Rocchi, M., Bayona-Bafaluy, M.P., Enriquez, J.A., Uziel, G., Bertini, E., Dionisi-Vici, C., Franco, B., Meitinger, T., Zeviani, M., 1998. Mutations of SURF-1 in Leigh disease associated with cytochrome c oxidase deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* 63, 1609–1621.
- Tiranti, V., Viscomi, C., Hildebrandt, T., Di Meo, I., Mineri, R., Tiveron, C., Levitt, M.D., Prella, A., Fagiolari, G., Rimoldi, M., Zeviani, M., 2009. Loss of ETHE1, a mitochondrial dioxygenase, causes fatal sulfide toxicity in ethylmalonic encephalopathy. *Nat. Med.* 15, 200–205.
- Tseng, Y.-H., Cypess, A.M., Kahn, C.R., 2010. Cellular bioenergetics as a target for obesity therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9, 465–482.
- Turunen, M., Olsson, J., Dallner, G., 2004. Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochim. Biophys. Acta* 1660, 171–199.
- Valnot, I., Osmond, S., Gigarel, N., Mehaye, B., Amiel, J., Cormier-Daire, V., Munnich, A., Bonnefont, J.P., Rustin, P., Rötig, A., 2000a. Mutations of the SCO1 gene in mitochondrial cytochrome c oxidase deficiency with neonatal-onset hepatic failure and encephalopathy. *Am. J. Hum. Genet.* 67, 1104–1109.



- Valnot, I., von Kleist-Retzow, J.C., Barrientos, A., Gorbatyuk, M., Taanman, J.W., Mehaye, B., Rustin, P., Tzagoloff, A., Munnich, A., Rötig, A., 2000b. A mutation in the human heme A:farnesyltransferase gene (COX10) causes cytochrome c oxidase deficiency. *Hum. Mol. Genet.* 9, 1245–1249.
- Valsecchi, F., Koopman, W.J.H., Manjeri, G.R., Rodenburg, R.J., Smeitink, J.A.M., Willems, P.H.G.M., 2010. Complex I disorders: Causes, mechanisms, and development of treatment strategies at the cellular level. *Dev. Disabil. Res. Rev.* 16, 175–182.
- van den Heuvel, L., Smeitink, J., 2001. The oxidative phosphorylation (OXPHOS) system: nuclear genes and human genetic diseases. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 23, 518–525.
- Venditti, P., Di Stefano, L., Di Meo, S., 2013. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Mitochondrion* 13, 71–82.
- Vesela, K., Hansikova, H., Tesarova, M., Martasek, P., Elleder, M., Houstek, J., Zeman, J., 2004. Clinical, biochemical and molecular analyses of six patients with isolated cytochrome c oxidase deficiency due to mutations in the SCO2 gene. *Acta Paediatr. Oslo Nor.* 1992 93, 1312–1317.
- Wang, H., Lim, P.J., Karbowski, M., Monteiro, M.J., 2009. Effects of overexpression of huntingtin proteins on mitochondrial integrity. *Hum. Mol. Genet.* 18, 737–752.
- Watt, I.N., Montgomery, M.G., Runswick, M.J., Leslie, A.G.W., Walker, J.E., 2010. Bioenergetic cost of making an adenosine triphosphate molecule in animal mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 16823–16827.
- Weraarpachai, W., Antonicka, H., Sasarman, F., Seeger, J., Schrank, B., Kolesar, J.E., Lochmüller, H., Chevrette, M., Kaufman, B.A., Horvath, R., Shoubridge, E.A., 2009. Mutation in TACO1, encoding a translational activator of COX I, results in cytochrome c oxidase deficiency and late-onset Leigh syndrome. *Nat. Genet.* 41, 833–837.
- Weraarpachai, W., Sasarman, F., Nishimura, T., Antonicka, H., Auré, K., Rötig, A., Lombès, A., Shoubridge, E.A., 2012. Mutations in C12orf62, a Factor that Couples COX I Synthesis with Cytochrome c Oxidase Assembly, Cause Fatal Neonatal Lactic Acidosis. *Am. J. Hum. Genet.* 90, 142–151.
- Winge, D.R., 2012. Sealing the mitochondrial respirasome. *Mol. Cell. Biol.* 32, 2647–2652.
- Yang, D., Oyaizu, Y., Oyaizu, H., Olsen, G.J., Woese, C.R., 1985. Mitochondrial origins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 4443–4447.
- Yu-Wai-Man, P., Sitarz, K.S., Samuels, D.C., Griffiths, P.G., Reeve, A.K., Bindoff, L.A., Horvath, R., Chinnery, P.F., 2010. OPA1 mutations cause cytochrome c oxidase deficiency due to loss of wild-type mtDNA molecules. *Hum. Mol. Genet.* 19, 3043–3052.
- Zanna, C., Ghelli, A., Porcelli, A.M., Karbowski, M., Youle, R.J., Schimpf, S., Wissinger, B., Pinti, M., Cossarizza, A., Vidoni, S., Valentino, M.L., Rugolo, M., Carelli, V., 2008. OPA1 mutations associated with dominant optic atrophy impair oxidative phosphorylation and mitochondrial fusion. *Brain J. Neurol.* 131, 352–367.

### **Internetové zdroje:**

www.omim.org

## 9. Přílohy

**Příloha 1: Naměřené hodnoty analýzy KMEM (kapacity mitochondriálního energetického metabolismu) u kontrolních linií K1–K8.**

pacient		K1		K2	K3		K4		K5		K6		K7		K8		
věk		kojenec do 1 roku														do 2 let	
pasáž		8	9	15	6	6	8	8	7	8	10	10	13	13	14	14	
koncentrace proteinu [mg/ml]		7,24	6,77	11,64	7,98	9,74	8,07	12,42	7,84	10,29	6,26	9,01	8,2	7,44	6,55	6,74	
aktivita CS [nmol/min/mg]		58,2	57,4	47,4	60	62,3	67,24	48,58	31,33	26,9	28	30,4	31,91	31,21	38	32	
KMEM inkubace [ <sup>14</sup> CO <sub>2</sub> /min/mg prot]	1	182	184	112	116	129	49	35	42	55	71	69	32	38	49	38	
	2	123	228	102	92	98	41	33	32	45	67	59	28	36	39	35	
	3	159	95	118	104	113	48	36	30	43	67	59	32	42	40	30	
	4	215	248	268	144	152	88	72	92	97	125	132	36	46	70	46	
	4a	139	169	138	107	106	51	43	40	45	57	67	35	52	50	36	
	5	175	202	77	116	122	43	41	37	26	90	110	30	46	61	44	
	6	6	6	23	10	8	3	5	14	2	4	3	3	3	4	3	
	7	4	7	12	10	10	7	3	10	3	5	2	3	4	5	6	
	8	4	4	13	8	7	4	17	3	2	7	2	3	2	4	4	
9	7	10	38	4	16	7	1	6	4	13	8	10	6	6	4		
normalizace KMEM inkubací/CS	1/CS	3,13	3,21	2,36	1,94	2,07	0,73	0,73	1,33	2,03	2,54	2,26	1,01	1,22	1,30	1,17	
	2/CS	2,12	3,97	2,16	1,53	1,57	0,61	0,68	1,02	1,69	2,41	1,94	0,88	1,15	1,02	1,11	
	3/CS	2,73	1,66	2,49	1,74	1,82	0,71	0,73	0,95	1,61	2,41	1,95	0,99	1,34	1,04	0,93	
	4/CS	3,69	4,32	5,66	2,41	2,44	1,31	1,47	2,94	3,60	4,45	4,35	1,11	1,48	1,85	1,44	
	4a/CS	2,39	2,94	2,91	1,78	1,70	0,75	0,88	1,26	1,68	2,04	2,19	1,10	1,67	1,32	1,11	
	5/CS	3,01	3,51	1,62	1,93	1,95	0,64	0,85	1,19	0,98	3,20	3,62	0,95	1,46	1,59	1,38	
	6/CS	0,10	0,11	0,49	0,16	0,13	0,04	0,10	0,44	0,07	0,13	0,09	0,09	0,11	0,10	0,10	
	7/CS	0,07	0,11	0,25	0,17	0,16	0,11	0,06	0,31	0,10	0,18	0,07	0,09	0,11	0,14	0,18	
	8/CS	0,08	0,07	0,27	0,13	0,11	0,05	0,35	0,09	0,09	0,24	0,08	0,10	0,08	0,09	0,12	
9/CS	0,12	0,17	0,79	0,06	0,26	0,11	0,03	0,18	0,16	0,47	0,25	0,30	0,19	0,16	0,12		

Vysvětlení zkratk: CS citrátsyntáza, K kontrola, prot protein. Složení inkubací analýzy KMEM: 1 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP, 2 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + karnitin + ADP, 3 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát - ADP, 4 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát - ADP + CCCP, 4a [1-<sup>14</sup>C] pyruvát - karnitin + ADP, 5 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP + atraktylosid, 6 [U-<sup>14</sup>C] malát + pyruvát + malonát + ADP, 7 [U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + malonát + ADP, 8 [U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + arsenit + ADP, 9 [1,4-<sup>14</sup>C] sukcinát + acetylkarnitin + ADP

**Příloha 2: Naměřené hodnoty analýzy KMEM (kapacity mitochondriálního energetického metabolismu) u kontrolních linií K9–K15.**

pacient	K9		K10		K11		K12		K13			K14	K15		
věk	do 3 let		do 4 let		26 let		28 let		29 let			38 let	49 let		
pasáž	10	10	10	10	11	11	8	13	12	12	12	10	13	14	
koncentrace proteinu [mg/ml]	9,89	6,56	8,87	8,01	5,67	8,69	10,72	3,65	5,72	8,19	6,94	6,11	5,63	6,48	
aktivita CS [nmol/min/mg]	36,03	38,9	28,2	28,1	56	34	49,4	58,69	64,27	57,46	72,22	52,73	39,5	46,1	
KMEM inkubace [ <sup>14</sup> C]CO <sub>2</sub> /min/mg prot]	1	48	31	62	49	44	58	22	13	62	49	76	82	55	57
	2	28	31	48	46	43	47	24	12	41	77	59	55	30	49
	3	32	29	58	48	44	69	28	7	37	32	487	31	36	17
	4	89	80	75	60	95	97	52	110	150	150	150	55	54	43
	4a	33	19	49	53	67	60	22	14	34	60	61	35	44	45
	5	30	30	52	53	81	66	17	20	37	57	72	25	43	44
	6	2	3	4	4	5	3	2	13	3	2	6	5	8	7
	7	4	4	3	4	10	6	7	16	7	5	8	14	6	8
	8	2	7	3	3	5	6	4	10	4	2	3	7	10	5
9	11	5	7	1	8	5	5	34	11	7	14	4	17	11	
normalizace KMEM inkubací/CS	1/CS	1,33	0,79	2,19	1,74	0,78	1,71	0,45	0,22	0,97	0,85	1,06	1,55	1,38	1,23
	2/CS	0,79	0,80	1,70	1,63	0,77	1,37	0,49	0,20	0,64	1,33	0,82	1,05	0,75	1,07
	3/CS	0,89	0,74	2,05	1,71	0,79	2,02	0,57	0,12	0,58	0,56	0,82	0,60	0,92	0,38
	4/CS	2,47	2,06	2,66	2,14	1,69	2,85	1,05	1,87	1,54	4,44	2,08	1,05	1,37	0,94
	4a/CS	0,92	0,48	1,74	1,88	1,19	1,77	0,44	0,23	0,53	1,05	0,84	0,67	1,12	0,98
	5/CS	0,84	0,77	1,83	1,88	1,45	1,95	0,34	0,35	0,58	0,99	0,99	0,48	1,09	0,95
	6/CS	0,06	0,08	0,16	0,13	0,10	0,08	0,04	0,23	0,05	0,04	0,08	0,10	0,21	0,16
	7/CS	0,11	0,11	0,11	0,14	0,18	0,18	0,13	0,27	0,12	0,10	0,11	0,26	0,16	0,18
	8/CS	0,07	0,17	0,10	0,12	0,08	0,18	0,08	0,17	0,07	0,03	0,04	0,14	0,26	0,10
9/CS	0,30	0,12	0,26	0,05	0,14	0,13	0,10	0,58	0,17	0,12	0,19	0,07	0,44	0,23	

Vysvětlení zkratk: CS citrát syntáza, K kontrola, prot protein. Složení inkubací analýzy KMEM: 1 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP, 2 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + karnitin + ADP, 3 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát - ADP, 4 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát - ADP + CCCP, 4a [1-<sup>14</sup>C] pyruvát - karnitin + ADP, 5 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP + atraktylosid, 6 [U-<sup>14</sup>C] malát + pyruvát + malonát + ADP, 7 [U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + malonát + ADP, 8 [U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + arsenit + ADP, 9 [1,4-<sup>14</sup>C] sukcinát + acetylkarnitin + ADP

**Příloha 3: Hodnoty poměrů inkubační analýzy KMEM (kapacity mitochondriálního energetického metabolismu) u kontrolních linií K1–K8.**

pacient		K1		K2		K3		K4		K5		K6		K7		K8	
mutace v genu/kontrola		kojenec do 1 roku														do 2 let	
poměry inkubační KMEM	(1/3)	1,15	1,94	0,95	1,12	1,14	1,03	0,99	1,40	1,27	1,05	1,16	1,02	0,92	1,24	1,27	
	(2/1)	0,68	1,24	0,91	0,79	0,76	0,83	0,94	0,77	0,83	0,95	0,86	0,87	0,94	0,78	0,94	
	(4/1)	1,18	1,35	2,4	1,24	1,17	1,79	2,03	2,21	1,77	1,75	1,92	1,10	1,21	1,42	1,22	
	(3/5)	0,91	0,47	1,53	0,90	0,93	1,11	0,86	0,80	1,65	0,75	0,54	1,04	0,91	0,66	0,67	
	(6/1)	0,03	0,03	0,21	0,08	0,06	0,06	0,13	0,33	0,04	0,05	0,04	0,09	0,09	0,08	0,09	
	(7/6)	0,72	1,07	0,52	1,05	1,22	2,50	0,61	0,71	1,44	1,38	0,78	0,96	1,07	1,30	1,77	
	(7/8)	0,96	1,74	0,92	1,31	1,44	2,07	0,17	3,32	1,19	0,76	0,91	0,93	1,46	1,47	1,58	

Vysvětlení zkratk: K kontrola. Složení inkubační analýzy KMEM: 1 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP, 2 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + karnitin + ADP, 3 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát – ADP, 4 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát – ADP + CCCP, 5 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP + atraktylosid, 6 [U-<sup>14</sup>C] malát + pyruvát + malonát + ADP, 7 [U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + malonát + ADP, 8 [U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + arsenit + ADP

**Příloha 4: Hodnoty poměrů inkubační analýzy KMEM (kapacity mitochondriálního energetického metabolismu) u kontrolních linií K9–K15.**

pacient		K9		K10		K11		K12		K13			K14	K15	
mutace v genu/kontrola		do 3 let		do 4 let		26 let		28 let		29 let			38 let	49 let	
poměry inkubační KMEM	(1/3)	1,49	1,06	1,07	1,02	0,99	0,85	0,78	1,84	1,67	1,53	0,16	2,60	1,51	3,27
	(2/1)	0,59	1,01	0,78	0,94	0,99	0,80	1,08	0,95	0,66	1,57	0,77	0,68	0,54	0,87
	(4/1)	1,87	2,62	1,21	1,23	2,16	1,67	2,34	2,34	1,97	1,97	1,97	0,67	0,99	0,77
	(3/5)	1,07	0,96	1,12	0,91	0,55	1,03	1,68	0,34	1,00	0,57	6,79	1,23	0,84	0,39
	(6/1)	0,05	0,10	0,07	0,07	0,12	0,05	0,09	0,09	0,05	0,04	0,07	0,06	0,16	0,13
	(7/6)	1,72	1,39	0,72	1,09	1,87	2,19	3,18	1,21	2,54	2,53	1,46	2,71	0,75	1,12
	(7/8)	1,58	0,66	1,10	1,19	2,26	0,98	1,67	1,60	1,72	2,88	2,95	1,86	0,62	1,74

Vysvětlení zkratk: K kontrola. Složení inkubační analýzy KMEM: 1 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP, 2 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + karnitin + ADP, 3 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát – ADP, 4 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát – ADP + CCCP, 5 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP + atraktylosid, 6 [U-<sup>14</sup>C] malát + pyruvát + malonát + ADP, 7 [U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + malonát + ADP, 8 [U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + arsenit + ADP

**Příloha 5: Naměřené hodnoty analýzy analýzy KMEM (kapacity mitochondriálního energetického metabolismu) u pacientů s deficitem KI (P1–P7) a srovnání s průměrnou hodnotou KMEM kontrol K1–K10.**

pacient	P1		P2		P3		P4	P5		P6		P7					
věk	6 měsíců		10 měsíců		7 měsíců		10 let	3 roky		12 let		2 roky					
mutace v genu	ND1				ND3		ND5										
pasáž	11	12	13	14	14	9	9	14	8	11	10	12	13	13			
konzentrace proteinu [mg/ml]	8,97	9,3	8,75	5,5	7,57	7,98	3,76	5,93	12,01	13,37	9,26	9,04	10,96	6,83			
aktivita CS [nmol/min/mg]	56	58,2	62,3	31,36	25,54	40,11	48,08	39,56	46,7	36	36,59	55,3	24,73	23,33	průměr K1–K10	SD	
KMEM inkubace [ <sup>14</sup> C <sub>2</sub> /min/mg prot]	1	65	29	58	54	67	18	29	25	44	40	50	47	39	46	74,31	49,55
	2	45	43	46	52	68	18	34	24	35	32	31	38	42	74	65,85	46,32
	3	45	28	29	34	55	12	38	23	32	37	26	41	39	43	64,85	38,12
	4	96	125	91	118	130	42	41	57	73	74	71	80	90	154	119,70	75,89
	4a	38	35	27	95	65	12	45	36	42	39	41	51	42	63	70,52	45,76
	5	47	37	42	97	64	19	30	16	31	42	35	41	37	67	73,03	50,20
	6	4	5	6	3	3	2	4	4	4	7	4	4	3	7	4,85	2,16
	7	5	4	7	3	2	3	6	10	4	7	5	6	2	4	5,22	2,04
	8	9	6	8	3	5	3	4	5	4	6	4	6	3	4	4,99	2,57
9	8	7	7	6	5	5	5	8	11	9	11	7	4	12	6,66	2,49	
normalizace KMEM inkubací/CS	1/CS	1,17	0,49	0,93	1,70	2,61	0,45	0,61	0,64	0,95	1,10	1,37	0,85	1,57	1,99	1,58	0,78
	2/CS	0,80	0,74	0,74	1,63	2,67	0,45	0,72	0,60	0,75	0,89	0,83	0,69	1,70	3,16	1,40	0,74
	3/CS	0,80	0,49	0,46	1,07	2,14	0,30	0,79	0,59	0,68	1,02	0,72	0,74	1,56	1,86	1,40	0,63
	4/CS	1,71	2,15	1,46	3,74	5,08	1,04	0,85	1,44	1,56	2,05	1,93	1,44	3,64	6,58	2,55	1,37
	4a/CS	0,69	0,61	0,44	3,00	2,55	0,29	0,95	0,91	0,91	1,08	1,11	0,92	1,71	2,69	1,51	0,78
	5/CS	0,84	0,64	0,68	3,05	2,52	0,48	0,63	0,41	0,67	1,16	0,95	0,73	1,51	2,85	1,56	0,83
	6/CS	0,08	0,08	0,10	0,08	0,12	0,04	0,08	0,10	0,08	0,20	0,10	0,07	0,12	0,29	0,11	0,03
	7/CS	0,08	0,07	0,11	0,11	0,08	0,06	0,12	0,27	0,08	0,20	0,14	0,11	0,10	0,17	0,11	0,03
	8/CS	0,16	0,10	0,13	0,10	0,18	0,08	0,09	0,13	0,10	0,16	0,11	0,10	0,12	0,19	0,11	0,04
9/CS	0,15	0,12	0,12	0,18	0,20	0,11	0,10	0,21	0,23	0,25	0,30	0,12	0,15	0,49	0,15	0,07	

Vysvětlení zkratk: CS citrátsyntáza, K kontrola, P pacient, prot protein, SD směrodatná odchylka. Složení inkubací analýzy KMEM:

1 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP, 2 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + karnitin + ADP, 3 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát - ADP, 4 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát - ADP + CCCP,

4a [1-<sup>14</sup>C] pyruvát - karnitin + ADP, 5 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP + atraktylosid, 6 [U-<sup>14</sup>C] malát + pyruvát + malonát + ADP,

7 [U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + malonát + ADP, 8 [U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + arsenit + ADP, 9 [1,4-<sup>14</sup>C] sukcinát + acetylkarnitin + ADP

**Příloha 6: Hodnoty poměrů inkubací analýzy KMEM (kapacity mitochondriálního energetického metabolismu) u pacientů s deficitem KI (P1–P7) a srovnání s průměrnou hodnotou poměrů kontrol K1–K10.**

pacient		P1		P2		P3		P4	P5		P6		P7		průměr K1–K10	SD	
mutace v genu/kontrola		ND1				ND3		ND5									
poměry inkubací KMEM	(1/3)	1,46	1,00	2,02	1,59	1,22	1,50	0,77	1,07	1,40	1,08	1,92	1,14	1,00	1,07	1,14	0,19
	(2/1)	0,68	1,51	0,79	0,96	1,02	1,00	1,17	0,94	0,79	0,81	0,61	0,81	1,08	1,59	0,89	0,07
	(4/1)	1,46	4,38	1,57	2,20	1,95	2,31	1,40	2,27	1,64	1,86	1,41	1,69	2,32	3,31	1,69	0,54
	(3/5)	0,96	0,76	0,68	0,35	0,85	0,62	1,26	1,45	1,02	0,88	0,76	1,01	1,04	0,65	0,96	0,27
	(6/1)	0,07	0,16	0,11	0,05	0,05	0,09	0,13	0,16	0,09	0,18	0,08	0,09	0,08	0,15	0,10	0,06
	(7/6)	1,04	0,87	1,08	1,30	0,68	1,53	1,50	2,53	1,01	1,04	1,38	1,48	0,79	0,57	1,11	0,32
	(7/8)	0,52	0,71	0,87	1,05	0,45	0,79	1,36	2,06	0,88	1,25	1,27	1,06	0,78	0,89	1,24	0,44

Vysvětlení zkratk: K kontrola, P pacient, SD směrodatná odchylka. Složení inkubací analýzy KMEM: 1 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP, 2 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + karnitin + ADP, 3 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát – ADP, 4 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát – ADP + CCCP, 5 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP + atraktylosid, 6 [U-<sup>14</sup>C] malát + pyruvát + malonát + ADP, 7 [U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + malonát + ADP, 8 [U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + arsenit + ADP

**Příloha 7: Naměřené hodnoty analýzy analýzy KMEM (kapacity mitochondriálního energetického metabolismu) u pacientů s deficitem KI (P8 a P9) a srovnání s průměrnou hodnotou KMEM kontrol K11–K15.**

pacient		P8	P9				
věk		35 let	17 let				
mutace v genu		ND5					
pasáž		7	9	9			
koncentrace proteinu [mg/ml]		9,28	5,4	5,7			
aktivita CS [nmol/min/mg]		37	33	26,64	průměr K11–K15	SD	
KMEM inkubace [ <sup>14</sup> C]CO <sub>2</sub> /min/mg prot]	1	56	53	51	53,67	23,40	
	2	43	49	69	43,31	16,16	
	3	28	44	55	33,39	14,41	
	4	90	101	92	86,11	40,51	
	4a	59	33	45	42,55	17,29	
	5	45	37	55	43,33	22,37	
	6	7	7	8	5,53	1,84	
	7	10	5	10	9,66	2,78	
	8	6	6	6	5,48	1,78	
normalizace KMEM inkubací/CS	1/CS	1,52	1,59	1,90	1,08	0,47	
	2/CS	1,17	1,48	2,60	0,86	0,30	
	3/CS	0,77	1,33	2,07	0,73	0,40	
	4/CS	2,44	3,05	3,47	1,72	0,72	
	4a/CS	1,58	0,99	1,70	0,87	0,43	
	5/CS	1,21	1,11	2,05	0,88	0,53	
	6/CS	0,18	0,21	0,31	0,11	0,04	
	7/CS	0,28	0,15	0,39	0,19	0,05	
	8/CS	0,15	0,17	0,23	0,11	0,04	
9/CS	0,12	0,38	0,73	0,21	0,12		

Vysvětlení zkratk: CS citrát syntáza, K kontrola, P pacient, prot protein, SD směrodatná odchylka.  
 Složení inkubací analýzy KMEM: 1 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP, 2 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + karnitin + ADP, 3 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát - ADP, 4 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát - ADP + CCCP, 4a [1-<sup>14</sup>C] pyruvát - karnitin + ADP, 5 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP + atraktylosid, 6 [U-<sup>14</sup>C] malát + pyruvát + malonát + ADP, 7 [U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + malonát + ADP, 8 [U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + arsenit + ADP, 9 [1,4-<sup>14</sup>C] sukcinát + acetylkarnitin + ADP

**Příloha 8: Hodnoty poměrů inkubací analýzy KMEM (kapacity mitochondriálního energetického metabolismu) u pacientů s deficitem KI (P8–P9) a srovnání s průměrnou hodnotou poměrů kontrol K11–K15.**

pacient		P8	P9		průměr K11–K15	SD
mutace v genu/kontrola		ND5				
poměry inkubací KMEM	(1/3)	1,98	1,20	0,92	1,76	0,71
	(2/1)	0,77	0,93	1,37	0,86	0,16
	(4/1)	1,60	1,92	1,82	1,55	0,73
	(3/5)	0,64	1,20	1,01	0,89	0,24
	(6/1)	0,12	0,13	0,16	0,08	0,03
	(7/6)	1,58	0,72	1,25	2,05	0,58
	(7/8)	1,83	0,90	1,68	1,87	0,37

Vysvětlení zkratk: K kontrola, P pacient, SD směrodatná odchylka. Složení inkubací analýzy KMEM: 1 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP, 2 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + karnitin + ADP, 3 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát - ADP, 4 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát - ADP + CCCP, 4a [1-<sup>14</sup>C] pyruvát - karnitin + ADP, 5 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP + atraktylosid, 6 [U-<sup>14</sup>C] malát + pyruvát + malonát + ADP, 7 [U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + malonát + ADP, 8 [U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + arsenit + ADP, 9 [1,4-<sup>14</sup>C] sukcinát + acetylkarnitin + ADP

**Příloha 9: Naměřené hodnoty analýzy KMEM (mitochondriálního energetického metabolismu) u pacientů s deficitem komplexu IV (P10–P15) a F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP syntázy (P16–P18) a srovnání s průměrnou hodnotou KMEM kontrol K1–K10.**

pacient		P10				P11		P12		P13		P14		P15		P16		P17		P18					
věk		1 rok																		4 měsíce		6 měsíců		4 měsíce	
mutace v genu		SURF1								SCO2								TMEM70							
pasáž		10	10	11	11	11	11	13	13	10	10	9	11	13	13	10	10	10	9	12					
koncentrace proteinu [mg/ml]		2,5	3,5	7,2	3,6	5,3	3,8	6,3	6,5	7,9	6,1	5,6	9,9	10,6	9,8	8,9	6,7	7,3	10,9	7,9					
aktivita CS [nmol/min/mg]		48,2	37,4	37,3	60,4	78,1	65,5	84	72,6	21	30	55	40,6	47,1	41,9	59,5	37,7	75,1	53,8	75,8	průměr K1–K10	SD			
KMEM inkubace [ <sup>14</sup> C <sub>2</sub> /min/mg prot]	1	63	64	31	81	52	39	47	76	92	82	83	122	52	53	47	58	86	93	85	74,31	49,55			
	2	47	53	38	103	79	61	52	78	81	61	41	93	36	35	53	59	148	132	113	65,85	46,32			
	3	106	57	29	60	33	40	25	57	78	87	67	99	26	31	46	42	35	33	55	64,85	38,12			
	4	46	101	49	109	72	86	123	167	111	136	146	169	59	64	130	136	119	111	106	119,70	75,89			
	4a	29	39	30	81	79	27	48	82	91	90	66	101	37	51	70	202	78	77	67	70,52	45,76			
	5	86	40	36	99	43	36	49	67	81	93	53	108	21	45	58	46	66	61	38	73,03	50,20			
	6	7	9	7	12	16	6	4	5	2	5	5	11	8	3	6	10	33	21	5	4,85	2,16			
	7	12	6	7	18	8	3	6	7	7	5	8	11	13	7	19	5	41	31	12	5,22	2,04			
	8	27	3	8	21	11	4	5	4	6	5	6	9	3	3	12	4	31	24	6	4,99	2,57			
9	7	5	3	6	17	10	9	9	9	9	9	20	17	6	12	7	93	50	24	6,66	2,49				
normalizace KMEM inkubací/CS	1/CS	1,31	1,70	0,82	1,34	0,66	0,59	0,56	1,05	3,89	3,08	1,51	3,00	1,11	1,26	0,80	1,55	1,15	1,72	1,12	1,58	0,78			
	2/CS	0,98	1,42	1,03	1,71	1,02	0,93	0,62	1,07	2,92	2,69	0,75	2,29	0,77	0,85	0,89	1,56	1,97	2,46	1,49	1,40	0,74			
	3/CS	2,19	1,53	0,77	1,00	0,42	0,61	0,30	0,78	4,15	2,61	1,21	2,44	0,55	0,73	0,78	1,11	0,46	0,61	0,72	1,40	0,63			
	4/CS	0,96	2,70	1,31	1,80	0,93	1,31	1,46	2,30	6,47	3,72	2,65	4,17	1,26	1,52	2,18	3,61	1,58	2,06	1,40	2,55	1,37			
	4a/CS	0,61	1,03	0,81	1,35	1,01	0,41	0,57	1,13	4,30	3,04	1,20	2,50	0,79	1,23	1,18	5,35	1,04	1,43	0,88	1,51	0,78			
	5/CS	1,77	1,06	0,97	1,64	0,55	0,56	0,58	0,92	4,42	2,70	0,96	2,67	0,45	1,07	0,97	1,21	0,88	1,13	0,50	1,56	0,83			
	6/CS	0,15	0,25	0,18	0,20	0,20	0,09	0,05	0,07	0,23	0,07	0,09	0,26	0,17	0,08	0,11	0,27	0,44	0,39	0,07	0,11	0,03			
	7/CS	0,24	0,15	0,19	0,30	0,10	0,05	0,07	0,09	0,22	0,22	0,14	0,27	0,27	0,17	0,31	0,14	0,54	0,59	0,15	0,11	0,03			
	8/CS	0,55	0,08	0,21	0,34	0,14	0,06	0,06	0,05	0,22	0,20	0,11	0,22	0,06	0,08	0,20	0,12	0,41	0,45	0,08	0,11	0,04			
9/CS	0,14	0,13	0,09	0,10	0,22	0,15	0,11	0,12	0,41	0,30	0,16	0,49	0,18	0,13	0,19	0,20	1,24	0,93	0,32	0,15	0,07				

Vysvětlení zkratk: CS citrátsyntáza, K kontrola, P pacient, prot protein, SD směrodatná odchylka. Složení inkubací analýzy KMEM:  
1 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP, 2 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + karnitin + ADP, 3 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát – ADP, 4 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát – ADP + CCCP,  
4a [1-<sup>14</sup>C] pyruvát – karnitin + ADP, 5 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP + atraktylosid, 6 [U-<sup>14</sup>C] malát + pyruvát + malonát + ADP,  
7 [U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + malonát + ADP, 8 [U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + arsenit + ADP, 9 [1,4-<sup>14</sup>C] sukcinát + acetylkarnitin + ADP



**Příloha 10: Hodnoty poměrů inkubací analýzy KMEM (mitochondriálního energetického metabolismu) u pacientů s deficitem komplexu IV (P10–P15) a F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP syntázy (P16–P18) a srovnání s průměrnou hodnotou poměrů kontrol K1–K10.**

pacient		P10			P11			P12			P13			P14			P15			P16			P17			P19			průměr K1–K10	SD
mutace v genu/kontrola		<i>SURF1</i>									<i>SCO2</i>						<i>TMEM70</i>													
poměry inkubací KMEM	(1/3)	0,60	1,11	1,06	1,35	1,56	0,97	1,91	1,34	0,94	1,18	1,25	1,23	2,00	1,71	1,02	1,39	2,49	2,82	1,56	1,14	0,19								
	(2/1)	0,75	0,83	1,25	1,27	1,54	1,57	1,09	1,02	0,75	0,87	0,50	0,76	0,70	0,67	1,12	1,01	1,72	1,43	1,32	0,89	0,07								
	(4/1)	0,73	1,58	1,61	1,34	1,40	2,22	2,59	2,19	1,66	1,21	1,75	1,39	1,14	1,21	2,74	2,33	1,38	1,20	1,25	1,69	0,54								
	(3/5)	1,23	1,45	0,80	0,61	0,77	1,10	0,51	0,85	0,94	0,97	1,26	0,91	1,23	0,69	0,80	0,91	0,52	0,54	1,43	0,96	0,27								
	(6/1)	0,12	0,15	0,22	0,15	0,30	0,16	0,09	0,07	0,06	0,02	0,06	0,09	0,16	0,06	0,14	0,17	0,39	0,23	0,06	0,10	0,06								
	(7/6)	1,61	0,60	1,05	1,53	0,50	0,56	1,40	1,24	0,94	3,06	1,56	1,03	1,55	2,09	2,89	0,53	1,24	1,50	2,33	1,11	0,32								
	(7/8)	0,44	1,83	0,92	0,88	0,71	0,88	1,17	1,78	1,00	1,11	1,24	1,21	4,15	2,22	1,59	1,21	1,33	1,30	1,87	1,24	0,44								

Vysvětlení zkratk: K kontrola, P pacient, SD směrodatná odchylka. Složení inkubací analýzy KMEM: 1 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP, 2 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + karnitin + ADP, 3 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát – ADP, 4 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát – ADP + CCCP, 5 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP + atraktylosid, 6 [U-<sup>14</sup>C] malát + pyruvát + malonát + ADP, 7 [U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + malonát + ADP, 8 [U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + arsenit + ADP

**Příloha 11: Naměřené hodnoty analýzy KMEM (mitochondriálního energetického metabolismu) u pacientů s kombinovaným deficitem systému oxidativní fosforylace (P19–P23) a srovnání s průměrnou hodnotou KMEM kontrol K1–K10.**

pacient		P19		P20		P21		P22		P23			
věk		40 dnů		4 měsíce		9 měsíců		13 let		2 měsíce			
mutace v genu		<i>TSMF</i>		<i>OPA1</i>				<i>TYMP</i>		<i>FH</i>			
pasáž		7	7	10	12	11	11	10	10	10	10		
koncentrace proteinu [mg/ml]		5,26	6,25	7,34	7	9,6	9,84	5,64	6,25	8,23	6,01		
aktivita CS [nmol/min/mg]		52,52	37,72	45,68	59,65	40,66	38,52	24,9	31,2	30,06	49,31	průměr K1–K10	SD
KMEM inkubace [ <sup>14</sup> CO <sub>2</sub> /min/mg prot]	1	75	102	72	34	42	43	60	66	48	67	74,31	49,55
	2	30	68	55	27	37	32	60	60	46	58	65,85	46,32
	3	31	41	36	32	39	24	34	42	50	65	64,85	38,12
	4	95	103	46	59	66	59	104	107	87	122	119,70	75,89
	4a	67	52	52	35	43	37	57	60	55	56	70,52	45,76
	5	129	105	45	39	40	38	41	62	44	59	73,03	50,20
	6	6	3	8	4	2	3	3	1	2	4	4,85	2,16
	7	5	5	7	2	4	7	5	2	3	5	5,22	2,04
	8	15	4	9	1	2	6	3	2	2	3	4,99	2,57
	9	8	6	4	11	12	5	8	10	8	9	7	2,49
normalizace KMEM inkubací/CS	1/CS	2,56	5,76	1,57	0,58	1,04	1,10	2,40	2,11	1,61	1,35	1,58	0,78
	2/CS	1,04	3,86	1,20	0,45	0,91	0,82	2,43	1,91	1,52	1,18	1,40	0,74
	3/CS	1,04	2,32	0,78	0,54	0,96	0,62	1,35	1,35	1,65	1,32	1,40	0,63
	4/CS	3,24	5,80	1,00	0,99	1,63	1,53	4,19	3,44	2,90	2,47	2,55	1,37
	4a/CS	2,26	2,95	1,13	0,59	1,06	0,96	2,30	1,91	1,83	1,14	1,51	0,78
	5/CS	4,39	5,94	0,98	0,65	0,99	0,98	1,64	1,99	1,46	1,19	1,56	0,83
	6/CS	0,20	0,20	0,18	0,07	0,05	0,08	0,11	0,04	0,08	0,08	0,11	0,03
	7/CS	0,19	0,31	0,15	0,04	0,09	0,19	0,18	0,07	0,08	0,10	0,11	0,03
	8/CS	0,51	0,21	0,21	0,02	0,05	0,17	0,13	0,07	0,08	0,06	0,11	0,04
	9/CS	0,26	0,33	0,09	0,18	0,30	0,13	0,33	0,32	0,26	0,18	0,15	0,07

Vysvětlení zkratk: CS citrátsyntáza, K kontrola, P pacient, prot protein SD směrodatná odchylka. Složení inkubací analýzy KMEM: 1 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP, 2 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + karnitin + ADP, 3 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát – ADP, 4 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát – ADP + CCCP, 4a [1-<sup>14</sup>C] pyruvát – karnitin + ADP, 5 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP + atraktylosid, 6 [U-<sup>14</sup>C] malát + pyruvát + malonát + ADP, 7 [U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + malonát + ADP, 8 [U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + arsenit + ADP, 9 [1,4-<sup>14</sup>C] sukcinát + acetylkarnitin + ADP

**Příloha 12: Hodnoty poměrů inkubační analýzy KMEM (kapacity mitochondriálního energetického metabolismu) u pacientů s kombinovaným deficitem systému oxidativní fosforylace (P19–P23) a srovnání s průměrnou hodnotou poměrů kontrol K1–K10.**

pacient		P19		P20		P21		P22		P23		průměr K1–K10	SD
mutace v genu/kontrola		<i>TSFM</i>		<i>OPA1</i>				<i>TYMP</i>		<i>FH</i>			
poměry inkubační KMEM	(1/3)	2,45	2,48	2,01	1,07	1,08	1,78	1,77	1,57	0,97	1,02	1,14	0,19
	(2/1)	0,40	0,67	0,77	0,79	0,88	0,74	1,01	0,91	0,95	0,87	0,89	0,07
	(4/1)	1,26	1,01	0,64	1,73	1,57	1,38	1,75	1,63	1,81	1,83	1,69	0,54
	(3/5)	0,24	0,39	0,80	0,83	0,97	0,63	0,82	0,68	1,13	1,11	0,96	0,27
	(6/1)	0,08	0,03	0,11	0,12	0,05	0,07	0,05	0,02	0,05	0,06	0,10	0,06
	(7/6)	0,94	1,57	0,82	0,56	1,91	2,51	1,58	1,63	1,04	1,25	1,11	0,32
	(7/8)	0,36	1,49	0,71	1,66	1,86	1,15	1,42	0,98	1,08	1,61	1,24	0,44

Vysvětlení zkratk: K kontrola, P pacient, SD směrodatná odchylka. Složení inkubační analýzy KMEM:  
 1 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP, 2 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + karnitin + ADP, 3 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát – ADP,  
 4 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát – ADP + CCCP, 5 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP + atraktylosid,  
 6 [U-<sup>14</sup>C] malát + pyruvát + malonát + ADP, 7 [U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + malonát + ADP,  
 8 [U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + arsenit + ADP

**Příloha 13: Naměřené hodnoty analýzy KMEM (kapacity mitochondriálního energetického metabolismu) u pacientů s Huntingtonovou chorobou (P24–P30) a srovnání s průměrnou hodnotou KMEM kontrol K11–K15.**

pacient		P24		P25	P26	P27		P28		P29		P30			
onemocnění		Huntingtonova choroba													
věk		34 let		40 let	42 let	74 let		39 let		49 let		62 let			
pasáž		8	7	6	6	10	11	5	5	13	15	8	10		
koncentrace proteinu [mg/ml]		14,8	9,05	13,78	10,48	4,87	5,09	8,95	9,01	8,29	5,17	8,36	5,57		
aktivita CS [nmol/min/mg]		26,58	62,98	55,14	37,2	76,3	67,1	42,56	41,01	49,9	77,29	16,87	37,3	průměr K11–K15	SD
KMEM inkubace [ <sup>14</sup> CO <sub>2</sub> /min/mg prot]	1	40	60	13	23	78	94	60	68	103	65	40	42	53,67	23,40
	2	31	41	40	24	68	77	63	56	49	50	32	45	43,31	16,16
	3	16	57	46	22	51	74	61	49	69	40	44	40	33,39	14,41
	4	80	107	67	41	99	138	68	70	100	53	45	96	86,11	40,51
	4a	42	71	30	15	74	74	81	69	85	45	44	68	42,55	17,29
	5	44	51	43	15	85	91	61	70	79	49	35	53	43,33	22,37
	6	2	3	6	3	15	6	4	5	4	4	4	3	5,53	1,84
	7	4	4	4	3	6	6	10	7	4	3	5	10	9,66	2,78
	8	3	3	8	3	4	4	3	3	3	3	3	3	5,48	1,78
9	6	0	7	6	11	7	9	6	7	9	4	4	10,74	6,29	
normalizace KMEM inkubací/CS	1/CS	1,49	0,95	0,24	0,62	1,02	1,40	1,42	1,66	2,06	0,84	2,37	1,14	1,08	0,47
	2/CS	1,15	0,66	0,72	0,65	0,89	1,15	1,49	1,37	0,99	0,65	1,92	1,20	0,86	0,30
	3/CS	0,59	0,90	0,84	0,59	0,67	1,11	1,44	1,19	1,38	0,52	2,62	1,08	0,73	0,40
	4/CS	3,00	1,70	1,21	1,11	1,30	2,06	1,60	1,70	2,01	0,69	2,64	2,56	1,72	0,72
	4a/CS	1,57	1,13	0,55	0,42	0,96	1,10	1,90	1,69	1,71	0,58	2,62	1,82	0,87	0,43
	5/CS	1,64	0,80	0,79	0,41	1,12	1,35	1,43	1,71	1,58	0,63	2,06	1,42	0,88	0,53
	6/CS	0,07	0,05	0,10	0,07	0,20	0,09	0,09	0,12	0,08	0,05	0,23	0,08	0,11	0,04
	7/CS	0,13	0,06	0,07	0,09	0,08	0,09	0,23	0,17	0,09	0,04	0,32	0,26	0,19	0,05
	8/CS	0,12	0,05	0,15	0,09	0,05	0,06	0,07	0,06	0,06	0,04	0,15	0,08	0,11	0,04
9/CS	0,22	0,00	0,12	0,16	0,15	0,11	0,20	0,14	0,15	0,12	0,26	0,10	0,21	0,12	

Vysvětlení zkratk: CS citrátsyntáza, K kontrola, P pacient, prot protein, SD směrodatná odchylka. Složení inkubační analýzy KMEM: 1 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP, 2 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + karnitin + ADP, 3 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát - ADP, 4 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát - ADP + CCCP, 4a [1-<sup>14</sup>C] pyruvát - karnitin + ADP, 5 [1-<sup>14</sup>C] pyruvát + malát + ADP + atraktylosid, 6 [U-<sup>14</sup>C] malát + pyruvát + malonát + ADP, 7 [U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + malonát + ADP, 8 [U-<sup>14</sup>C] malát + acetylkarnitin + arsenit + ADP, 9 [1,4-<sup>14</sup>C] sukcinát + acetylkarnitin + ADP

**Příloha 14: Hodnoty poměrů inkubací analýzy KMEM (kapacity mitochondriálního energetického metabolismu) u pacientů s Huntingtonovou chorobou (P24–P30) a srovnání s průměrnou hodnotou poměrů kontrol K11–K15**

pacient		P24	P25	P26	P27	P28	P29	P30	průměr K11–K15		SD				
onemocnění		Huntingtonova choroba													
poměry inkubací KMEM	(1/3)	2,52	1,06	0,29	1,04	1,53	1,27	0,99	1,39	1,49	1,62	0,90	1,05	1,76	0,71
	(2/1)	0,77	0,69	3,00	1,05	0,87	0,82	1,05	0,83	0,48	0,77	0,81	1,05	0,86	0,16
	(4/1)	2,01	1,79	5,07	1,79	1,27	1,47	1,13	1,03	0,98	0,82	1,11	2,25	1,55	0,73
	(3/5)	0,36	1,12	1,07	1,44	0,60	0,82	1,01	0,70	0,87	0,82	1,27	0,76	0,89	0,24
	(6/1)	0,05	0,05	0,42	0,11	0,19	0,06	0,06	0,07	0,04	0,06	0,10	0,07	0,08	0,03
	(7/6)	1,91	1,34	0,69	1,32	0,42	0,98	2,60	1,42	1,07	0,88	1,42	3,20	2,05	0,58
	(7/8)	1,15	1,13	0,46	1,06	1,53	1,55	3,06	2,66	1,52	1,09	2,10	3,37	1,87	0,37

Vysvětlení zkratk: K kontrola, P pacient, SD směrodatná odchylka. Složení inkubací analýzy KMEM: 1 [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ] pyruvát + malát + ADP, 2 [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ] pyruvát + karnitin + ADP, 3 [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ] pyruvát + malát – ADP, 4 [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ] pyruvát + malát – ADP + CCCP, 5 [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ] pyruvát + malát + ADP + atraktylosid, 6 [ $\text{U-}^{14}\text{C}$ ] malát + pyruvát + malonát + ADP, 7 [ $\text{U-}^{14}\text{C}$ ] malát + acetylkarnitin + malonát + ADP, 8 [ $\text{U-}^{14}\text{C}$ ] malát + acetylkarnitin + arsenit + ADP

**Příloha 15: Seznam prezentací na mezinárodních konferencích, kde byly použity výsledky diplomové práce**

1. Kratochvílová H., Rodinová M., Spáčilová J., Ondrušková N., Marková M., Daňhelovská T., Valekova I., Hůlková M., Tesařová M., Juhásová J., Ellederová Z., Zeman J., Motlík J., Hansíková H.: **Mitochondrial impairments in fibroblasts of minipigs transgenic for the N-terminal part of human mutated huntingtin**, *3rd Conference Devoted to Animal Models of Neurodegenerative Diseases*, 8.–10. 11. 2015 Liblice, ČR (poster)
2. Daňhelovská T., Hansíková H., Tesařová M., Nováková M., Rodinová M., Kratochvílová H., Kučerová I., Sládková J., Zeman J.: **Mitochondrial energy generating capacity (MEGC) in cultured skin fibroblasts**, 29. *Czech-Slovak konference Bioenergetika 2015, Desná – Jizerské hory, Hotel Montanie*, 15.–17. 10. 2015
3. Rodinová M., Spáčilová J., Kratochvílová H., Marková M., Daňhelovská T., Tesařová M., Lišková I., Klempíř J., Zeman J., Hansíková H.: **Změny energetického metabolismu a ultrastruktury mitochondria v kultivovaných kožních fibroblastech od 15 pacientů s Huntingtonovou chorobou**, *XII. Celostátní sjezd České společnosti klinické biochemie ČLS JEP s mezinárodní účastí*, sborník abstrakt, *Klinická biochemie a metabolismus* 3, 23 (2015) s. 152, Brno, ČR, 20.–22. 9. 2015
4. Kratochvílová H., Rodinová M., Spáčilová J., Ondrušková N., Marková M., Daňhelovská T., Valekova I., Hůlková M., 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**, *Opening Conference COST Action BM1308 Sharing Advances on Large Animal Models – Sharing Advances on Large Animal Models*, Gene Centre, LMU Munich, 15.–17. 12. 2014