

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Buněčná a vývojová biologie

Studijní obor: Fyziologie buňky



Bc. Dieu Hien Ho

Úloha proteinu MLQ ve struktuře a funkci savčí mitochondriální ATP syntázy
The role of MLQ protein in structure and function of mammalian ATP synthase

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel:

Mgr. Petr Pecina, Ph.D.

Praha, 2017

Prohlášení

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

V Praze, 15.08.2017

Podpis

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat svému školiteli, Mgr. Petru Pecinovi, Ph.D., a vedoucímu oddělení bioenergetiky, RNDr. Tomášovi Mráčkovi, Ph.D. za jejich bezchybné vedení, za skvělé zázemí pro vypracování této diplomové práce a za tu spoustu času, kterou strávili nad konzultacemi mých výsledků. Dále se sluší poděkovat členům oddělení bioenergetiky, kteří nikdy neváhali přispět s cennou radou, pokud jsem ji potřebovala, a kteří spoluvytváří ideální prostředí pro práci v laboratoři.

Nakonec bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za podporu během mého studia i mimo něj.

Práce byla vypracována na Oddělení bioenergetiky FgÚ AV ČR, v. v. i. (vedoucí RNDR. Tomáš Mráček. Ph.D.) a finančně podporována grantem 16-01813S (GA ČR).

Abstrakt

F_1F_0 -ATP syntáza (EC 3.6.3.14) je klíčovým enzymem v systému mitochondriální oxidativní fosforylace (OXPHOS) – využívá protonový gradient vybudovaný respiračním řetězcem k syntéze přibližně 90 % buněčného ATP. Uspořádání podjednotek membránové domény F_0 tohoto enzymu ale ještě není stále detailně popsáno. Výzkum ATP syntázy je v současnosti zaměřen především na odhalení struktury protonového kanálu a , aby bylo možno přesně definovat molekulární mechanismus generování rotace ATP syntázy. Další nevyřešenou otázkou představuje úloha tzv. nadpočetných podjednotek F_0 domény. Tyto proteiny specifické pro eukaryotní ATP syntázy nejsou esenciální pro syntázovou aktivitu a předpokládá se, že se mohou podílet na sestavování a stabilizaci enzymového komplexu. Jednou z těchto podjednotek je jaderně kódovaný protein MLQ (nebo také 6,8 kDa proteolipid či MP68), který je konzervován pouze u obratlovců. Cílem této diplomové práce bylo zjistit, jakou úlohu má tato podjednotka ve struktuře, asemblaci a funkci F_1F_0 -ATP syntázy. Pro tyto účely byl v rámci diplomové práce vytvořen buněčný model z linie HEK293 s deficiencí proteinu MLQ metodou CRISPR/Cas9 s párovanými nikázami (tzv. knock-out MLQ, MLQ KO). Tři vybrané MLQ KO linie byly podrobeny elektroforetickým analýzám struktury enzymu (SDS-PAGE, BN-PAGE a CN-PAGE) i funkčním měření respirace a glykolytické kapacity. Sledován byl také vliv absence proteinu MLQ na hladinu transkriptů různých genů OXPHOS enzymů. V MLQ KO liniích došlo ke snížení obsahu podjednotek a , DAPIT a c v F_0 doméně, zatímco proteiny F_1 domény nebyly defektem postiženy. Nativní elektroforézy ukázaly, že ATP syntáza není v MLQ KO kompletně asemblována a její F_0 je destabilizována, podobně jako je tomu u ρ^0 buněk postrádajících podjednotky a a A6L kódovaných mitochondriální DNA (mtDNA). Nebyl pozorován vliv MLQ na oligomerizaci ATP syntázy. Funkční měření odhalila u MLQ KO signifikantní defekt v kapacitě mitochondriální produkce ATP a preferenci glykolytické dráhy pro získání energie před oxidativní fosforylací. Nepřítomnost proteinu také vedla k mírnému snížení maximální funkční kapacity cytochrom c oxidázy (komplex IV) a redukci množství mtDNA kódovaných proteinů tohoto enzymu – COX1, COX2 a COX3. qPCR analýza odhalila snížení hladiny mRNA mtDNA-kódovaných proteinů a , A6L a COX3, zatímco množství jaderně kódovaných transkriptů OXPHOS proteinů ovlivněno nebylo. Výsledky diplomové práce prokázaly úlohu proteinu MLQ ve stabilizaci F_0 domény mitochondriální ATP syntázy i jeho možný vliv na regulaci exprese mtDNA-kódovaných genů.

Klíčová slova: MLQ, 6.8 kDa proteolipid, MP68, F_1F_0 -ATP syntáza, mitochondrie, OXPHOS, dýchací řetězec

Abstract

The F_1F_0 -ATP synthase (EC 3.6.3.14) is a key enzyme of the mitochondrial oxidative phosphorylation system (OXPHOS) – using the proton gradient generated by the respiratory chain it synthesizes approximately 90 % of cellular ATP. The subunit arrangement of its F_0 domain has not been yet described in detail. At present, the research on ATP synthase is focused mostly on revealing the structure of the proton channel so that it is possible to precisely define the molecular mechanism of the ATP synthase rotation generation. The role of the supernumerary subunits of F_0 domain represents another unresolved issue. These proteins specific for eukaryotic ATP synthases are not essential for synthetic activity, instead they are putatively involved in assembly or stabilization of the enzyme complex. One of such subunits is the nuclear encoded MLQ protein (or also 6.8 kDa proteolipid or MP68), which is conserved only in vertebrates. The aim of this diploma thesis was to reveal the role of this subunit in the structure, assembly and function of the F_1F_0 -ATP synthase. For these purposes, cellular model of the HEK293 line with the deficiency of the MLQ protein was established employing the CRISPR/Cas9 method with paired nickases (the knock-out MLQ, MLQ KO) as part of the thesis. Three chosen MLQ KO lines were subjected to electrophoretic analyses of ATP synthase structure (SDS-PAGE, BN-PAGE and CN-PAGE), as well as to functional measurements of mitochondrial respiration and glycolytic capacity. The effect of MLQ absence on the level of transcripts of various OXPHOS genes was also studied. The MLQ KO cells showed decrease in the content of subunits α , DAPIT and c in the F_0 domain, while subunits of the F_1 were not influenced by the MLQ defect. Native electrophoreses revealed that ATP synthase is not completely assembled in MLQ KO and its F_0 domain is destabilized, similarly as in ρ_0 cells lacking the subunits α and A6L encoded by mitochondrial DNA (mtDNA). The ATP synthase oligomerization is not influenced by MLQ knock-out. Functional measurements revealed a significant defect in the capacity of mitochondrial ATP synthesis and preference of glycolytic pathway for energy provision. The absence of the protein also resulted in a moderate decrease in the functional capacity of cytochrome c oxidase (complex IV) and decrease in the amount of the mtDNA encoded proteins of this enzyme – COX1, COX2 and COX3. The qPCR analysis uncovered decrease of the level of mRNAs of mtDNA-encoded proteins α , A6L and COX3 while the amount of nuclear encoded OXPHOS mRNAs was not affected. The results of the diploma thesis established the role of MLQ in stabilization of the F_0 domain of mitochondrial ATP synthase as well as its putative involvement in regulation of mtDNA genes expression.

Key words: MLQ, 6.8 kDa proteolipid, MP68, F₁F₀-ATP synthase, mitochondria, OXPHOS, respiratory chain

Obsah

1	Teoretický přehled	3
1.1	Mitochondrie	3
1.2	Systém oxidační fosforylace	5
1.2.1	Chemiosmotická teorie	5
1.2.2	Elektron transportní řetězec	6
1.2.3	F ₁ F ₀ -ATP syntáza	8
1.2.4	MLQ.....	18
2	Cíle práce.....	21
3	Materiály a metody.....	22
3.1	Seznam použitých chemikálií	22
3.1.1	Použité kity.....	23
3.2	Metody.....	24
3.2.1	Kultivace buněk HEK293.....	24
3.2.2	Stanovení koncentrace proteinu Bradfordovou metodou.....	25
3.2.3	Buněčné modely.....	25
3.2.4	SDS-PAGE	33
3.2.5	Elektrotransfer na PVDF membránu – Western blot	35
3.2.6	Nativní elektroforézy.....	37
3.2.7	Měření respirace pomocí přístroje OROBOROS.....	39
3.2.8	Paralelní měření respirace a glykolytické kapacity buněk	42
3.2.9	Izolace RNA z buněčné kultury.....	44
3.2.10	Odstranění genomové DNA	44
3.2.11	Reverzní transkripce.....	45
3.2.12	Kvantitativní PCR v reálném čase	45
4	Výsledky	48
4.1	Knock-down genu pro protein MLQ pomocí shRNA vlásenek	48
4.2	Knock-out genu C14orf2	51
4.2.1	Selekce gRNA párů	51
4.2.2	Selekce linií s absencí MLQ proteinu.....	52
4.2.3	Analýza obsahu podjednotek mitochondriální ATP syntázy u vybraných klonů.....	54
4.3	Vliv absence MLQ na strukturu komplexu ATP syntázy	56
4.4	Analýza funkčnosti oxidační fosforylace pomocí oxygrafu.....	60

4.5	Vliv absence genu <i>C14orf2</i> na transkripci mtDNA genů	67
4.6	Vliv absence genu <i>C14orf2</i> na obsah mtDNA kódovaných podjednotek COX	69
5	Diskuze	71
5.1	Vytvoření buněčného modelu pro studium funkce proteinu MLQ.....	71
5.2	Vliv chybějícího proteinu MLQ na strukturu a stabilitu ATP syntázy	72
5.3	Defekt ATP syntázy v oxidativní fosforylaci.....	74
5.4	Vliv absence MLQ na komplexy respiračního řetězce.....	75
5.5	Závěr.....	76
6	Reference	77

Seznam zkratek

2-DG	2-deoxyglukóza
Å	Ångström – jednotka délky (1 Å = 0,1 nm)
ADP/ATP	adenosindi(tri)fosfát
bp	pár bází (<i>base pair</i>)
BNE	modrá nativní elektroforéza (<i>blue native electrophoresis</i>)
BSA	hovězí sérový albumin (<i>bovine serum albumin</i>)
Cas	asociované s CRISPR (<i>CRISPR associated</i>)
CNE	čistá nativní elektroforéza (<i>clear native electrophoresis</i>)
CoQ, Q	koenzym Q, ubichinon
CRISPR	nahromaděné, pravidelně uspořádané palindromické repetice (<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeat</i>)
crRNA	CRISPR RNA
cyt	cytochrom
Da	Dalton, atomová hmotnostní jednotka (1 Da = 1,660 539040(20)×10 ⁻²⁷ kg)
DAPIT	protein asociovaný s diabetem ve tkáních regulovaných inzulinem (<i>diabetes-associated protein in insulin-sensitive tissue</i>)
DDM	<i>n</i> -dodecyl β-D-maltosid
DMEM	Dulbeccovo modifikované Eagle médium
DMSO	dimethylsulfoxid
ECAR	míra extracelulární acidifikace (<i>extracellular acidification rate</i>)
EDTA	kyselina ethylendiaminotetraoctová
EGTA	kyselina ethylenglykol-di-(2-aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraoctová
ETS	elektron-transportní systém
FAD (H ₂)	flavinadenindinukleotid
FBS	fetální bovinní sérum (<i>fetal bovine serum</i>)
FCCP	karbonylkyanid- <i>p</i> -trifluoromethoxyfenylhydrazon
FMN	flavinmononukleotid
gRNA	guide RNA
gDNA	genomová DNA
HEK 293	lidské embryonální ledvinové buňky (<i>human embryonic kidney cells</i>)
HeLa	buněčná linie odvozená z nádoru Henrietty Lacksové
IF ₁	inhibitor F ₁ domény ATP syntázy
KCN	kyanid draselný
KD	knock-down
KO	knock-out
LB	lysogeny broth (Luria-Bertani broth)
MLQ	jiný název pro 6,8 kDa protein dle prvních tři aminokyselin v sekvenci
mRNA	messenger RNA
mt	mitochondriální
mtDNA	mitochondriální DNA
NAD(H)	nikotinamidadenindinukleotid
nDNA	jaderná DNA
NTP	nukleotidtrifosfát
OCR	míra spotřeby O ₂ (<i>oxygen consumption rate</i>)

OSCP	oligomycin senzitivní protein
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza
PAM	sekvence sousedící s protospacerem (<i>protospacer adjacent motif</i>)
PCR	polymerázová řetězová reakce (<i>polymerase chain reaction</i>)
PIC	směs inhibitorů proteáz (<i>protease inhibitor cocktail</i>)
PBS	fyzilogický fosfátový roztok (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PVDF	polyvinylidendifluorid
qPCR	kvantitativní PCR (<i>quantitative PCR</i>)
RCR'ADP	respirační kontrolní poměr po přidání nukleotidů (<i>respiratory control ratio</i>)
rpm	otáčky za minutu (<i>revolutions per minute</i>)
SDS	sodiumdodecylsulfát
SEKT pufr	pufr složený ze sacharózy, EGTA, KCl a Tris-HCl
sgRNA	jednotlivá gRNA
shRNA	krátká vlásenková RNA (<i>short hairpin RNA</i>)
SLB	lyzační pufr (<i>sample loading buffer</i>)
STZ	streptozotocin
T+E	trypsin + EDTA
TBS	solný roztok pufovaný Tris (<i>Tris-buffered saline</i>)
TBST	TBS + detergent Tween-20
TE	pufr složený z Tris a EDTA
TMPD	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethyl- <i>p</i> -fenylenediamin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
tracrRNA	transaktivační crRNA
UCR	kontrolní poměr po rozpřažení OXPHOS (<i>uncoupling control ratio</i>)
Usmg5	zvýšená exprese během růstu kosterních svalů (<i>up-regulated during the skeletal muscle growth</i>)
WT	divoký typ (<i>wild type</i>)

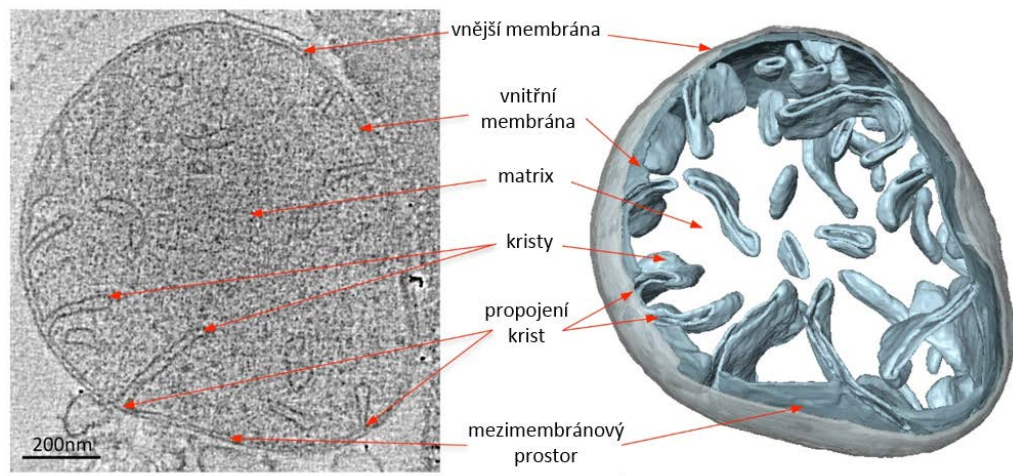
1 Teoretický přehled

1.1 Mitochondrie

Mitochondrie jsou klíčovými organelami pro buněčné systémy – jsou místem, kde se soustředí oxidační metabolismus a kde dochází k produkci cca 90 % buněčného ATP. Proto jsou někdy označovány jako „buněčné elektrárny“. Poprvé byly pozorovány v roce 1890 pruským doktorem Richardem Altmannem – všudypřítomné struktury nazval „bioblasty“ a domníval se o nich, že jsou to jednoduché organismy žijící v cytoplasmě buňky (Ernster and Schatz, 1981).

Vznik mitochondrií (potažmo chloroplastů) nejlépe vysvětluje tzv. endosymbiotická teorie (Sagan, 1967) – podle ní heterotrofní anaerobní archeální organismus náhodně pohltil fakultativně anaerobní α -proteobakterii, která byla schopná metabolizovat O_2 . Toto poté představovalo jednu z klíčových událostí vedoucích ke vzniku eukaryotních organismů (Martin, Garg and Zimorski, 2015).

Mitochondrie si zachovaly jen část vlastní DNA – během evoluce došlo k přesunu většiny mitochondriálních genů do jádra. Z tohoto důvodu se jim říká semiautonomní organely. Lidská mitochondriální DNA (16 569 bp) (Anderson *et al.*, 1981) je cirkulární molekula. Obsahuje pouze 37 genů, které kódují 13 proteinů aparátu oxidační fosforylace a 22 tRNA a 2 rRNA (Ladoukakis and Zouros, 2017).



Obr. 1 | Model mitochondrie vytvořený na základě dat z kryoelektronové tomografie

Data pocházejí z mitochondrií izolovaných ze *Saccharomyces cerevisiae*. Outer membrane = vnější membrána, inner boundary membrane = vnitřní membrána, cristae = kristy, cristae junctions = propojení krist, intermembrane space = intermembránový prostor. Převzato a upraveno z Davies a kol. (2012)

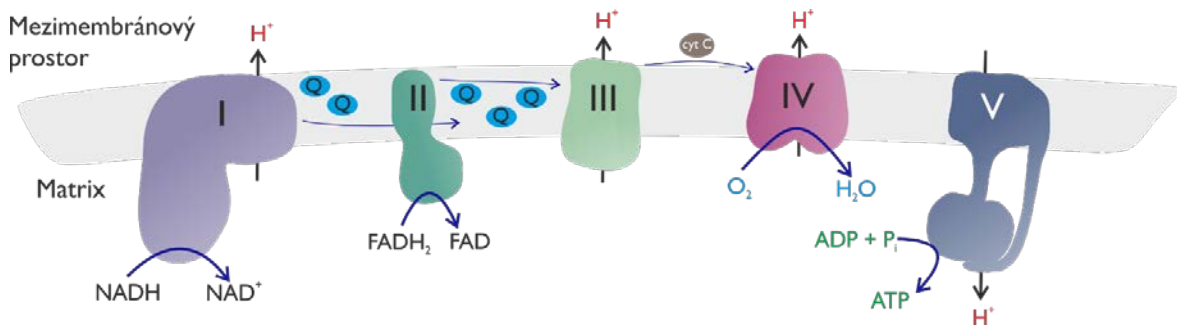
Počet a velikost mitochondrií na buňku se také liší v různých organismech, tkáních, a dokonce i v různých buněčných typech. Např. jediný hepatocyt může obsahovat až 2 000 mitochondrií, zatímco v erythrocytech mitochondrie chybí (Ikon and Ryan, 2017). Mitochondrii obalují dvě fosfolipidové membrány. Vnější membrána obsahuje poriny (především β -barelové proteiny), které umožňují volnou difúzi malým molekulám a iontům do velikosti 5 kDa (Alberts *et al.*, 2015). V složení vnitřní membrány převažují proteiny. Je nepropustná pro většinu iontů a malých molekul kvůli udržení elektrochemického gradientu. Její plocha je až 4× větší než plocha vnější membrány díky tzv. kristám – invaginované části membrány (Obr. 1) (Ikon and Ryan, 2017). Tvar vnitřní membrány se dynamicky mění, kristy mohou vytvářet množství tubulární spojů skrz celou matrix mitochondrie. Tubulární útvary spolu mohou různě fúzovat. Vnitřní membrána je vysoce organizovaná a soustředí se zde komplexy odpovědné za import proteinů a enzymy oxidační fosforylace (Mannella, 2006; Alberts *et al.*, 2015).

Přestože je syntéza ATP skrze oxidační fosforylaci jejich nejdůležitější funkcí, mitochondrie dále integrují celou řadu katabolických i anabolických metabolických drah a hrají důležitou roli i v buněčném stárnutí, programované buněčné smrti a v dalších procesech (Ladoukakis and Zouros, 2017).

1.2 Systém oxidační fosforylace

Většina ATP produkovaná v mitochondrii pochází z oxidačně fosforylačního (OXPHOS) aparátu. Ten se nachází na vnitřní membráně mitochondrií. Termín oxidační fosforylace značí dva spřažené procesy – respiraci a samotnou syntézu ATP. Oxidační část tvoří tzv. dýchací neboli elektron transportní řetězec složený ze čtyř základních enzymů – NADH dehydrogenázy (komplex I), sukcinát dehydrogenázy (komplex II), koenzym Q-cytochrom c reduktázy (komplex III) a cytochrom c oxidázy (komplex IV) – a dvou mobilních přenašečů – ubichinonu (Q, také koenzym Q – CoQ) a cytochromu c. Za fosforylaci ADP je pak zodpovědná F_1F_0 -ATP syntáza (komplex V).

Při respiraci dochází k přenosu elektronů (e^-) získaných oxidací redukováných koenzymů NADH a $FADH_2$ přes redoxní centra dýchacího řetězce až na komplex IV, kde dojde k redukci O_2 na H_2O . Při tomto přenosu se uvolňuje volná energie, která je použita pro tvorbu protonového gradientu potřebného pro syntézu ATP. Koenzymy NADH a $FADH_2$ jsou produkovány v mitochondriální matrix citrátovým cyklem a β -oxidací mastných kyselin.



Obr. 2 | Schéma systému oxidační fosforylace.

I, II, III, IV, V – komplexy oxidačně fosforylačního aparátu, Q – koenzym Q, cyt C – cytochrome c, H^+ - směr transportu protonů jednotlivými komplexy.

1.2.1 Chemiosmotická teorie

V roce 1961 postuloval Peter D. Mitchell hypotézu, která spřahuje syntézu ATP z ADP a P_i s oxidací redukováných koenzymů NADH a $FADH_2$ získaných z odbourávání energeticky bohatých molekul (např. glukóza, mastné kyseliny) (Mitchell, 1961). Tato teorie vychází z předpokladu, že v dýchajících nebo fotosyntetizujících buňkách je energie vzniklá oxidací redukováných koenzymů využita ke tvorbě elektrochemického gradientu aktivní translokací H^+ z matrix do mezimembránového prostoru (tzn. proti jejich koncentračnímu gradientu). Síla, kterou je poháněno následné vyrovnávání koncentrací H^+ , se nazývá proton-motivní a je označována Δp . Tento exergonický zpětný transport H^+ je uskutečněn skrz F_1F_0 -ATP syntázu, kde H^+ prochází protonovým kanálem zpět

do matrix mitochondrie. Energie vznikající tímto tokem je využita k syntéze ATP. Schematicky je tento proces shrnut na Obr. 2.

1.2.2 Elektron transportní řetězec

NADH dehydrogenáza

NADH dehydrogenáza (také komplex I, NADH:Q oxidoreduktáza, EC 1.6.5.3) je největším enzymatickým komplexem v respiračním řetězci - molekulová hmotnost komplexu složeného z 45 podjednotek je téměř 1 MDa (Carroll *et al.*, 2006). Katalytické jádro tvořené 14 podjednotkami je konzervováno od bakterií po savce; 7 z těchto podjednotek je kódováno mitochondriální DNA. Tyto mtDNA podjednotky (NU1M, NU2M, NU3M, NU4M, NU5M, NU6M, NULM) jsou hydrofobního charakteru. Hydrofilní část katalytického jádra obsahuje redoxní centra – flavinmononukleotid (FMN) a 8 železosírných (Fe-S) klastrů. Zbýlých 31 podjednotek je tzv. nadpočetných a nepodílejí se přímo na katalytické funkci (shrnuje Wirth *et al.* 2016). Přenos e^- z NADH přes redoxní centra na Q je spřažen s pumpováním protonů (H^+) z matrix do mezimembránového prostoru mitochondrie. Redukovaný ubichinol (QH_2) poté volně difunduje v hydrofobním prostředí vnitřní membrány. Na každé dva e^- jsou přepumpovány 4 H^+ (Galkin, Dröse and Brandt, 2006).

Sukcinát dehydrogenáza

Druhým, nejmenším enzymovým komplexem dýchacího řetězce je sukcinát dehydrogenáza (komplex II, sukcinát-CoQ oxidoreduktáza, EC 1.3.5.1). Je složena pouze ze 4 jaderně kódovaných podjednotek o celkové molekulové hmotnosti 124 kDa (Sun *et al.*, 2005) a jako jediný komplex oxidačně fosforylačního aparátu nepumpuje H^+ . Kovalentně vázaný kofaktor FAD a tři Fe-S centra jsou redoxními centry enzymu. Sukcinát dehydrogenázová reakce je důležitá pro elektron transportní řetězec i pro citrátový cyklus. Komplex II svou solubilní částí v matrix oxiduje sukcinát na fumarát za redukce FAD – získané elektrony jsou dále přeneseny přes Fe-S centra v membránové části enzymu k vazebnému místu pro Q, kde pak ve dvou krocích vznikne QH_2 (shrnuje Rutter *et al.* 2010). Součástí enzymu je i hemová skupina *b*, která během redukce Q váže volné e^- a zabraňuje vzniku volných kyslíkových radikálů (Tran *et al.*, 2006).

CoQ-cyt c reduktáza

Příjemcem e^- z QH_2 je třetí enzym v řetězci – CoQ-cyt c oxidoreduktáza (komplex III, cyt bc_1 komplex, EC 1.10.2.2). Tento enzym je homodimerem, kde je každý z monomerů tvořen 11 podjednotkami. Molekulová hmotnost jednoho monomeru je cca 240 kDa. V každém z nich se nacházejí tři katalytické podjednotky - cyt *b* obsahující prostetické skupiny hemy b_L a b_H , cyt c_1

s hemem c_1 a Rieskeho FeS protein se dvěma FeS centry (Iwata *et al.*, 1998). Jen cyt b je kódován mitochondriálně.

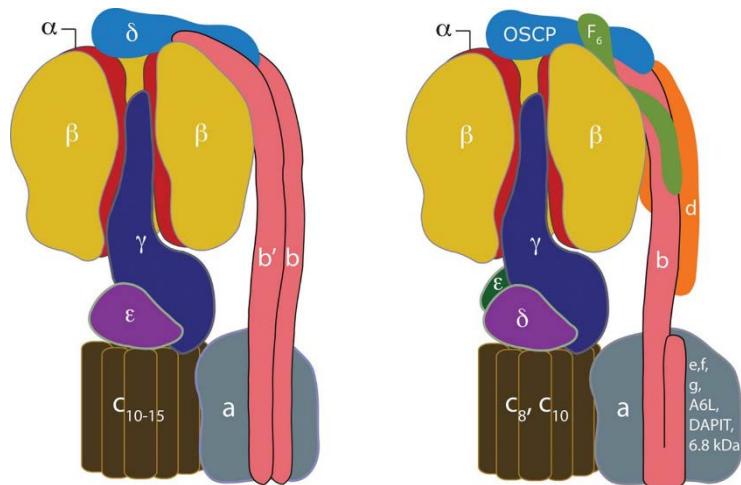
Úkolem komplexu III je přenést e^- získané z QH_2 na cyt c – to se děje v tzv. Q-cyklu. Ten řeší problém, kdy se během oxidace QH_2 uvolňují dva e^- , ale cyt c je schopen odebrat vždy pouze jeden. Po vazbě QH_2 tedy dojde k přenosu jednoho e^- přes Rieskeho protein na hem c_1 – tam je redukován cyt c , který se nachází na vnější straně vnitřní mitochondriální membrány. Redukovaný mobilní cyt c pak putuje ke komplexu IV. Druhý e^- přechází přes hemy b_L a b_H až k Q, kde dojde k jeho redukci a vzniká $^{\bullet}Q$ (semichinonový radikál). Celý tento proces proběhne znovu a další elektron redukuje $^{\bullet}Q$ na Q. Jak přesně tento cyklus probíhá na molekulární úrovni, stále není detailně objasněno (Fernández-Vizarra, Tiranti and Zeviani, 2009; Meunier *et al.*, 2013).

Cytochrom c oxidáza

Posledním enzymovým komplexem elektron transportního řetězce je cytochrom c oxidáza (komplex IV, COX, EC 1.9.3.1). Elektrony z cyt c jsou použity na redukci O_2 , který představuje jejich finální akceptor a v tomto procesu vzniká H_2O . Více než 90 % vdechovaného O_2 je spotřebováno právě cytochrom c oxidázou. Enzym je homodimerní – monomer je složen z třinácti různých podjednotek (celkem 204 kDa) (Alberts *et al.*, 2015). V katalytickém jádře se nacházejí tři konzervované podjednotky COX1, COX2 a COX3 – ty jsou kódovány mitochondriální DNA. Redoxní skupiny – hem a , hem a_3 a Cu_B jsou součástí COX1, v COX2 nalezneme Cu_A . Elektrony jsou přenášeny jednotlivě od cyt c přes Cu_A , hem a až na binukleární centrum tvořené hemem a_3 a atomem Cu_B , kde s H^+ dopravenými kanálem K z matrix redukuje O_2 na H_2O . Zároveň s každým přenášeným e^- dojde k aktivnímu přepumpování H^+ skrz kanál D do mezimembránového prostoru (Nicholls and Ferguson, 2013).

1.2.3 F₁F₀-ATP syntáza

Posledním enzymem oxidačně fosforylačního aparátu je F₁F₀-ATP syntáza (komplex V, EC 3.6.3.14). Patří mezi ATP syntázy (F-ATPázy) – ty se nacházejí na membránách bakterií, mitochondrií i chloroplastů (Walker 1998). Kromě F-ATPáz, které v aerobním prostředí využívají energie z protonového gradientu budovaném respirací nebo fotosyntézou pro syntézu ATP z ADP a P_i, existují i V-ATPázy (vakuolární ATPázy). Ty naopak budují iontový gradient na membránách eukaryotických organel (endozomy, lysozomy, sekreторické váčky, vakuoly...) za hydrolýzy ATP. Poslední skupinou ATPáz jsou archeální A-ATPázy syntetizující ATP (Denda *et al.*, 1989).



Obr. 3 Uspořádání proteinů v ATP syntáze.

Vlevo ATP syntáza nacházející se v bakteriích a v chloroplastech, vpravo je mitochondriální enzym. Homology jsou označeny stejnou barvou. Převzato z Walker (2013).

Struktura

Savčí ATP syntáza je multiproteinový komplex skládající se z cca 30 podjednotek 18 různých proteinů s molekulovou hmotností cca 600 kDa. Dělí se na dvě domény – globulární solubilní doménu F₁ (tvořenou podjednotkami α, β, γ, δ, ε) najdeme na matrixové straně vnitřní mitochondriální membrány. F₀ hydrofobní doména (zahrnující podjednotky a, c, e, f, A6L, MLQ, DAPIT) je zanořena v membráně. Oba subkomplexy jsou přes protonový kanál a a hexamer αβ spojeny tzv. periferním stonkem (podjednotky b, d, OSCP, F₆). Další kontakt obou domén zajišťuje tzv. centrální stonk (γ, δ, ε – součást F₁) – váže se na c-oligomer F₀ domény a interaguje s vnitřním rozhraním hexameru α₃β₃. K F₁ doméně pak patří ještě její regulační protein IF₁ (Obr. 3).

Geny pro většinu proteinů F₁F₀ ATP-syntázy jsou jaderného původu, pouze podjednotky A6L a protonový kanál a jsou kódovány mtDNA (Fearnley and Walker, 1986).

Struktura tohoto enzymu je zkoumána především pomocí rentgenové krystalografie, některé recentní poznatky o struktuře membránové domény byly získány s využitím kryoelektronové mikroskopie (Zhou *et al.*, 2015; Hahn *et al.*, 2016).

F₁ doména

Katalytickým centrem enzymu je F₁ doména. Je 80 Å vysoká a skládá se z hexameru $\alpha\beta$ a podjednotek centrálního stonku γ, δ, ϵ ve stechiometrii $3\alpha:3\beta:1\gamma:1\delta:1\epsilon$ (Senior and Brooks, 1971; Esch and Allison, 1979). Dohromady mají molekulovou hmotnost cca 350 kDa (Walker, 2012). Primární struktury podjednotek $\alpha\beta$ obsahují konzervované sekvence napříč organismy na rozdíl od podjednotek γ, δ, ϵ (Walker *et al.*, 1985).

Podjednotky $\alpha\beta$ jsou střídavě uspořádány do útvaru připomínajícího plod pomeranče o průměru cca 100 Å – tento hexamer pak obklopuje asymetrický, 90 Å dlouhý α -helix centrálního stonku, který je tvořen C-koncovými aminokyselinami na pozicích γ 209-272 podjednotky γ . Se spodní částí tohoto helixu interaguje N-konec podjednotky γ (γ 1-45) a tvoří spolu antiparalelní nadšroubovici. γ podjednotka pak vyčnívá směrem k F₀ doméně, kde se spolu s podjednotkami δ a ϵ tvořícími bázi centrálního stonku váží na polární smyčky transmembránových helixů *c*-oligomeru F₀ domény. δ a ϵ vazbu na *c*-oligomer posilují (Abrahams *et al.*, 1994; Gibbons *et al.*, 2000). Centrální stonek je pak 114 Å dlouhý (Gibbons *et al.*, 2000).

Struktury α a β proteinů jsou velmi podobné – obě podjednotky mají N-terminální β barel ze šesti β -listů, středovou nukleotid-vazebnou doménu a na C-konci se nachází svazek 6 (α podjednotka) nebo 7 (β -podjednotka) helixů. Na N-konci primární struktury jsou pak neuspořádané sekvence aminokyselin (18-24 u α , 4-8 u β), které jsou citlivé vůči proteázám. Přestože nukleotidy vážou obě podjednotky, samotná katalýza probíhá pouze na β -podjednotkách na rozhraní mezi α a β (Abrahams *et al.*, 1994; Watt *et al.*, 2010). Hexamer $\alpha\beta$ spolu s periferním stonkem a protonovým kanálem *a* tvoří tzv. „stator“ enzymu.

F₀ doména

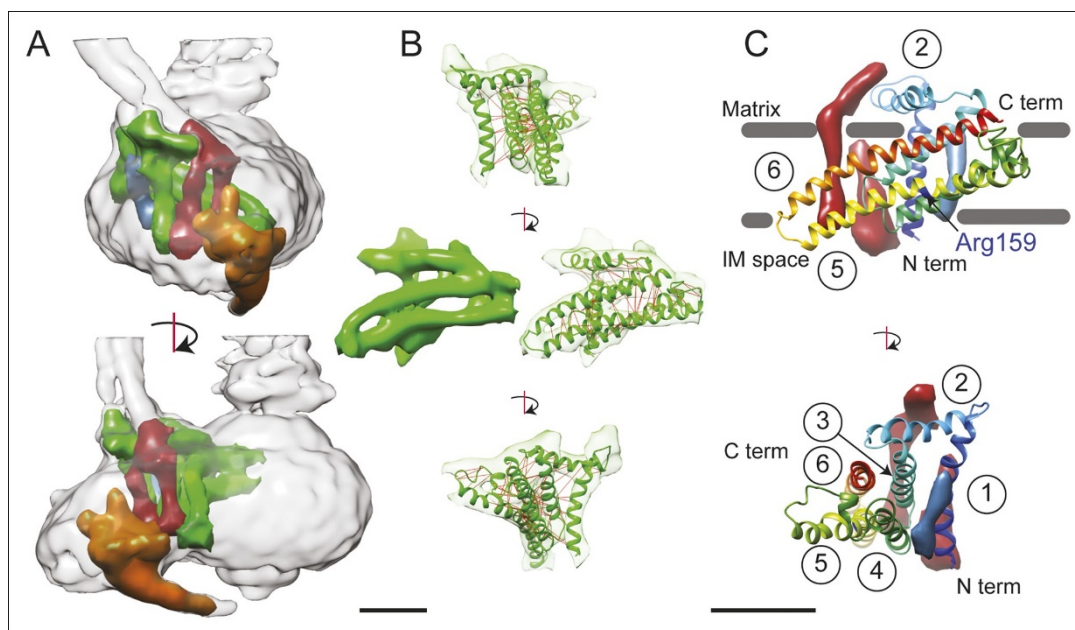
Přestože je díky svému významu F₁F₀ ATP-syntáza intenzivně zkoumaným enzymem, stále se nepodařilo charakterizovat strukturu některých podjednotek F₀ domény. Kvůli jejich hydrofobicitě a zanoření do fosfolipidové dvouvrstvy je náročné membránové proteiny izolovat. Dosud je dobře známa pouze struktura *c*-oligomeru – tu lze získat spolu se solubilní F₁ doménou.

Savčí F₀ doménu tvoří *c*-kruh, protonový kanál *a*, hydrofobní část dimeru *b*, který je součástí periferního stonku, a tzv. „nadpočetné“ podjednotky *e, f, g, A6L, DAPIT* a *MLQ* (u těchto

nadpočetných proteinů neznáme jejich přesnou strukturu ani funkci; napříč organismy jsou konzervovány pouze podjednotky *a*, *b* a *c* (Stock, Leslie and Walker, 1999)).

Nejlépe charakterizovanou strukturou F_0 domény je *c*-kruh, který se u savců skládá z 8 monomerů (Watt *et al.*, 2010). Každý monomer je tvořen dvěma α -helixy propojenými krátkou polární smyčkou. Jednotlivé podjednotky jsou seskládány do kruhu – při pohledu shora lze pozorovat vnější a vnitřní kruh α -helixů, přičemž vně se nachází C-koncové α -helixy (délka 52 Å) a vnitřní kruh tvoří N-koncové α -helixy (41 Å) *c*-monomeru. Vnější kruh je pak ve středové části lehce zkroucený tak, že protomer svým tvarem trochu připomíná přesýpací hodiny. Ve svém nejužším místě má protomer průměr 42 Å, na svých vrcholech 47 Å. Savčí *c*-oligomer je se svými 8 monomery nejmenší pozorovaný ze všech F-ATPáz. (Stock, Leslie and Walker, 1999; Watt *et al.*, 2010).

Mnoho otázek v posledních letech vyvolává podjednotka *a*. Jako protonový kanál je esenciálním proteinem pro funkci ATP syntázy a bez její struktury nelze plně pochopit, jak je rotace *c*-kruhu spřažená s translokací H^+ . Dosud nejnovější poznatky o struktuře podjednotky *a* předkládá práce



Obr. 4 | 3D struktura F_0 domény

(A) Podjednotka *a* – zeleně, podjednotka *b* – červeně, A6L – modře; oranžově jsou vyznačeny domnělé části proteinů *e* a *g*. (B) Uspořádání podjednotky *a* v membráně. (C) Detailní vyobrazení 6 helixů podjednotky *a* (barevný přechod od modré až k červené značí strukturu proteinu od N k C konci. Modré a červené struktury jsou hydrofobní části podjednotek *b*, resp. A6L. Převzato ze Zhou a kol. (2015).

Zhou a kolektivu (Zhou *et al.*, 2015), které se podařilo i díky studiím F-ATPázy řasy *Polytomella sp.* (Allegretti *et al.*, 2015) a V-ATPázy *Saccharomyces cerevisiae* (Zhang *et al.*, 2016) získat detailnější

domnělou podobu F_0 domény na základě elektronové kryomikroskopie. Dle této studie je podjednotka *a* tvořena šesti α -helixy - pět z nich je zanořeno v membráně. N-konec tohoto proteinu zasahuje do mezimembránového prostoru mitochondrie, C-konec se nachází v matrix. První α -helix (počítáno od N-konce) je v kontaktu s helixy podjednotek *b* a A6L a celý druhý α -helix vyčnívá v horizontální poloze na matrixové straně membrány. Stejně jako v polytomelle třetí a čtvrtý α -helix pravděpodobně neprotínají celou membránu. Poslední dva dlouhé α -helixy jsou zkosené vzhledem k rovině membrány (podobně jako v polytomelle) a jsou v kontaktu s *c*-kruhem (Zhou *et al.*, 2015). Aktuální představa o organizaci F_0 domény je znázorněna na Obr. 4.

Nejméně je známo o tzv. „malých“ nebo také „nadpočetných“ podjednotkách ATP syntázy. Nadpočetnými byly nazvány proto, že nebyl nalezen jejich bakteriální ortholog a patrně by neměly mít přímou úlohu v syntéze ATP. Jsou jimi *e*, *f*, *g*, A6L, DAPIT (protein asociovaný s diabetem ve tkáních regulovaných inzulinem) a MLQ (dle prvních tří N-koncových aminokyselin proteinu) (shrnuje Walker, 2012). Jejich molekulové hmotnosti se pohybují mezi 6,3 – 11,4 kDa. Předpokládá se, že každý z těchto proteinů má jeden transmembránový α -helix a pravděpodobně se v enzymu nacházejí jen v jedné kopii. Také byla prokázána jejich uniformní topologie – N-konce jaderně kódovaných podjednotek se nacházejí v matrix mitochondrie, zatímco C-konce jsou lokalizovány v mezimembránovém prostoru (Lee, S. J. Ding, *et al.*, 2015).

Podjednotky *e* a *g* se nejspíš vyskytují distálně vzhledem k *c*-oligomeru v rámci F_0 domény; zřejmě se podílejí na dimerizaci ATP syntázy, jak bylo zjištěno u jejich orthologů u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (Brunner, Everard-Gigot and Stuart, 2002). Podjednotka *e* může mít navíc i část α -helixu vystupujícího z membrány na vnější straně (Zhou *et al.*, 2015). Podjednotka *f* se zdá být v sousedství předchozích dvou proteinů (Belogradov, Tomich and Hatefi, 1996).

Mitochondriálně kódovaný protein A6L (také ATP8) má opačnou topologii než všechny ostatní „malé“ podjednotky – jeho C-konec vyčnívá až cca 60-70 Å nad membránu do prostoru matrix mitochondrie, kde interaguje s podjednotkami *b*, *d* a F_6 periferního stonku. Je možné, že absence nebo poškození tohoto proteinu může vést k destabilizaci periferního stonku a F_0 domény, a tím pádem vážnému narušení syntézy ATP.

Nejnověji popsanými podjednotkami ATP syntázy jsou proteiny DAPIT a MLQ. O podjednotce MLQ pojednává samostatná kapitola 1.2.4.

DAPIT (také AGP dle prvních tří aminokyselin, nebo USMG5 – zvýšená exprese během růstu kosterních svalů (*up-regulated during the skeletal muscle growth*)) je 58 aminokyselin dlouhý

protein s jedním transmembránovým α -helixem (Meyer *et al.*, 2007) o molekulové hmotnosti 6 303 Da (Chen *et al.*, 2007). Poprvé byl identifikován v roce 2001 jako protein, který je asociovaný s tkáněmi regulovanými inzulínem (to jsou především kosterní svaly a tuková tkáň). Při podání streptozotocinu (STZ) potkanům lze navodit diabetes typu I (Päivärinne and Kainulainen, 2001), neboť STZ je toxickým analogem glukózy, který ničí pankreatické β -buňky produkcí kyslíkových radikálů a fragmentací DNA buněk. Vstupuje do nich přes jejich GLUT2 glukózový přenašeč (Szkudelski, 2001; Chaudhry *et al.*, 2013). Bez β -buněk pak není produkován inzulín potřebný pro regulaci hladiny glukózy v krvi a dochází k narušení glukózového i glykogenového metabolismu. V této studii bylo pozorováno, že v kontrolních potkanech je DAPIT mRNA nejvíce exprimována v kosterní a srdeční svalovině, které jsou citlivé vůči inzulínu, a také v mozku, který není inzulínem regulován. Po indukci diabetu typu 1 pomocí STZ došlo k poklesu mRNA v inzulín-senzitivních tkáních, zatímco v mozku nikoliv. Jak spolu ale DAPIT a diabetes souvisí, stále není jasné (Päivärinne and Kainulainen, 2001; Kontro *et al.*, 2012). To, že je DAPIT (spolu s MLQ) podjednotkou ATP syntázy, bylo zjištěno v roce 2007 dvěma na sobě nezávislými vědeckými kolektivy (Chen *et al.*, 2007; Meyer *et al.*, 2007). Dosud nejasná je stechiometrie podjednotky v ATP syntáze, která by mohla obsahovat jednu nebo méně kopií DAPIT na enzymový komplex (Chen *et al.*, 2007). Jediná doposud publikovaná studie utišení exprese DAPIT podjednotky navrhovala vliv tohoto proteinu na asemblici nebo degradaci ATP syntázy, neboť hladiny asemblovaného komplexu jsou v tomto případě sníženy (Ohsakaya *et al.*, 2011).

Periferní stonek

Periferní stonek je především α -helikální struktura ukotvená do membrány podjednotkou b F_0 domény. Podjednotka b pak vystupuje z membrány, kde s její horní hydrofilní polovinou interagují podjednotky d , F_6 a OSCP. Všechny podjednotky jsou pak v kontaktu s $\alpha\beta$ hexamerem – především podjednotka OSCP se svým N-koncem váže na N-terminální část jedné z α -podjednotek (shrnuje Walker, 2012). Všechny čtyři proteiny se v enzymu nacházejí ve stechiometrii 1:1:1:1 (Collinson *et al.*, 1996).

Periferní stonek má esenciální úlohu pro funkci enzymu – vazbou podjednotky a v membráně a $\alpha\beta$ hexameru v F_1 doméně tuto strukturu ukotvuje a brání otáčení $\alpha\beta$ hexameru pod tlakem centrálního stonku. Podílí se tak na spřažení translokace protonů a syntézy ATP.

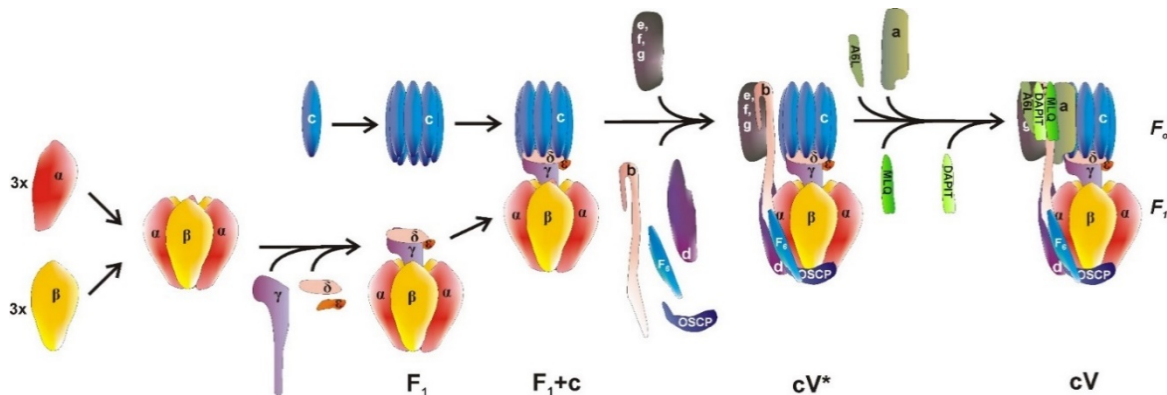
Asemblace

Asemblace ATP syntázy je komplikovaný proces, kdy musí dojít ke správnému sestavení celého enzymového komplexu z jednotlivých proteinů.

Jediné podjednotky ATP syntázy, syntetizované mitochondriálně jsou hydrofobní podjednotky α a A6L (Anderson *et al.*, 1981). Ostatní proteiny jsou produktem jaderné DNA – jejich syntéza probíhá v cytoplasmě a do mitochondrie jsou následně transportovány.

Dosavadní model biogeneze savčí F_1F_0 -ATP syntázy je stále hypotetický a z velké části založený na výzkumu procesu v mutantách *S. cerevisiae* (Rühle and Leister, 2015). Nejprve dojde k asemblaci F_1 domény v matrix mitochondrie (a to nezávisle na F_0 doméně i periferním stonku) a k sestavení c -kruhu ve vnitřní membráně. Kompletní F_1 subkomplex se pravděpodobně poté naváže na hotový c -kruh, následují podjednotky periferního stonku a malé podjednotky F_0 domény. Až nakonec se připojí oba mitochondriálně kódované proteiny α a A6L (Wittig *et al.*, 2010). Protonový kanál je poslední asemblovanou podjednotkou zřejmě proto, aby bylo zabráněno nežádoucí disipaci protonového gradientu nekompletním enzymem (Tzagoloff *et al.*, 2004). Proces asemblace je shrnut na Obr. 5.

Mimo samotných podjednotek se sestavování enzymu podílí tzv. asemblační faktory – tedy proteiny, které asociují s podjednotkami během asemblace a usnadňují jejich zabudování do vznikajícího komplexu, ale samy nejsou součástí finálního holoenzymu. Tyto proteiny se zásadně liší mezi vyššími a nižšími eukaryoty. Zatímco u *S. cerevisiae* byla identifikována celá řada faktorů



Obr. 5 | Hypotetické schéma asemblace ATP syntázy.

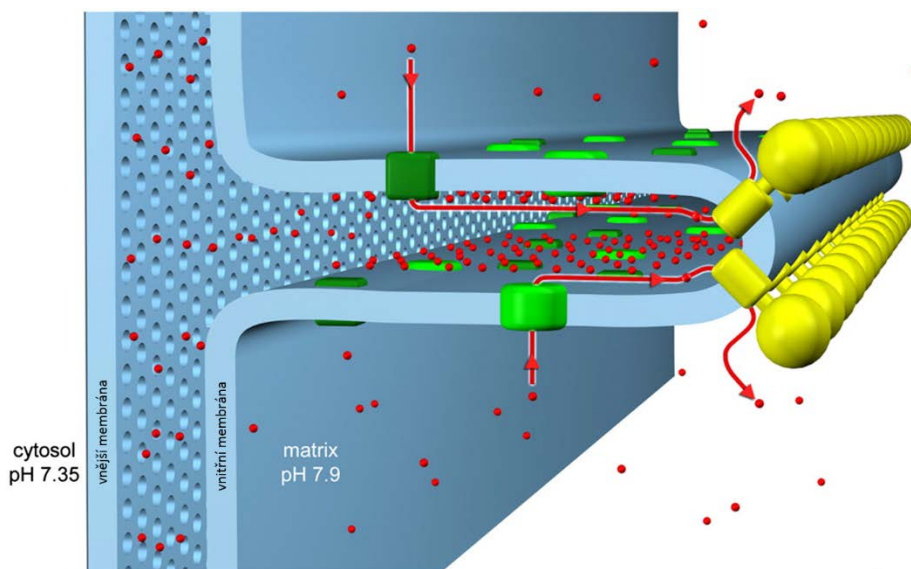
podílejících se na expresi (Nca1-3, Nam1, Aep1-3, Atp10, Atp22 and Atp25) nebo inkorporaci mtDNA-kódovaných podjednotek do enzymu (Atp10, Atp22, Atp23) (Tzagoloff *et al.*, 2004; Ackerman and Tzagoloff, 2005; Osman *et al.*, 2007; Zeng, Hourset and Tzagoloff, 2007; Zeng, Neupert and Tzagoloff, 2007; Zeng *et al.*, 2008), evoluční změny ve struktuře mtDNA genů i regulaci jejich exprese u savců vedly ke ztrátě těchto faktorů. Naopak vysokou míru sekvenční i funkční

konzervovanosti vykazují proteiny ATP11 a ATP12 - chaperony podjednotek α a β (Wang, White and Ackerman, 2001).

Nový asemblační factor TMEM70 byl objeven při hledání molekulární podstaty vzácného dětského onemocnění spojeného s izolovaným defektem ATP syntázy (Čížková *et al.*, 2008; Houštěk, Kmoch and Zeman, 2009). Mutace genu kódující tento protein jsou nejčastější příčinou ATP syntázových deficiencí s původem v jaderném genomu. Transmembránový protein vnitřní mitochondriální membrány TMEM70 se vyskytuje specificky u vyšších eukaroyot, patrně se účastní raných fází asemblace enzymu, ale jeho úloha není dosud přesně objasněna (Houštěk *et al.*, 1999; Hejzlarová *et al.*, 2011; Kratochvílová *et al.*, 2014).

Vyšší struktury ATP syntázy

Modrá nativní elektroforéza (BNE-PAGE) za standardních podmínek detekovala ATP syntázu pouze jako monomer, který si zachovává hydrolytickou aktivitu (Arnold *et al.*, 1999). Avšak šetrnější čistá nativní elektroforéza (CNE-PAGE) a elektronová mikroskopie dovolila studovat enzym ve fyziologickém stavu v membráně – ukázalo se, že ATP syntáza tvoří především homooligomerní struktury (dimery a složitější struktury) v savcích, ale i v jiných organismech (Arnold *et al.*, 1998; Schagger and Pfeiffer, 2000; Krause *et al.*, 2005; Strauss *et al.*, 2008). Přímá vazba mezi ATP syntetickou aktivitou a organizací enzymu do vyšších strukturních celků není jasná, ale ukazuje se, že dimery F_1F_0 -ATP syntázy se pravděpodobně podílí na formování krist – byl pozorován výskyt dimerů enzymu na zakřivených membrány (Dudkina *et al.*, 2005; Davies *et al.*, 2012). Některé termodynamické teorie pak navrhují, že v apexech krist se tvoří vyšší gradient pH, umožňující vyšší účinnost produkce ATP (Obr. 6) (Davies *et al.*, 2011).

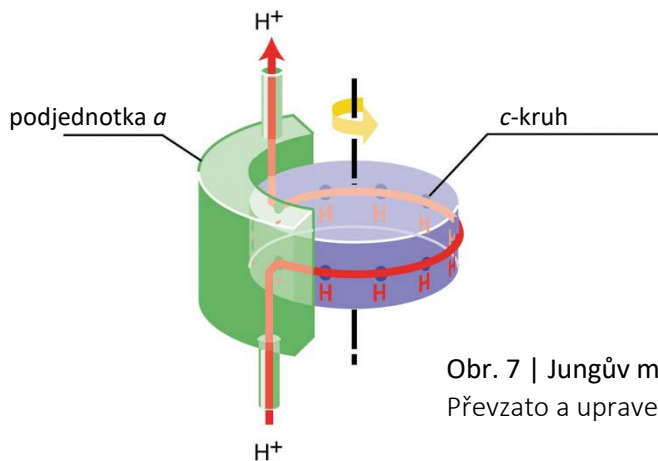


Obr. 6 | Dimery ATP syntázy v zakřiveních krist.

Dimery ATP syntázy (žlutě) na místě ohybu krist. Protony (červeně) jsou pumpovány do vnitřního prostoru krist komplexy respiračního řetězce (zeleně). Toto uspořádání umožňuje tvořit lokální pH gradient. Převzato a upraveno z Davies a kol. (2011)

Funkce

Esenciální funkcí F_1F_0 -ATP syntázy je produkce ATP. Enzym zužitkovává protonový gradient vybudovaný respiračním řetězcem k syntéze ATP z ADP a P_i . H^+ nacházející se v intermembránovém prostoru ve vyšší koncentraci přicházejí k protonovému kanálu a , kde se navážou na negativní karboxylovou skupinu aspartátu nebo glutamátu podjednotky c . Neutralizovaná karboxylová skupina oslabí interakci s konzervovaným argininem podjednotky a a Brownovým pohybem se c -kruh otáčí proti směru hodinových ručiček, než je jeho poloha fixována interakcí Glu/Asp sousedního monomeru s Arg podjednotky a . Tím se první Glu/Asp s navázaným H^+ ocitnou v hydrofobním prostředí lipidové dvojvrstvy a na sousedním monomeru probíhá další kolo protonace. Po proběhnutí celé otáčky příslušného monomeru je neutralizovaný Glu/Asp vystaven do druhé části protonového kanálu, kde se obnoví negativní náboj na aminokyselinovém zbytku a proton difunduje do mitochondriální matrix. Tento dnes již učebnicový model mechanismu rotace představil Wolfgang Junge (Obr. 7) (Junge, Lill and Engelbrecht, 1997), ale protože ještě neznáme přesnou strukturu protonového kanálu, model není kompletní.



Obr. 7 | Jungův model rotace c-kruhu
Převzato a upraveno z Walker 2013.

Na základě Mitchellovy chemiosmotické teorie vyslovil Paul. D. Boyer (Boyer, 1975) hypotézu mechanismu syntézy ATP, kdy se domníval, že rotace ATP syntázy poháněna membránovým potenciálem nebo protonací/deprotonací nabitých skupin enzymu by mohla být spřažena s protonovým tokem přes membránu. Rotace enzymu pak mění konformaci katalytického místa, což vede k přímé chemické syntéze ATP (tzv. „*binding-change mechanism*“). Tato hypotéza byla potvrzena po objasnění struktury F_1 -ATP syntázy ve vysokém rozlišení Johnem E. Walkerem a kol. (Abrahams *et al.*, 1994). Že dochází k ATP-dependentní rotaci centrálního stonku enzymu vzhledem k imobilizovanému $\alpha\beta$ hexameru, bylo přímo pozorováno skupinou Hiroyukiho Noji (Noji *et al.*, 1997).

Jak se c-oligomer pohybuje, otáčí podjednotkami γ , δ a ϵ – podjednotka γ pak interaguje svým asymetrickým vrcholem s vnitřním rozhraním $\alpha\beta$ hexameru, čímž mění konformaci v podjednotkách β . Hexamer má tři katalytická místa v β monomeru na rozhraní s α podjednotkou, která zaujímají tři různé stavy – „*open*“ (otevřený), „*loose*“ (volný) a „*tight*“ (těsný). Každý stav má rozdílnou afinitu k nukleotidům; v otevřeném stavu nukleotidy vázány nejsou (označení pro takovou konformaci je β_E), ve volném (β_{DP}) se v katalytickém místě nachází ADP i P_i , ale k syntéze ATP dochází až po uzavření katalytického místa ve stavu těsném (β_{TP}). Otočení podjednotky γ nejdříve o 80° a poté o 40° vede ke vzniku jednoho ATP (Masaiki *et al.*, 2008). Během celého cyklu (otočení centrálního stonku o 360°) dojde k syntéze celkem tří molekul ATP.

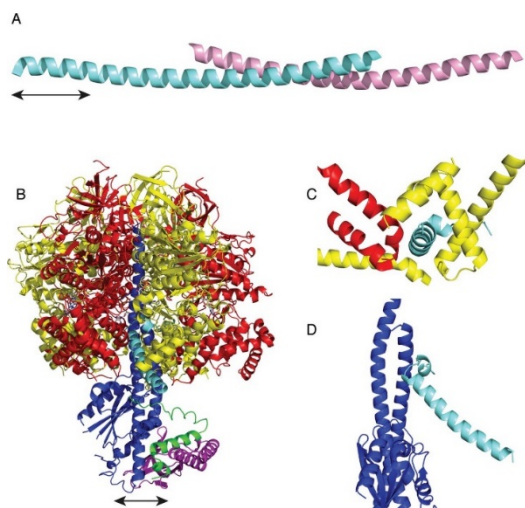
Efektivita celého procesu je dána počtem monomerů, ze kterých je složena podjednotka c. Nejeftektivnější je proto c-oktamer, který je přítomen pravděpodobně u všech mnohobuněčných živočichů – osm monomerů znamená 8 H^+ potřebných k otočení centrálního stonku o 360° -

na jednu molekulu ATP je tedy potřeba 2,7 H⁺. Ostatní skupiny organismů mají c-kruh složený z 10 až 15 monomerů – pro tvorbu jednoho ATP je pak potřeba 3,3 – 5 H⁺ (Watt *et al.*, 2010).

Hydrolytická aktivita ATP syntázy a protein IF1

Za fyziologických podmínek přispívá ATP-syntáza k depleci protonového elektrochemického gradientu ($\Delta\mu_{H^+}$) difúzí H⁺ po koncentračním gradientu přes protonový kanál *a* zpět do matrix mitochondrie za syntézy ATP. Dojde-li k výraznému poklesu $\Delta\mu_{H^+}$ např. při poškození OXPHOS nebo při vyčerpání substrátů OXPHOS (při ischemii, hypoxii), ATP syntáza obrátí svou katalytickou činnost a začne aktivně pumpovat H⁺ z matrix do mezimembránového prostoru mitochondrie za hydrolýzy ATP. Tímto mechanismem dochází k opětovnému vybudování membránového potenciálu ($\Delta\Psi_m$), který je nezbytný pro řadu dějů, včetně importu proteinů do mitochondrie (shrnuje Faccenda and Campanella, 2012). V přírodě tohoto mechanismu využívají fakultativně anaerobní bakterie, v mitochondriích však dochází k zbytečnému plýtvání cytoplasmatických zásob ATP (Walker, 1994).

Proteinem, který by měl zabránit reverzi funkce ATP syntázy, je IF1 (inhibiční faktor 1, obr. 8) (Pullman and Monroy, 1963). Jedná se o bazický 10kDa protein, jehož homology nalezneme u savců, kvasinek a rostlin. Lidský IF1 je složen z 81 aminokyselin. Nachází se především v matrix mitochondrie, ale byl nalezen i cytosolu, plasmatické membráně a dokonce v extracelulárním prostředí (shrnuje Faccenda and Campanella, 2012).



Obr. 8 | IF1 a jeho interakce s ATP syntázou
(A) Struktura homodimeru IF1.
(B) Monomer IF1 proteinu (tyrkysově) inhibující ATP syntázu.
(C) Vazebné místo pro IF1 mezi α -helixy C-koncové domény α_{DP} (červeně) a β_{DP} (žlutě) podjednotek.
(D) Interakce IF1 s γ podjednotkou (modře).
Na obr. 8 (B) podjednotka δ zeleně, podjednotka ϵ fialově.
Převzato z Walker 2013.

IF1 je specifickým inhibitorem hydrolýzy ATP a existuje ve dvou oligomerních stavech v závislosti na pH – při nízkém pH (<6,7) tvoří protein homodimer ze dvou α -helixů tvořících svými C-konci antiparalelní nadšroubovici. Při pH 8 převažuje inaktivní homotetramer IF1 a vyšší struktury. Při pH 6,5 jsou tetramery a dimery proteinu v rovnováze (E. Cabezón *et al.*, 2000). Rozpadem tetrameru

dojde k odhalení dvou sekvencí na N-koncích IF1 dimeru, které se mohou vázat na dvě F_1 domény zároveň (E Cabezón *et al.*, 2000). Protein inhibuje ATP syntázu vazbou do katalytického rozhraní mezi α_{DP} a β_{DP} jednotky (Cabezón *et al.*, 2002).

IF1 je důležitým onkogenním markerem – je nadprodukován v některých typech nádorů. Inhibicí ATP syntázy totiž dochází k aktivaci aerobní glykolýzy, což je jev známý jako Warburgův efekt. Také může zajišťovat ROS signalizaci vedoucí k prevenci apoptózy (Sánchez-Aragó *et al.*, 2013; Hardonnière *et al.*, 2017).

Mitochondriální pór přechodné propustnosti

Existuje hypotéza, že by mohla F_1F_0 -ATP syntáza hrát roli ve tvorbě mitochondriálního póru přechodné rozpustnosti (MPTP) (Giorgio *et al.*, 2009, 2013) – jedná se o pór otevírající se za příliš vysoké koncentrace Ca^{2+} v mitochondriální matrix, který pak nespecificky propouští molekuly do velikosti 1 500 Da (Halestrap *et al.*, 1998). Struktura MPTP je ale stále nejasná, tato hypotéza ještě nebyla přesvědčivě dokázána. Zatímco některé publikace navrhují, že pór tvoří entitou je podjednotka c mitochondriální ATP syntázy (Bonora *et al.*, 2013; Alavian *et al.*, 2014), jiné tuto hypotézu poměrně přesvědčivě vyvracejí (He *et al.*, 2017)

1.2.4 MLQ

MLQ (6,8 kDa proteolipid nebo C14ORF2) byl poprvé izolován z hovězího srdce v roce 1989 chloroform/methanolovou extrakcí (Terzi *et al.*, 1990). Dvěma na sobě nezávislým vědeckým kolektivům se podařilo potvrdit, že MLQ a DAPIT jsou podjednotkou ATP syntázy. Podařilo se jim izolovat celý enzymový komplex za přítomnosti exogenních membránových fosfolipidů a/nebo za použití slabých detergentů (digitonin, n-dodecyl- β -D-maltosid (DDM)) v nízkých koncentracích (Chen *et al.*, 2007; Meyer *et al.*, 2007). Díky snadné disociaci obou proteinů z enzymového komplexu při použití silnějších detergentů, které jsou běžně používány v krystalografických studiích, nebyla dříve asociace obou proteinů s ATP syntázou zaznamenána. Zároveň bylo ukázáno, že MLQ je součástí monomerů i dimerů ATP syntázy (Chen *et al.*, 2007; Meyer *et al.*, 2007).

Struktura

Jedná se o krátký zásaditý polypeptid složený z 58 aminokyselin (Obr. 9). Molekulová hmotnost lidského proteinu je 6 662 Da. Má jeden předpokládaný hydrofobní α -helix, který zřejmě tvoří transmembránovou doménu (Meyer *et al.*, 2007). Stechiometrie proteinu v enzymu není zatím známa. Zatímco u proteinu DAPIT se podařilo stechiometrii odhadnout díky přítomnosti právě

jednoho cysteinu v jeho struktuře, který umožnil radioaktivní značení jodoacetamidem (Chen *et al.*, 2007), u MLQ není možno tento přístup využít, neboť cystein neobsahuje. Dosud nebyly publikovány ani žádné posttranslační modifikace MLQ proteinu.

MLQSIKNIWIPMKPYTKVYQEIWIGMGLMGFIVYKIRAADKRSKALKASAPAGHH

Obr. 9 | Aminokyselinová sekvence proteinu MLQ

Protein má své orthology u obratlovců, zatímco v kvasinkách *S. cerevisiae* a v jiných houbách homology nalezeny nebyly (Chen *et al.*, 2007; Meyer *et al.*, 2007).

Obě práce naznačují velmi slabou interakci proteinu s enzymem a absence MLQ neměla žádný dopad na katalytickou aktivitu izolovaného enzymu. I vzhledem k nízké konzervovanosti MLQ lze předpokládat, že se nebude přímo významně podílet na syntéze ATP (Meyer *et al.*, 2007).

Funkce

O funkci MLQ byla dosud publikována pouze jedna studie. Fujikawa a kol. (Fujikawa *et al.*, 2014) vytvořili buněčný model se sníženou expresí (tzv. knock-down, KD) mRNA MLQ v HeLa buňkách pomocí shRNA. Ve dvou buněčných liniích se podařilo snížit množství mRNA na 40 %, respektive na 10 % oproti kontrolním buňkám. S touto změnou korespondovalo snížení hladiny MLQ proteinu, stejně jako nižší obsah α a β podjednotek, i celého ATP syntázového komplexu. Žádnou z použitých protilátek nebyly detekovány jakékoliv formy asemblačních subkomplexů. Jelikož hladiny mRNA pro podjednotky α a β byly nezměněny, usoudili Fujikawa a kol., že proteosyntéza v poškozených buňkách zůstala nenarušena, a α a β proteiny jsou, stejně jako ostatní podjednotky, rychleji degradovány v KD buňkách až po neúspěšném zabudování do enzymového komplexu. Mitochondriální produkce ATP byla v KD buňkách nižší v porovnání s kontrolami, což korespondovalo se sníženým obsahem ATP syntázy. Komplexy dýchacího řetězce a membránový potenciál defektem MLQ narušeny nebyly.

Co se týká fenotypu buněk samotných, KD buňky rostly pomaleji než ty kontrolní. Výměnou glukózy za galaktózu v kultivačním médiu poukázali vědci na zvýšenou závislost na ATP produkovaném v glykolýze v KD buňkách. V bezglukózovém médiu zemřelo během dvou dnů 30 % KD buněk, zatímco zdravých buněk ubylo jen 10 %.

Na základě získaných dat Fujikawa a kol. přisuzují MLQ stabilizační roli. Stejně jako u proteinu DAPIT, jehož funkční studie pochází ze stejné laboratoře, předpokládají, že MLQ bude mít zásadní roli na stabilitu a sestavování celého komplexu. Na stabilizační funkci poukazuje i nedávná studie,

která se zaměřila na síťování (crosslinking) podjednotek membránové části ATP syntázy a ukázala strukturní blízkost v rámci enzymového komplexu mezi proteiny MLQ, DAPIT, *e* a *f* (Lee, S. Ding, *et al.*, 2015).

2 Cíle práce

Obecným cílem této diplomové práce bylo objasnit roli proteinu MLQ ve struktuře, sestavování a funkci F_1F_0 ATP-syntázy. Dílčí cíle práce zahrnují:

1. Připravit buněčný model s deficiencí proteinu MLQ
2. Popsat vliv deficiencie MLQ na sestavování (asemblaci) a strukturu ATP syntázy pomocí elektroforetických metod
3. Objasnit vliv absence MLQ na funkci oxidační fosforylace

3 Materiály a metody

3.1 Seznam použitých chemikálií

6-aminohexanová kyselina	Sigma-Aldrich (USA)
ADP	Sigma-Aldrich (USA)
Agaróza	Sigma-Aldrich (USA)
Akrylamid	SERVA (Německo)
Askorbát	Sigma-Aldrich (USA)
Bisakrylamid	SERVA (Německo)
Ampicilin	Sigma-Aldrich (USA)
Aurovertin	Sigma-Aldrich (USA)
Bradfordovo činidlo	Bio-Rad, USA
Bis-Tris	Sigma-Aldrich (USA)
BSA (hovězí sérový albumin)	Sigma-Aldrich (USA)
Digitonin	Sigma-Aldrich (USA)
DMM	Sigma-Aldrich (USA)
DMSO	Sigma-Aldrich (USA)
DMEM + GlutaMax™	Thermo Fisher Scientific (USA)
EDTA	Sigma-Aldrich (USA)
EGTA	Sigma-Aldrich (USA)
Ethanol	Penta (ČR)
FBS (plodové hovězí sérum)	Thermo Fisher Scientific (USA)
FCCP	Sigma-Aldrich (USA)
Glukóza	Sigma-Aldrich (USA)
Glutamát sodný	Sigma-Aldrich (USA)
Glycerol	Sigma-Aldrich (USA)
HEPES	Sigma-Aldrich (USA)
Chloroform	Sigma-Aldrich (USA)
Imidazol	Sigma-Aldrich (USA)
Isopropanol	Sigma-Aldrich (USA)
Kanamycin	Sigma-Aldrich (USA)
KCN	Sigma-Aldrich (USA)
Malát sodný	Sigma-Aldrich (USA)
Malonát	Sigma-Aldrich (USA)
2-Merkaptoethanol	Sigma-Aldrich (USA)
METAFACTENE PRO	Biontex (Německo)
Methanol	Penta (ČR)
Myxothiazol	Sigma-Aldrich (USA)
NativeMark Unstained Protein Standard	Thermo Fisher Scientific

Laktino sušené mléko	ARTIFEX Instant (ČR)
LB Agar	Thermo Fisher Scientific (USA)
Oligomycin	Sigma-Aldrich (USA)
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific (USA)
Penicilin/streptomycin	Sigma-Aldrich (USA)
Peroxodisíran amonný	Bio-Rad, USA
Ponceau S	Sigma-Aldrich
PPP Master mix	Top-Bio (ČR)
Proteináza K	Roche (Švýcarsko)
Puromycin	Sigma-Aldrich (USA)
RNaseZap	Sigma-Aldrich (USA)
Rotenon	Sigma-Aldrich (USA)
SDS	SERVA (Německo)
Serva Blue G	SERVA (Německo)
Sukcinát sodný	Sigma-Aldrich (USA)
TEMED	SERVA (Německo)
TMPD	Sigma-Aldrich (USA)
Tris	Sigma-Aldrich (USA)
Tricin	Sigma-Aldrich (USA)
TRizol reagent	Thermo Fisher Scientific (USA)
Trypsin	Sigma-Aldrich (USA)
Tween-20	Sigma-Aldrich (USA)

3.1.1 Použité kity

DNA- <i>free</i> DNA Removal Kit	Thermo Fisher Scientific (USA)
EndoFree Plasmid Maxi Kit	QIAGEN (USA)
QIAamp DNA mini kit	QIAGEN (USA)
QIAquick PCR Purification kit	QIAGEN (USA)
SCRIPT cDNA Synthesis kit	Jena Bioscience (Německo)
SURVEYOR Mutation Detection Kit	Integrated DNA Technologies (USA)

3.2 Metody

3.2.1 Kultivace buněk HEK293

Pro vytvoření buněčných modelů MLQ KD (knock-down) a MLQ KO (knock-out) byly použity buňky HEK293 – buněčná linie odvozená z lidských embryonálních ledvinových buněk. Pokud není uvedeno jinak, byly buňky kultivovány v médiu DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) + GlutaMax™ s obsahem glukózy 4,5 g/L, 10% (v/v) FBS, 20 mM HEPES a antibiotiky (penicilin (10 U/mL) a streptomycin (10 µg/mL).

Kontrolní buňky HEK293 divokého typu i buňky s absencí MLQ proteinu byly pěstovány v 12 mL kultivačního média na kultivačních miskách o ploše 100 cm² (Ø 10 cm). Buňky byly přechovávány v termostatu při 37 °C v atmosféře s 5% CO₂.

Pasážování probíhalo při 80–100% konfluenci ve sterilním laminárním boxu. PBS (fosfátový pufr, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7,2–7,3) bylo používáno při pokojové teplotě, kultivační médium a roztok T+E (0,05% trypsin + 0,02% EDTA v PBS) byly předem vytemperovány ve vodní lázni na 37 °C. Po odsátí média byla kultivační miska promyta 5 mL a následně byly buňky vystaveny působení 1,5 mL T+E, čímž se během 3-5 minut uvolnily ze dna misky. Přidáním 5 mL kultivačního média byla tzv. trypsinizace inhibována. Suspenze buněk byla pak vyředěna kultivačním médiem v potřebném poměru, resuspendována a 1-3 mL napipetovány na novou misku s médiem.

Sklízení buněk probíhalo mimo sterilní box na ledu (4 °C). Médium z kultivační misky bylo slito do kádinky k pozdějšímu použití. Miska byla propláchnuta 5 mL PBS, trypsinizována 1,5 mL T+E (po dobu 3-5 min) a doplněna původním médiem do 10 mL celkového objemu. Po resuspendaci byla homogenní směs přenesena do 15 mL sterilních zkumavek a centrifugována 5 min při 300 g na centrifuze Sigma 3-K18 (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Německo). Supernatant byl odstraněn a pelet byl resuspendován v malém objemu vychlazeného PBS, kterým byla pak daná zkumavka doplněna do objemu 10 mL a centrifugována opět 5 min při 300 g. Promytí v PBS bylo opakováno pokaždé dvakrát. Po poslední centrifugaci byl pelet zamražen pro potřeby elektroforetických analýz, nebo resuspendován ve 150–300 µL PBS pro měření respirace v oxygrafu.

K centrifugaci byly využívány rotory SIGMA 11 133 a 12 131.

3.2.2 Stanovení koncentrace proteinu Bradfordovou metodou

Vzorky byly zředěny v poměru 1:10 v destilované H₂O (dH₂O), promíchány na vortexu a sonikovány mikrosondou po dobu 20 s při intenzitě 20 % v sonikátoru BANDELIN SONOPULS (BANDELIN electronic GmbH, Německo). Poté bylo odebráno 10 µL sonikovaného vzorku do čisté zkumavky s 990 µL dH₂O, promícháno na vortexu a opět sonikováno. Do každé zkumavky pak bylo přidáno 250 µL Bradfordova činidla (Bio-Rad, USA), promícháno na vortexu a inkubováno při pokojové teplotě po dobu 2 min. Obsah zkumavky byl přenesen do plastové polystyrenové květy o šířce 1 cm a byla změřena absorbance při vlnové délce 595 nm na spektrofotometru BioPhotometer (Eppendorf, Německo). Přesná koncentrace pak byla spočtena dle kalibrační přímky. Kalibrační standardy byly připraveny ze zásobního BSA o koncentraci 0,2 mg/mL – v 1 mL H₂O bylo 0, 4, 8, 16 nebo 20 µg BSA.

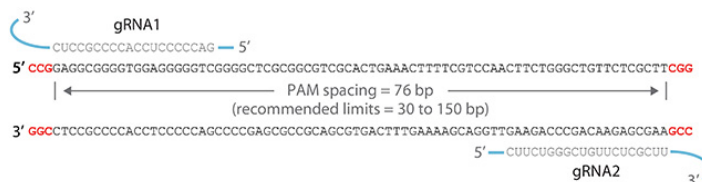
3.2.3 Buněčné modely

Původním modelem pro studium proteinu MLQ měly být HEK293 buňky se sníženou expresí proteinu MLQ, připravené pomocí technologie short hairpin RNA (shRNA). Po neúspěšném pokusu ustanovit takové studijní linie jsem se zaměřila na vytvoření modelu s inaktivovaným genem C14orf2, který kóduje protein MLQ.

Gen C14orf2 byl v HEK293 buňkách vyřazen pomocí technologie CRISPR s párovými Cas9 nikázami specificky cílenými pomocí dvou různých guideRNA (gRNA) (Ran, Hsu, Lin, *et al.*, 2013). CRISPR (nahromaděné, krátké palindromické repetice)/Cas (asociované s CRISPR) je původem bakteriální adaptivní imunitní systém, který bakterii brání před bakteriofágy a cizími plazmidy. Jde o formu tzv. získané imunity a funguje ve třech fázích. V první fázi dojde k imunizaci – po nákaze fágem či plazmidem rozpozná buňka cizí DNA a inkorporuje do CRISPR lokusu novou repetici a tzv. „spacer“ (mezerníková) DNA – tato krátká DNA je vmezeřena mezi dvě CRISPR repetice a je odvozena od DNA fága či plazmidu. Ve druhé fázi jsou tyto repetice a spacer DNA přepsány do prekurzoru, ze kterého pak vznikají CRISPR guide RNA (crRNA). V poslední fázi crRNA specificky rozpoznají cizí DNA, na kterou navedou efektorový komplex složený z Cas proteinů a cizorodá DNA je rozštěpena (Horvath and Barrangou, 2010; Marraffini and Sontheimer, 2010; Heler, Marraffini and Bikard, 2014).

Princip CRISPR/Cas9 byl následně modifikován s cílem vytvořit systém pro úpravu genomu. Cas9 endonukleáza *in vivo* vyžaduje duální RNA – komplex crRNA a transkripční crRNA (tracrRNA) – pro nalezení cílové DNA, kde poté indukuje dvouvláknový zlom. Sfúzováním 3' konce crRNA, který je

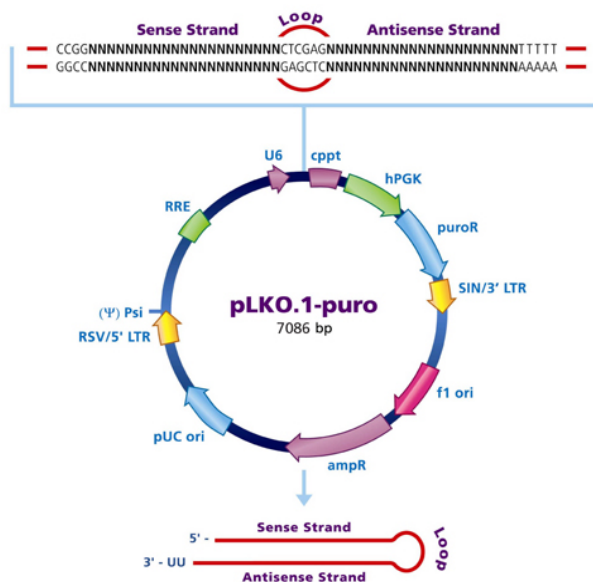
kompatibilní s cílovou sekvencí, a 5' konce tracrRNA, jehož vlásenková struktura zajišťuje interakci s Cas9, lze vytvořit jeden chimerický RNA duplex, který napodobuje duální RNA a stačí pro navedení Cas9 na vybranou sekvenci (Jinek *et al.*, 2012). V lidských buňkách ale za takových podmínek dochází k nežádoucí mutagenезi kvůli toleranci špatně spárovaných bází mezi gRNA a cílovou DNA (D'Agostino and D'Aniello, 2017). Pro knock-out genu MLQ byly proto použity ještě přesnější Cas9-D10A nikázy párované s dvěma chimérickými RNA duplexy (Obr. , kterou Ran a kol., autoři této metody, označili jako single-guide RNA (Ran, Hsu, Lin, *et al.*, 2013). V tomto případě je využita modifikovaná endonukleáza Cas9 s jednou aminokyselinovou záměnou (D10A), díky níž je inhibována nukleázová aktivita enzymu, což vede k aktivaci nikázové činnosti. Nikázy Cas9n produkují jen jednovláknové zlomy DNA – se dvěma párovanými sgRNA (jedna se váže na sense vlákno, druhá na antisense) jsou tak rekrutovány dvě nikázy Cas9n, které jsou aktivovány teprve po vazbě obou sgRNA na sekvenci dle našeho zájmu. Fungují simultánně, proto dojde ke vzniku 5'-koncových přesahů, které jsou následně opraveny za vzniku inzercí a delecí (Ran, Hsu, Lin, *et al.*, 2013). Pro to, aby k sestřihu došlo, je důležitá PAM sekvence, tj. sekvence sousedící s protospacerem (D'Agostino & D'Aniello, 2017). Oproti Cas9 je tedy pravděpodobnost působení Cas9n na jiných lokusech zredukována 50× až 1500× (Ran, Hsu, Lin, *et al.*, 2013).



Obr. 10 | Párované sgRNA (gRNA) nasedající na cílovou sekvenci

Převzato z sigmaaldrich.com

Pro silencing C14orf2 jsem využila knihovnu komerčně dostupných vlásenkových sekvencí dle konsorcia TRC (MISSION®, Sigma-Aldrich, USA), a vybrala pět různých shRNA vlásenek se sekvencemi komplementárními k exonu 2 genu C14orf2 a jednu kontrolní („scrambled“) vlásenku (Tab. 1). Sekvence vlásenek byly zaklonovány v plasmidu pLKO.1-puro, ve kterém je shRNA exprimována pod U6 promotorem. Amplifikaci plasmidu v bakteriích umožňuje gen pro ampicilinovou rezistenci a selekce stabilních eukaryotních linií se provádí na základě puromycinové rezistence (Obr. 11).



Obr. 11 | Schéma vektoru pLKO.1-puro

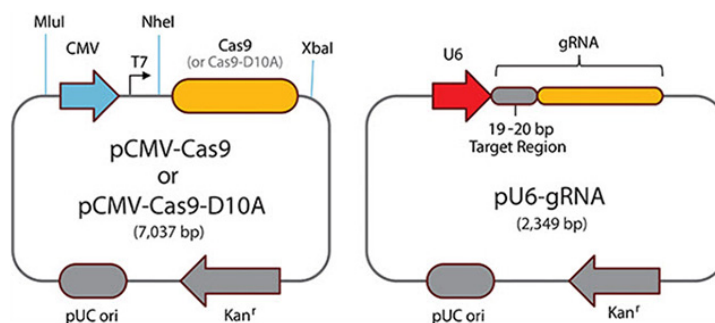
U6 – promotor pro expresi shRNA, ampR – gen pro rezistenci vůči ampicilinu pod bakteriálním promotorem (f1 ori); puroR gen pro rezistenci vůči puromycinu pod eukaryotickým promotorem (hPGK – promotor fosfoglycerát kinázy). Převzato z sigmaldrich.com

Tab. 1 | Vlášeny použité v tomto experimentu

Pracovní označení	TRC ID klonu	Cílová sekvence
shRNA 1	TRCN0000129698	CCAAAGTTTACCAGGAGATTT
shRNA 2	TRCN0000130571	CAGGCATACTCTGAGTAGATA
shRNA 3	TRCN0000129541	GAAGCCCTACTACACCAAAGT
shRNA 4	TRCN0000128535	CTACTACACCAAAGTTTACCA
shRNA 5	TRCN0000129409	GATCTGTGAGATGCACTGCTA

KO MLQ

Pro vyřazení funkce genu (knock-out, KO) *c14orf2* jsem využila komerčně dostupnou knihovnu gRNA vlásenek cílených na lidské geny (Sigma-Aldrich, USA). Z knihovny byly zvoleny tři gRNA nasedající na sense vlákno (označeny 4, 5, 6) a tři gRNA nasedající na antisense vlákno (označeny 1, 2, 3) exonu 2 genu *C14orf2* (Tab. 2), které jsem obdržela ve formě expresních plasmidů (Obr. 12). Zároveň byl pořízen expresní plasmid pro CAS9-10A nikázu fúzovanou s GFP exprimovanou pod CMV promotorem (Sigma-Aldrich, USA).



Obr. 12 | Schéma plasmidových vektorů pro Cas9 nikázu a gRNA

Cas9 nikáza je exprimována pod promotorem CMV, zatímco gRNA jsou exprimovány pod promotorem U6. Bakteriální selekce je umožněna přítomností genu pro kanamycinovou rezistenci (Kan^r). Převzato z sigmaaldrich.com

Tab. 2 | gRNA použité v tomto experimentu

Označení	gRNA ID	gRNA sekvence
1	HSL0000631276	GGTGTAGTAGGGCTTCATGGGG
2	HSL0000631277	TTGGTGTAGTAGGGCTTCATGG
3	HSL0000631278	GGTAACTTTGGTGTAGTAGGG
4	HSL0000631281	CAAAGTTTACCAGGAGATTTGG
5	HSL0000631282	TTTACCAGGAGATTTGGATAGG
6	HSL0000631283	CTTCATCGTTTATAAAATCCGG

Transformace a amplifikace plasmidů

Amplifikace plasmidů byla prováděna v bakteriích *Escherichia coli*. Plasmidy byly transformovány do kompetentních buněk DH5 α kmene *Escherichia coli* (ThermoFisher, USA). Do sterilní 1,5mL zkumavky s 50 μ L *E. coli* na ledu bylo přidáno po 1 μ L plasmidové DNA (1 ng DNA). Po 30min inkubaci na ledu byly buňky vystaveny teplotnímu šoku ve 42°C vodní lázni po dobu 20 s a následně byly

chlazený na ledu po dobu 2 min. Poté byly zkumavky umístěny do třepacího bločku předehřátého na 37 °C a bylo do nich napipetováno 950 µL předehřátého LB média. Při rychlosti 225 rpm pak byly buňky inkubovány 1 h při 37 °C. Bakteriální kultury byly pak rozetřeny na selekční bakteriologické plotny (LB médium + 1,5% agar) s přidaným ampicilinem (100 µg/mL; Sigma-Aldrich, USA) v případě KD MLQ, nebo kanamycinem (50 µg/mL, Sigma-Aldrich, USA) v případě KO MLQ očkovací kličkou a inkubovány 24 h při 37°C.

Izolace plasmidů

Pro izolaci plasmidů byl použit EndoFree Plasmid Maxi Kit (QIAGEN, USA). Vybrané izolované kolonie nasazené předchozí den byly zaočkovány do 15 mL falkonky se 3 mL LB média obohaceného o ampicilin (100 µg/mL) nebo o kanamycin (50 µg/mL) a inkubovány cca 8 h při 37 C za třepání při 300 rpm, čímž byla založena tzv. startovací kulturu. 200 µl startovací kultury bylo inokulováno do 100 mL selekčního LB média a inkubováno za stálého třepání za stejných podmínek dalších 14 h. Narostlé bakteriální kultury byly centrifugovány při 6000 g/15 min/4 C, supernatant byl odstraněn a z bakteriální pelety byl plasmid izolován dle instrukcí výrobce. Peleta byla resuspendována v 10 mL pufru P1 a následně lyzována přídávkem 10 mL pufru P2. Vzniklý viskózní lyzát byl promíchán opatrným otáčením zkumavek (4-6×). Zkumavky byly pak inkubovány 5 min při pokojové teplotě. Mezitím byly na QIAfilter Maxi Cartridge nasazeny zátky. Po inkubaci byl přidán vychlazený pufr P3 10 mL, jehož přídávkem došlo k neutralizaci suspenze a k precipitaci sraženiny obsahující genomovou DNA, proteiny, dodecyl sulfát draselný a zbytky buněk. Ihned po promíchání byla suspenze přelita do QIAfilter Cartridge a inkubována při pokojové teplotě 10 min. Po inkubaci byly odstraněny zátky z QIAfilter Cartridge a s pomocí pístu byl lyzát přenesen do čisté 50 mL zkumavky. Do filtrovaného lyzátu bylo přidáno 2,5 mL pufru ER (slouží k odstranění endotoxinu) a takto byla zkumavka promíchána otočením (10×) a inkubována 30 min na ledu. Během inkubace byly ekvilibrovány kolony QIAGEN-tip 100/500 - celý objem pufru QBT 10 mL kolonou volně protekl. Po 30 min inkubace byl lyzát nanesen do QIAGEN-tip kolony. Po odtečení tekutiny byla kolona promyta 2 × 30 mL puftrem QC. Nakonec byla kolona vložena do 50 mL sterilní zkumavky a DNA byla eluována 15 mL pufru QN. Eluovaná DNA byla precipitována 10,5 mL isopropanolu při pokojové teplotě a centrifugována při 15 000 g/30 min/4 °C. Supernatant byl opatrně odstraněn a DNA byla promyta 5 mL 70% endotoxin-free ethanolu při pokojové teplotě a znovu centrifugována při 15 000 g/10 min/4 °C. Supernatant byl slit a peleta byla sušena v otevřené zkumavce po dobu 5-10 min. Poté byla DNA rozpuštěna ve 200 µL TE pufru.

Koncentrace a čistota jednotlivých izolovaných plasmidových DNA byla změřena jako absorbance při 260 a 280 nm na přístroji NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 (ThermoFisher, USA).

Transfekce plasmidů do HEK293 buněk

Plasmidy byly do buněk zavedeny pomocí činidla METAFECTENE PRO (Biontix, SRN) – jedná se o transfekční činidlo tvořící liposomy ze směsi polykationických a neutrálních lipidů. HEK293 buňky byly kultivovány na dvanáctijamkové destičce v 1 mL kompletního média (DMEM + HEPES + FBS, bez antibiotik). Pro transfekci byly vybrány kultury, které pokrývaly alespoň 70 % plochy jamky. Nejprve byly připraveny 2 pracovní roztoky pro každý plasmid – první byly v čistých 500 μ L zkumavkách připraveny roztoky jednotlivých DNA ředěné v čistém DMEM o celkové koncentraci 2 μ g/ μ L DNA v objemu 100 μ L. Druhý roztok obsahoval 6 μ L transfekčního činidla v 94 μ L DMEM. Takto zředěný METAFECTENE byl následně ihned smíchán s plasmidovou DNA, neboť už po 5 minutách začne tvořit micely. Konečné roztoky byly inkubovány při pokojové teplotě po dobu 20 min, během které se vytvořily liposomy obsahující plasmidovou DNA.

Po 20 minutách byly jednotlivé transfekční roztoky opatrně přidány do jamek vybraných narostlých kultur HEK293 buněk a destičky byly pak inkubovány 4 h v inkubátoru při 37 °C v 5% CO₂ atmosféře, poté bylo odsáto médium s transfekční směsí a buňky byly dále inkubovány v kompletním DMEM i s antibiotiky.

Příprava MLQ KD modelu pomocí shRNA

Selekce buněčných linií se stabilní expresí shRNA vlásenek

Po 48 h od transfekce bylo buňkám vyměněno médium za médium obohacené o puromycin (1 μ g/ml; Sigma-Aldrich, USA) pro selekci úspěšně transfekovaných buněk. Jamky s netransfekovanými buňkami sloužily jako kontroly pro sledování působení selekčního antibiotika, netransfekované HEK293 buňky typicky umírají působením puromycinu během jednoho týdne. Selektivní médium bylo měněno každé tři dny, po 14 dnech selekce byla část buněk sklizena pro analýzu množství MLQ proteinu, část kultury byla zamražena v tekutém dusíku pro pozdější použití. Celkem bylo vytvořeno 12 stabilních linií (kontrolní pLKO NS1 a pLKO NS2, sh MLQ 1/1, sh MLQ 2/1, sh MLQ 3/1, sh MLQ 4/1, sh MLQ 5/1, sh MLQ 1/2, sh MLQ 2/2, sh MLQ 3/2, sh MLQ 4/2, sh MLQ 5/2).

Izolace jednotlivých klonů buněčných linií se stabilní expresí shRNA

Pro zajištění stabilní hladiny exprese shRNA vlásenek byly z puromycin-rezistentních buněk izolovány klony pocházející z jediné buňky. Puromycinem selektované buněčné linie byly sklizeny trypsinizací a jednou promyty kompletním DMEM médiem. Hustoty jednotlivých buněčných suspenzí byly spočteny pomocí přístroje Scepter 2.0 Cell Counter (Merck Millipore, SRN). Suspenze byly dále ředěny v několika krocích až na hustotu 20 buněk/mL a po 100 μ L rozpipetovány do jamek 96-jamkových destiček. Po 24 h byly destičky zkontrolovány pod mikroskopem a jamky obsahující jedinou buňku byly označeny. Vybrané kultury byly po dosažení konfluence pasážovány a přeneseny do destiček s větší plochou (nejprve do dvanáctijamkové, pak do šestijamkové, atd.). Část buněk z každé linie byla sklizena pro stanovení obsahu MLQ proteinu, část byla dále kultivována.

Příprava MLQ KO modelu

Selekce optimálních gRNA

Pro přípravu KO MLQ bylo nejprve třeba nalézt optimální gRNA pár, se kterým by byla inaktivace genu C14orf2 nejspěšnější. Bylo testováno osm různých kombinací – 1+4, 1+5, 2+4, 2+5, 2+6, 3+4, 3+5, 3+6. Kombinace 1+6 nebyla testována proto, že počet bází oddělující dvě sousední PAM sekvence je příliš nízký či vysoký a gRNA by nebyly funkční. Dvě transfekované kultury byly kontrolní – první postrádala Cas9 nikázu, druhá neobsahovala plazmidy pro gRNA. 72 h po transfekci byly buňky kompletně sklizeny pro analýzu mutagenese v cílovém místě.

Stejně bylo postupováno i při transfekci HEK293 pouze jedním vybraným párem gRNA, kdy 72 h po tranfekci byly buňky trypsinizovány, spočítány a suspenze buněk byla zředěna médiem na koncentraci 20 buněk/ml a rozpipetována do dvanácti 96-jamkových destiček. Jamky s kulturami založenými z jedné buňky byly označeny a při konfluentním pokrytí byly přepasážovány do destiček s větší plochou jamek. 92 úspěšně narostlých klonů bylo pak analyzováno na přítomnost MLQ proteinu SDS-PAGE elektroforézou a specifickou imunodetekcí.

Detekce mutované DNA

Pro detekci úspěšné mutagenese v jednotlivých liniích byl použit kit SURVEYOR Mutation Detection Kit (Integrated DNA Technologies, USA). Ten nespecificky detekuje přítomné mutace a polymorfismy v DNA pomocí Surveyor nukleázy, která rozpoznává a štěpí špatně spárované báze v důsledku delecí či inzercí.

Nejprve byla z transfekovaných buněk izolována genomová DNA pomocí QIAamp DNA mini kitu (QIAGEN, USA) podle protokolu výrobce. Koncentrace izolované genomové DNA byla změřena

na spektrofotometru NanoDrop a jednotlivé vzorky byly ředěny PCR čistou vodou na konečnou koncentraci 100 ng/μL.

Pro potřeby PCR byly použity dva primery pro gen *C14ORF2* (Generi Biotech, ČR), které jsou cíleny do intronů upstream a downstream k exonu 2 genu (exon 2 se nachází mezi 6378. a 6501. bp):

F (5'→3'): CCCTAGCAGTCATGGGAAATG

R (3'→5'): CGAAGGACTGTAGGTAGCTCTAA

Délka amplikonu je 363 bp.

DNA byla pak amplifikována pomocí PCR reakce, pro kterou jsem použila PPP Master mix (Top-Bio, ČR). V každé reakci bylo 12,5 μL PPP Master mix, 9,5 μL PCR čisté H₂O, oba primery (25mM) po 1 μL a nakonec 1 μL templátové DNA (100 ng/μL).

Protokol reakce

94 °C	1 min	1×
94 °C	15 s	25-35 cyklů
55 °C	15 s	
72 °C	1 min	
72 °C	7 min	1×
22 °C		

Úspěšnost amplifikace byla ověřena separací části PCR produktu na 1,5% agarózovém gelu. Zbýlý PCR produkt byl následně purifikován pomocí QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, USA), koncentrace DNA byla změřena na spektrofotometru NanoDrop a zředěna PCR čistou H₂O na 50 ng/μL.

Amplifikovanou DNA jsem potom podrobila analýze pomocí detekčního kitu SURVEYOR. Nejprve bylo nutno vytvořit DNA heteroduplexy tvořené naší testovanou DNA a referenční standardní DNA. Pro 10 μL reakci bylo v 0,2 mL zkumavce smícháno 2 μL referenční DNA (50 ng/μL) a 2 μL testované DNA, aby konečné množství DNA bylo 200 ng, a objem byl doplněn 6 μL PCR čisté H₂O. Následná hybridizace probíhala v Mastercycler® Gradient (Eppendorf, Německo) dle následujícího protokolu:

Protokol hybridizace

teplota	čas	rychlost snižování teploty
95 °C	10 min	
95 °C–85 °C		-2,0 °C/s
85 °C	1 min	
85 °C–75 °C		-0,3 °C/s
75 °C	1 min	
75 °C–65 °C		-0,3 °C/s
65 °C	1 min	
65 °C–55 °C		-0,3 °C/s
55 °C	1 min	
55 °C–45 °C		-0,3 °C/s
45 °C	1 min	
45 °C–35 °C		-0,3 °C/s
35 °C	1 min	
35 °C–25 °C		-0,3 °C/s
25 °C	1 min	
4 °C		

K hybridizované DNA byl na ledu přidán 1 µL roztoku 0.15 M MgCl₂, 1 µL SURVEYOR Enhancer S a 1 µL SURVEYOR Nuclease S. Obsah všech zkumavek byl opatrně promíchán a zkumavky byly inkubovány při 42 C/60 min. Po inkubaci byla reakce zastavena 1,3 µL Stop roztoku a vzorky byly dále analyzovány pomocí 1,5% agarózového gelu.

3.2.4 SDS-PAGE

Pro studium jednotlivých mitochondriálních proteinů byla zvolena elektroforéza za denaturujících podmínek (SDS-PAGE) s tricinovým pufrčním systémem, která je vhodná pro separaci proteinů menší hmotnosti (1-100 kDa) (Schagger, 2006). SDS (dodecylsulfát sodný) je anionický detergent rozrušující nekovalentní vazby, čímž rozkládá vyšší uspořádání proteinů. Tvoří pak komplexy SDS-protein – všechny separované proteiny mají uniformní záporný náboj a migrují tak pouze na základě své velikosti (Schägger and von Jagow, 1987).

Příprava vzorků

Vzorky na SDS-PAGE byly připraveny ze zamražených alikvotů peletovaných sklizených buněk MLQ KO a kontrol. Buňky byly lyzovány pomocí lyzačního pufru SLB (2% (v/v) 2-merkaptoethanol, 4% (w/v) SDS, 50 mM Tris (pH 7,0), 10% (v/v) glycerol, 0,02% Coomassie Brilliant Blue R-250) tak, aby se výsledná koncentrace proteinů pohybovala v rozmezí 2-5 mg proteinu/mL. Takto připravené vzorky byly sonikovány 3 min v lázni Bandelin Sonorex (BANDELIN electronic GmbH, Německo) a inkubovány 20 min při teplotě 40 °C.

Příprava gelu

Roztoky pro přípravu separačního a zaostřovacího gelu byly připravovány dle tab. 3 na ledu. Cca 4,5 mL 10% separačního gelu bylo napipetováno do vertikální elektroforetické aparatury (Mini-PROTEAN systém, tloušťka gelu 1 mm, Bio-Rad, USA) a byl převrstven vodou, aby bylo zabráněno inhibici polymerace vzduchem. Voda byla po ztuhnutí gelu odsáta, aby mohl být vytvořen hřebínek pro nanášení vzorku z 2,5 mL 4% zaostřovacího gelu.

Tab. 3 | Složení gelů pro SDS-PAGE

	Zaostřovací 4% gel [mL]	Separací 10% gel [mL]
	2,5 mL	10 mL
AB	0,20	2
3×GB	0,60	3,30
Glycerol 99%	0	1
dH ₂ O	1,68	3,64
APS	20 μL	50 μL
TEMED	2 μL	6 μL

- **AB** – 48% (hm.) akrylamid, 1,5% (hm.) *N,N'*-dimethylen bisakrylamid
- **3×GB** – gelový pufr – 75 mM imidazol, 1,5 mM 6-aminohexanová kyselina, pH 7,0)
- **APS** – 10% (hm.) peroxidisíran amonný
- **TEMED** – *N,N,N',N'*-tetramethylethylen-1,2-diamin

Průběh elektroforézy

Bylo pipetováno 4 μL standardu molekulové hmotnosti PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA) a příslušný objem vzorku tak, aby finální množství proteinu bylo 10-50 μg proteinu na jamku. Přesná množství jsou vždy uvedena v popisech obrázků ve výsledkové části. Do elektroforetické vany byl nalit anodový pufr (100 mM Tris-HCl; pH 8,9) a mezi elektroforetická skla byl nalit katodový pufr (100 mM Tris-HCl, 100 mM Tricin,

0,1% (w/v) SDS; pH 8,25). Počáteční napětí elektroforézy bylo 45 V, po zaostření migrace vzorků (čelo elektroforézy doputovalo do separačního gelu) bylo napětí změněno na 100 V.

3.2.5 Elektrotransfer na PVDF membránu – Western blot

Po dokončení elektroforézy bylo nutno přenést proteiny z gelů na polyvinylidenfluoridovou (PVDF) membránu (Immobilon FL 0,45 μm , Millipore Corporation, USA). Gely byly nejdříve 15-20 min ekvilibrovány v blotovacím pufru III (38 mM Tris, 10% (v/v) methanol, 10 mM glycin; pH 8,5). Membrána (pro 1 gel 7×10 cm, pro dva gely 14×10 cm) byla aktivována ve 100% methanolu (15 s), dále byla promývána 2 min v dH_2O a nakonec inkubována v blotovacím pufru II (25 mM Tris, 10% (v/v) methanol; pH 9,0) po dobu 5 min.

Samotný přenos probíhal v elektrickém poli mezi dvěma horizontálními grafitovými elektrodami. Na navlhčenou anodu bylo poskládáno 6 filtračních papírů (3MM, Whatman, UK) o velikosti PVDF membrány předtím namočených v blotovacím pufru I (0,3M Tris, 10% (v/v) methanol; pH 10,4), dále 3 filtrační papíry máčených v pufru II. Na ně byla položena PVDF membrána z pufru II, ekvilibrovaný gel a nakonec 6 filtračních papírů namočených v blotovacím pufru III. Tento sloupec byl přikryt katodou a transfer probíhal za konstantního proudu 0,8 mA/cm^2 po dobu 1 hod. Záporně nabitě proteiny migrují v elektrickém poli k anodě, tzn. směrem z gelu k PVDF membráně, na kterou se vážou.

Po přenosu byla membrána promývána 5 min s TBS (150 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl; pH 7,5), následovalo blokování membrány v 5% (w/v, ředěno TBS) sušeném beztučném mléce. Poté byla opláchnuta od zbytků mléka 2×10 min v TBST (0,1% (v/v) detergent Tween-20 v TBS), čímž byla připravena na imunodetekci.

Imunodetekce proteinů na PVDF membráně

Použité primární protilátky se nacházejí v tab. 4. Veškeré inkubace a promývání probíhaly za mírného kývání. Membrána byla inkubována v primární protilátce 2 hod při pokojové teplotě (nebo přes noc při 4 °C v chladové místnosti). Po inkubaci byla promyta v TBST 3×10 min. Poté byla membrána inkubována v sekundární protilátce konjugované s fluorescenční značkou (*Alexa Fluor 680 goat anti-mouse*, *donkey anti-goat* nebo *goat anti-rabbit IgG* (Thermo Fisher Scientific, USA, fluorescenční signál detekován při 700 nm) a *IRDye 800 goat anti-rabbit* nebo *anti-mouse IgG* (Rockland, USA, fluorescenční signál detekován při 800 nm), ředění 1:3 000 v TBST) po dobu 1 hod ve tmě. Pak byla membrána promyta v TBST 3×10 min a 10 min v TBS. Samotnou detekci proteinů

provedl fluorescenční skener Odyssey (LI-COR Biosciences, USA). Detekované signály byly následně kvantifikovány v programu AIDA Image Analyzer (Raytest Isotopenmessgeräte GmbH, SRN).

Tab. 4 | Seznam použitých primárních protilátek

Detekovaný protein	Katalogové číslo	Výrobce	Ředění	Typ
SDHA	ab14715	Abcam, UK	1:10 000	mo/M
UQCRC2	ab14745	Abcam, UK	1:1 000	mo/M
COX1	ab14705	Abcam, UK	1:1 000	mo/M
COX2	ab110258	Abcam, UK	1:1 000	mo/M
COX3	sc-23986	Santa Cruz Biotechnology, USA	1:200	gt/P
F ₁ -α	-	(Moradi-Ameli and Godinot, 1983)	1:1 000	mo/P
F ₁ -β	ab14730	Abcam, UK	1:2 000	mo/M
F ₁ -γ	GTX114275	GeneTex, USA	1:1 000	rb/P
F _o -a	-	(Dubot <i>et al.</i> , 2004)	1:500	rb/P
F _o -b	ab117991	Abcam, UK	1:1 000	mo/M
F _o -c	ab180919	Abcam, UK	1:1 000	rb/P
DAPIT	-	(Meyer <i>et al.</i> , 2007)	1:5000	rb/P
MLQ	14704-1-AP	Proteintech Group, USA	1:500	rb/P
aktin	MAB1501	Merck Millipore, USA	1:60 000	mo/M

Ředěno s TBST. Vysvětlivky – mo = myší, rb = králíčí, gt = kozí, M = monoklonální, P = polyklonální

3.2.6 Nativní elektroforézy

Tato metoda separuje hydrofobní i solubilní proteinové komplexy v jejich nativní konformaci a zároveň je zachována i jejich enzymatická aktivita. Pro solubilizaci proteinů se používají neionické detergenty, např. digitonin a dodecylmaltosid. Digitonin je z těchto detergentů nejméně agresivní, zachovává i supramolekulární interakce mezi multiproteinovými komplexy – lze s ním zkoumat i fyziologické protein-protein vazby bez využití chemického kroslinkování. Dodecylmaltosid je silnějším neutrálním detergentem, se kterým lze izolovat jednotlivé membránové proteiny a komplexy, ale proteinové komplexy se slabšími hydrofobními vazbami jsou obvykle disociovány. (Wittig, Braun and Schägger, 2006).

V této práci je využito dvou typů nativních elektroforéz – tzv. modré nativní elektroforézy (blue-native PAGE, BNE-PAGE) a čiré nativní elektroforézy (clear-native PAGE, CNE-PAGE). BNE-PAGE i CNE-PAGE jsou použity na gradientním polyakrylamidovém gelu – velikost pórů se se zvyšující se hustotou gelu zmenšuje. BN-PAGE využívá Coomassie Brilliant blue G-250 (CBB), která nese záporný náboj, který dodává i protein-detergentovým micelám. Při dostatečné (za daných podmínek saturující) koncentraci barvy proteiny migrující směrem k anodě pouze v závislosti na své velikosti (Wittig, Braun and Schägger, 2006). Při BN-PAGE může ale vlivem náboje CBB dojít k narušení slabých proteinových interakcí, a tudíž k disociaci některých částí multiproteinových komplexů – barva Coomassie se s neutrálním detergentem může chovat jako aniontový detergent. Alternativou k BNE-PAGE je pak šetrnější CNE-PAGE, kdy jsou proteinové komplexy separovány pouze na základě svého endogenního náboje. CNE-PAGE má sice nízké rozlišení v porovnání s BN-PAGE, proteiny během elektroforézy mohou agregovat a často nelze jednoznačně určit molekulovou hmotnost komplexů, ale bez CBB lze izolovat a odhalit fyziologické proteinové interakce v podobě, ve které to s BNE-PAGE nebylo předtím možné. CNE-PAGE v kombinaci s digitoninem je proto využívána např. pro studium superkomplexů v OXPHOS a oligomerů ATP syntázy (Wittig and Schägger, 2005).

Příprava vzorků pro nativní elektroforézu

Zamražené pelety izolovaných mitochondrií byly resuspendovány v solubilizačním pufru A (50mM NaCl, 50mM imidazol/HCl, 2mM 6-aminohexanová kyselina, 1mM EDTA; pH 7,0) do finální proteinové koncentrace 10 mg/mL. K 100 μ L alikvotům mitochondriální suspenze bylo přidáno 5 μ L 20% (w/v) dodecylmaltosidu (1 g DDM/1 g proteinu) nebo 10 μ L 20% (w/v) digitoninu (2 g DIG/1 g proteinu). Solubilizace probíhala na ledu 15 min, poté byly suspenze centrifugovány při 30 000 g/20 min/4 °C. Supernatant byl odebrán, byla změřena koncentraci proteinu a objem supernatantu. Přidala jsem k němu 5 μ L 50% (v/v) glycerolu a dále 5 μ L 5% (v/v) CBB pro vzorky

pro BNE-PAGE, nebo 5 μ L 0,1% (w/v) Ponceau S barvy s 50% (v/v) glycerolem v případě vzorků pro CNE-PAGE.

Příprava gelu

Polyakrylamidový gradientový gel 4-13% pro BNE-PAGE a 4-8% pro CNE-PAGE (Mini-PROTEAN III, Bio-Rad Laboratories, USA) byl připraven dle tab. 5 pomocí peristaltické pumpy (Cole-Parmer Instruments, USA), která vytvořila gradient smícháním 2,85 mL 4% gelu a 2,35 mL 13%, resp. 8% gelu; po napumpování byl gel převrstven vodou pro zamezení inhibice polymerace vzduchem, po ztuhnutí gelu byla voda odstraněna. Pro vytvoření hřebínku na nanášení vzorků byl gradientový gel převrstven 3,5 % zaostřovacím gelem.

Tab. 5 | Složení gelů

	Zaostřovací 3,5% gel [mL]	4% gel [mL]	8% gel [mL]	13% gel [mL]
	5 mL			
AB	0,37	0,42	0,8	1,3
3×GP	1,67	1,67	1,67	1,67
Glycerol 99%	0	0	1	1
dH ₂ O	2,83	2,89	1,5	1
APS	41,7 μ L	27 μ L	25 μ L	25 μ L
TEMED	4,17 μ L	2,7 μ L	2,5 μ L	2,5 μ L

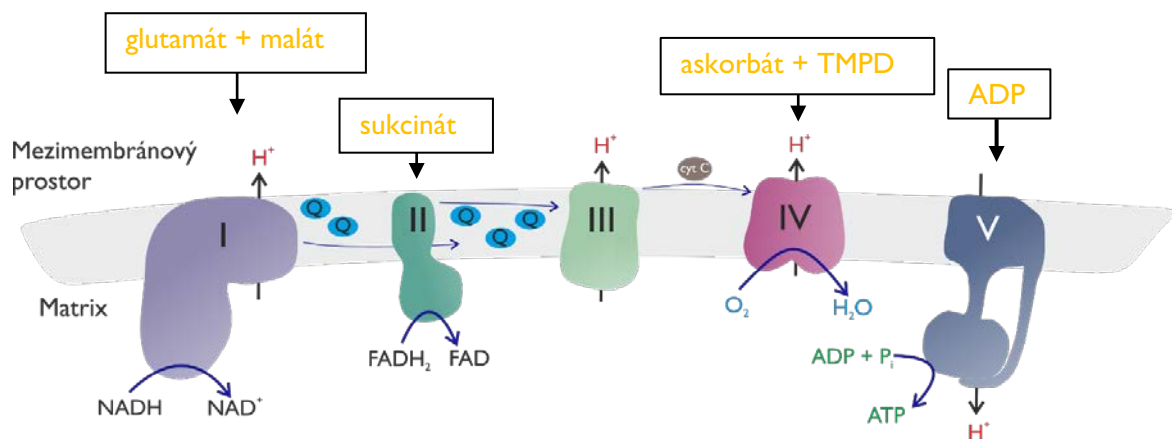
- **AB** – 48% (hm.) akrylamid, 1,5% (hm.) *N,N'*-dimethylen bisakrylamid
- **3×GP** – gelový pufr – 75 mM imidazol, 1,5 mM 6-aminohexanová kyselina, pH 7,0)
- **APS** – 10% (hm.) peroxidisíran amonný
- **TEMED** – *N,N,N',N'*-tetramethylethylen-1,2-diamin

Elektroforéza probíhala při 4 °C za konstantního napětí, nejprve při 45 V pro zaostření vzorků, poté při 120 V. V případě BNE-PAGE byl použit anodový pufr (25 mM imidazol; pH 7,0) a katodový pufr B (50 mM Tricin, 7,5 mM imidazol, 0,02% (w/v) CBB; pH 7,0) - ten byl po zaostření migrace vzorků vyměněn za katodový pufr B/10 (50 mM Tricin, 7,5 mM imidazol, 0,002% (w/v) CBB; pH 7,0). V případě CNE-PAGE byl použit stejný anodový pufr, ale jiný katodový pufr (50 mM Tricin, 7,5 mM imidazol; pH 7,0). Byl použit standard molekulové hmotnosti NativeMark Unstained Protein Standard (Thermo Fisher Scientific, USA).

3.2.7 Měření respirace pomocí přístroje OROBOROS

Respirometr nebo také oxygraf OROBOROS (Oxygraph-2k, OROBOROS INSTRUMENTS, Innsbruck, Rakousko) umožňuje měření spotřeby kyslíku (respirace) s vysokým rozlišením („high resolution respirometry“) v intaktních i permeabilizovaných buňkách, tkáních i v izolovaných mitochondriích. Principem této metody je měření koncentrace kyslíku v uzavřené komoře pomocí polarografických Clarkových elektrod za stálého míchání inkubačního média. Kyslíkový senzor je tvořen platinovou nebo zlatou katodou a Ag/AgCl anodou, jako elektrolyt slouží koncentrovaný KCl roztok. Spotřeba kyslíku je vypočítána jako negativní derivace koncentrace kyslíku v čase (vyjádřeno v $\text{pmol O}_2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteinu). Přístroj je propojen se softwarem *DatLab5* (OROBOROS INSTRUMENTS, Innsbruck, Rakousko), který data ukládá a analyzuje. Tento oxygraf je velmi citlivý a přesný a pro měření vyžaduje pouze malé množství vzorku (Gnaiger, 2008).

Buněčnou respiraci lze měřit na intaktních nebo permeabilizovaných buňkách v tzv. K-médiu, jehož složení napodobuje intracelulární prostředí (80 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 3 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA, 5 mM KH_2PO_4 , pH 7.3). Jsou-li buňky intaktní, zkoumáme tzv. rutinní respiraci, kdy buňka metabolizuje endogenní substráty. Pozorujeme tak přibližný fyziologický stav respirace v mitochondriích. Pokud buňky permeabilizujeme, dojde k narušení buněčné membrány a vylití buněčných metabolických intermediátů do média. Dodanými substráty či inhibitory v saturujících



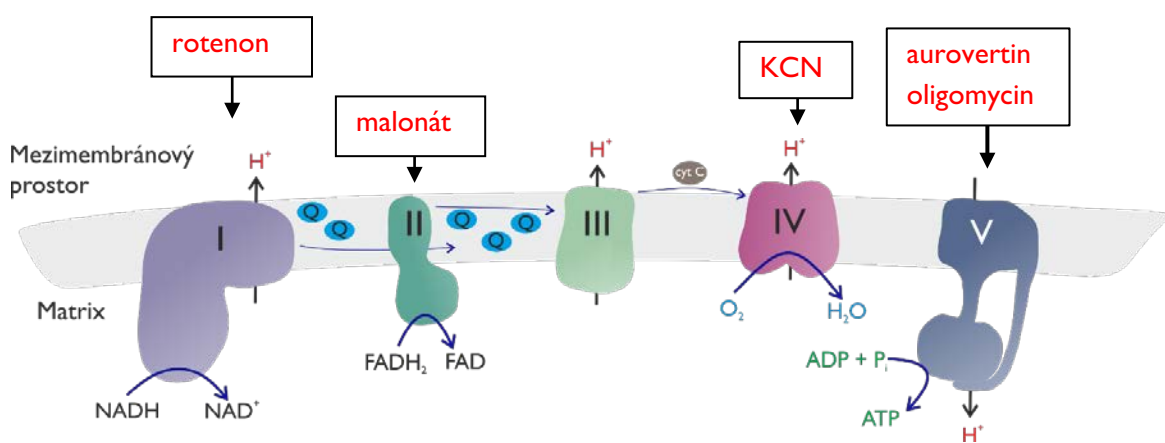
Obr. 13 | Substráty systému oxidační fosforylace

Glutamát a malát jsou oxidovány v citrátovém cyklu, který pak syntetizuje redukovaný koenzym NADH dodávající elektrony přes NADH dehydrogenázu (komplex I). Elektrony ze sukcinátu do dýchacího řetězce vstupují přes sukcinát dehydrogenázu (komplex II). Další elektrony je možné doplnit pomocí TMPD (*N,N,N',N'*-tetramethyl-*p*-fenylenediamin), který redukuje cytochrom *c*. Samo TMPD je udržováno v redukovaném stavu askorbátem, aby nedocházelo k autooxidaci TMPD. ADP je přidáno pro maximální saturaci ATP syntázy.

koncentracích do systému pak můžeme sledovat kapacitu jednotlivých komplexů či celého dýchacího řetězce jako celku (Obr. 13, Obr. 14) (Gnaiger, 2014).

Pro pozorování funkčních kapacit enzymů OXPHOS je nejprve nutné systém saturovat jejich substráty. Maximální funkční kapacity dýchacího řetězce lze dosáhnout za podmínek, kdy není limitován rychlostí fosforylace ADP. Toho se dosáhne inhibicí ATP syntázy oligomycinem (váže se na rozhraní protonového kanálu a *c*-kruhu v F_0 doméně) nebo aurovertinem (působí v F_1 doméně) (Hong and Pedersen, 2008) a následným rozpřažením oxidace a fosforylace pomocí chemického rozpřahovače např. FCCP (karbonylkyanid *p*-trifluoromethoxyfenylhydrazon). Při inhibici komplexu I rotenonem a přidávku sukcinátu pozorujeme aktivitu komplexu II (inhibice komplexu I zároveň brání akumulaci oxaloacetátu, kompetitivního inhibitoru komplexu II). Pokud inhibujeme komplex I a II rotenonem, resp. malonátem, zastavíme tím přenos elektronů na komplex III a potažmo i komplex IV. Tohoto stavu můžeme dosáhnout i inhibicí samotného komplexu III antimycinem A nebo myxothiazolem. Po dodání elektronů do systému z oxidace TMPD je možné zkoumat aktivitu komplexu IV, kterou je ale možné přesně určit až po odečtení míry autooxidace TMPD s askorbátem – tu zjistíme po inhibici komplexu IV pomocí KCN (Gnaiger, 2014).

Substráty a inhibitory (Tab. 6) jsou do komory pipetovány pomocí Hamiltonových mikrostřikaček (Hamilton, USA), a to buď ručně, nebo automaticky vsazením mikrostřikačky do titrační mikropumpy



Obr. 14 | Vybrané inhibitory systému oxidační fosforylace

Rotenon je přímým inhibitorem komplexu I, váže se do vazebného místa pro ubiquinon. Malonát je kompetitivním inhibitorem komplexu II a KCN je kompetitivním inhibitorem komplexu IV. Oligomycin a aurovertin inhibují ATP syntázu, kde oligomycin působí na rozhraní *c*-oligomeru a protonového kanálu F_0 domény, kdežto aurovertin se váže na doménu F_1 .

TIP2k (OROBOROS INSTRUMENTS, Innsbruck, Rakousko). Přidávky jsou aplikovány v tzv. „steady state“, tzn., když se signál pro spotřebu kyslíku ustálí.

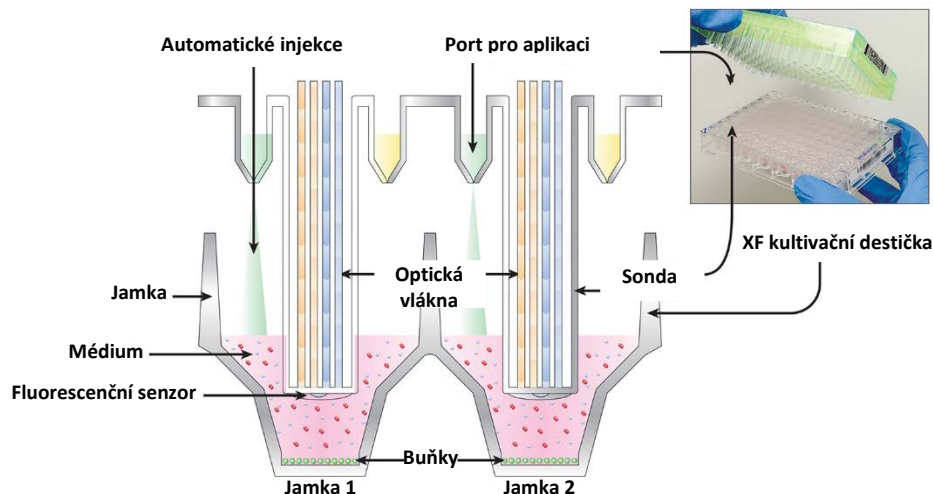
Měření probíhalo paralelně ve dvou komorách o objemu 2 mL při konstantních 30 °C za stálého míchání při 750 rpm. Buňky byly sklizeny dle postupu v kapitole 3.2.1. Po změření koncentrace proteinu byl do komory oxygrafu napipetován takový objem suspenze, aby konečné množství proteinu bylo 0,25 mg/mL. Buňky ve všech provedených měřeních byly permeabilizovány digitoninem. Rozpřažení oxidace a fosforylace bylo dosaženo titrací lipofilním ionoforem FCCP. Roztok ADP byl vždy připraven těsně před samotným experimentem.

Tab. 6 | Substráty a inhibitory použité při měření respirace

substrát	Zásobní koncentrace	Přidaný objem [μL]	Finální koncentrace
digitonin	20 mg/ml, 2% (w/v)	1,25	0.05 g/g protein
Glutamát	1 M	20	0,01 M
Malát	1 M	5	0,025 M
ADP	0,4 M	5	1 mM
sukcinát	1 M	20	0,01 M
Aurovertin	2 mM	1	1 μM
FCCP	1 mM	Titrace po 0,2 μL, následně po 0,1 μL	300-500 nM
Rotenon	1 mM	2	1 μM
Malonát	1 M	20	0,01 M
Askorbát	0,8 M	5	2 mM
TMPD	200 mM	10	1 mM
KCN	0,5 M	2	0,5 mM

3.2.8 Paralelní měření respirace a glykolytické kapacity buněk

Kromě oxygrafu OROBOROS můžeme respiraci měřit i v přístroji Seahorse Extracellular Flux (XF) Analyzer (Agilent Technologies, USA). Seahorse XF měří pomocí fluorescenčního senzoru koncentraci O_2 a hodnotu pH v médiu, ze kterých lze odečíst míru respirace (OCR – „oxygen consumption rate“), resp. glykolytickou aktivitu (ECAR – „extracellular acidification rate“) (Obr. 15). Získaná data jsou pak analyzována v softwaru Wave Desktop (Agilent Technologies, USA).



Obr. 15 | Schéma principu měření v Seahorse XF

Měření samotné probíhá v dočasné komůrce o objemu $7 \mu\text{L}$ vytvořené uzavřením jamky pomocí měřicí sondy. Klesající koncentrace O_2 nebo snižující se pH je snímáno v časovém intervalu 1,5 až 4 minuty. (Ferrick, Neilson and Beeson, 2008)

Zdroj obrázku: hpst.cz, upraveno

Výhodou Seahorse XF oproti oxygrafu Oroboros je kromě sledování glykolytické aktivity i možnost paralelního měření více vzorků v destičkách s 24 nebo 96 jamkami, menší množství potřebného buněčného materiálu a možnost měřit adherentní buňky za fyziologičtějších podmínek, kdy nejsou konstantně míchány v roztoku. Nevýhodou je omezený počet přísadků substrátů či inhibitorů během experimentu (Horan, Pichaud and Ballard, 2012) a vyšší náklady na změřený vzorek.

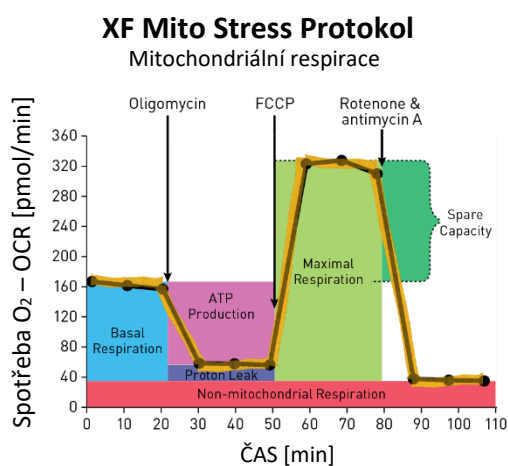
V tomto projektu byly měřeny intaktní buňky HEK293 porovnávané s MLQ KO klonem 12G10 v přístroji Seahorse XFe24. Den před měřením byly XF kultivační mikrodostičky V7-PS (Agilent Technologies, USA) potaženy poly-L-lysinem (Sigma-Aldrich, USA) pro lepší adhezi buněk. Do každé jamky bylo napipetováno $50 \mu\text{L}$ roztoku poly-L-lysinu, který byl po 10 min inkubace odmyt PBS. Koncentrace sklizených buněk byla měřena pomocí přístroje Scepter counter (Millipore, USA)

a suspenze byly zředěny kompletním DMEM médiem 600 tis buněk na mL. Následně bylo do každé jamky napipetováno 50 μ L suspenze (30 000 buněk) a destičky byly inkubovány v termostatu 2 h, než se buňky přichytily k podkladu. Poté bylo médium doplněno do celkového objemu 200 μ L na jednu jamku. Dvě jamky byly vždy ponechány bez nasazených buněk jen s médiem, aby bylo možné odečíst nespecifický signál pozadí. Takto připravená mikrodestička byla inkubována přes noc v termostatu. Po celou dobu přípravy bylo pracováno sterilně.

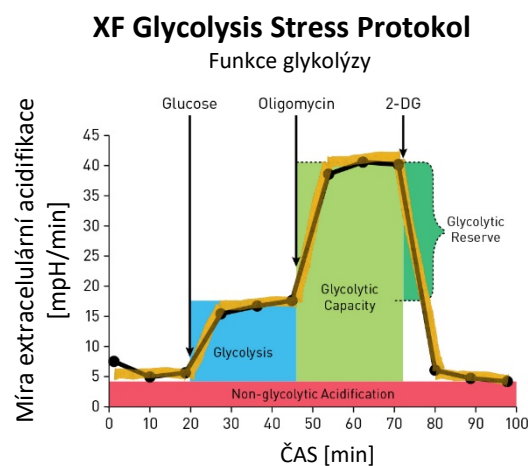
Senzory pro XF Analyzer byly před každým pokusem hydratovány v XF Calibrant roztoku (pH 7,4; Agilent Technologies, USA) přes noc při 37 °C.

V den měření byla mikrodestička s buňkami promyta v 1 mL XF Assay Medium Modified DMEM média (pH 7,4, 37 °C) a následně jsem napipetovala 500 μ L tohoto média s přidaným 0,2% (obj.) BSA a inkubovali v termostatu při 37 °C s atmosférou bez CO₂ po dobu 30 min. Během této doby byly napipetovány komponenty experimentu do portů nacházejících se na desce se sondami. Po kalibraci desky se sondami v hydratačním roztoku a nastavení programu byla deska s hydratačním roztokem vyměněna za mikrodestičku s buňkami a byl spuštěn experiment.

Pro měření respirace byl využit Mito Stress protokol (Obr. 16), pro sledování glykolytické kapacity bylo postupováno podle Glycolysis Stress protokolu (Obr. 17).



Obr. 16 | Schéma Mito Stress protokolu



Obr.17 | Schéma Glycolysis Stress protokolu

Odečtené hodnoty z měření byly následně normalizovány na skutečný počet měřených buněk (aby se vyloučil vliv rozdílné rychlosti proliferace jednotlivých klonů). K tomu posloužila ultracitlivá fluorescenční barva Quant-iT PicoGreen (Thermo Fisher Scientific, USA), která se váže na dsDNA.

Médium bylo z každé jamky odsáto a bylo nahrazeno 150 μL lyzačního pufru (0,02M Tris-HCl, 0,01M EDTA, 1% (w/v) SDS, dH_2O , proteináza K (0,05 mg/mL); pH 7,4) a buňky byly lyzovány 1 h při 37 °C. Do nové 96-jamkové destičky bylo napipetováno 150 μL TE pufru a stejný objem byl přidán k lyzovaným buňkám v Seahorse mikrodestičce. Následně bylo 50 μL lyzovaných buněk přepipetováno do 96-jamkové destičky s TE pufrem (původní suspenze je nyní zředěna 8 \times). Měření fluorescence probíhalo v duplikátech na čtečce mikrotitračních destiček TECAN Infinite M200 (Tecan Trading AG, Švýcarsko). Do 95 μL TE pufru v nové 96-jamkové destičce jsem napipetovala 5 μL zkoumaného vzorku nebo 5 μL standardní DNA (200 ng/ μL) pro kalibrační křivku (ve finálních koncentracích 400 ng/ μL , 200 ng/ μL , 150 ng/ μL , 100 ng/ μL , 50 ng/ μL a 5 ng/ μL). K tomuto roztoku bylo pak přidáno navíc 100 μL PicoGreen sondy zředěné 200 \times v TE pufru. Destičky pak byly inkubovány ve tmě při pokojové teplotě 2-5 min a následně změřeny. Získaný fluorescenční signál z jednotlivých jamek byl na základě kalibrační křivky přepočítán na množství DNA.

3.2.9 Izolace RNA z buněčné kultury

Abych se vyvarovala degradaci RNA, veškeré nástroje a pracovní místo byly ošetřeny RNaseZap (Sigma). Do každé jamky s konfluentně narostlými buňkami v šestijamkové destičce byl přidán 1 mL TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific, USA) a buňky byly sklizeny do 1,5 mL zkumavek. Do zkumavek bylo následně napipetováno 200 μL chloroformu, suspenze byla vortexována a inkubována při pokojové teplotě 10 min. Pak byly vzorky stočeny na centrifuze při 12 000 g/15 min/4 °C a do čisté zkumavky byla odebrána vrchní vodná fáze obsahující RNA (200-400 μL). K této vodné fázi bylo napipetováno 500 μL isopropanolu, obsah byl vortexován a inkubován 10 min při pokojové teplotě. Poté byly zkumavky stočeny při 12 000 g/10 min/4 °C a supernatant byl odstraněn. K RNA peletě bylo přidáno 200 μL 75% ethanolu vychlazeného na 4 °C a to bylo stočeno při 7 500 g/10 min/4 °C. Supernatant byl odstraněn a pelety jsem nechala vyschnout. Vysušené pelety byly resuspendovány v 15 μL H_2O bez RNáz.

3.2.10 Odstranění genomové DNA

Pro purifikaci RNA od DNA kontaminantů byl použit DNA-free DNA Removal Kit (Thermo Fisher Scientific, USA). K 15 μL roztoku s RNA jsem přidala 1,5 μL 10X DNase I pufr a 1 μL rDNase I a jemně zamíchala. Pak byly zkumavky inkubovány při 37 °C/30 min. Poté jsem do roztoku napipetovala 1,5 μL DNase Inactivation Reagent a lehce zamíchala. Po 2min inkubaci při pokojové teplotě byly vzorky stočeny při 10 000 g/1,5 min a supernatant byl odebrán do čisté zkumavky. Koncentrace RNA byla pak změřena na přístroji NanoDrop a RNA byla pak skladována v -80 °C.

3.2.11 Reverzní transkripce

Pro přepis z RNA do DNA byl použit SCRIPT cDNA Synthesis kit (Jena Bioscience, SRN), práce probíhala na ledu. Všechny jednotlivé RNA templáty byly ředěny PCR čistou H₂O na koncentraci 0,1 µg/µL. 10 µL reakci jsem do sterilních 0,2 mL zkumavek připravila dle tab. 7:

Tab. 7 | Složení 10µL reakce

Komponenta	Finální koncentrace	Pro 10 µL reakci [µL]
SCRIPT RT pufr	1×	2
dNTP mix	500 nM	0,5
DTT stock	5 mM	0,5
Inhibitor RNáz	20 U	0,5
Oligo dT primer	25 pmol	0,125
Náhodný primer	25 pmol	0,125
SCRIPT reverzní transkriptáza	50 U	0,25
H ₂ O bez RNáz		1
RNA templát		5 (0,5 µg)

Zkumavky s připravenými reakcemi byly vortexovány a krátce stočeny na stolní centrifuze. Reverzní transkripce proběhla v Eppendorf MasterCycler Gradient cykleru podle tohoto protokolu:

42 °C	10 min
50 °C	60 min
70 °C	10 min
20 °C	5 min
4 °C	∞

Ke vzniklé cDNA bylo přidáno 40 µL PCR čisté H₂O. Vzorky byly skladovány v -20 C.

3.2.12 Kvantitativní PCR v reálném čase

Kvantitativní PCR (qPCR) probíhala na přístroji ViiA7 (Thermo Fisher Scientific, USA). Analyzované geny jsou uvedené v tab. 8. Primery pro geny ND1, CYTB, COX3, ATP6, ATP8, ATP6-COX3 (Jesina *et al.*, 2004) byly nasyntetizovány u firmy Generi biotech, ČR. Pro měření byly připraveny Master Mixy pro dvě rozdílné qPCR fluorescenční sondy – EvaGreen (Biotium, USA) a TaqMan (Thermo Fisher Scientific, USA). Použité polymerázy pocházejí z firmy Solis BioDyne (EE).

Tab. 8 | Vybrané geny OXPHOS

Sonda	Gen	Protein	enzym	původ
EvaGreen	<i>ND1</i>	ND1	Komplex I	mtDNA
	<i>CYTb</i>	Cytochrom <i>b</i>	Komplex III	mtDNA
	<i>COX3</i>	COX3	Komplex IV	mtDNA
	<i>ATP6</i>	F _o - <i>a</i>	ATP syntáza	mtDNA
	<i>ATP8</i>	F _o -A6L	ATP syntáza	mtDNA
	<i>ATP6-COX3</i>		Polycistron	mtDNA
TaqMan	<i>SHDB</i>	SHDB	Komplex II	nDNA
	<i>ATP5C1</i>	F ₁ - γ	ATP syntáza	nDNA
	<i>B2M</i>	B2M	Housekeeping geny	
	<i>HPRT1</i>	HPRT1		

Master Mixy připraveny dle protokolů v tab. 9 a tab. 10. Pak byly napipetovány do MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate (Thermo Fisher Scientific). K nim byl pak napipetován 1 μ L dané cDNA a destičky byly zalepeny optickou fólií.

Tab. 9 | Master Mix pro EvaGreen sondu (10 μ L reakce)

Komponenta	Finální koncentrace	Objem [μ L]
5 \times HOT FIREPol EvaGreen qPCR Supermix	1 \times	2
Primer Forward (100 μ M)	250 nM	0,05
Primer Reverse (100 μ M)	250 nM	0,05
PCR čistá H ₂ O		6,9

Tab. 10 | Master Mix pro TaqMan sondu (10 μ L reakce)

Komponenta	Finální koncentrace	Objem [μ L]
5 \times HOT FIREPol Probe qPCR Mix	1 \times	2
Primer mix 20 \times	1 \times	0,5
PCR čistá H ₂ O		6,5

qPCR pak probíhala dle následujících protokolů:

Protokol pro qPCR se sondou EvaGreen

95 °C	15 min	
95 °C	15 s	40 cyklů
55 °C	20 s	
72 °C	20 s	
Křivka tání		
95 °C	15 s	
60 °C	1 min	
95 °C		

Protokol pro qPCR se sondou TaqMan

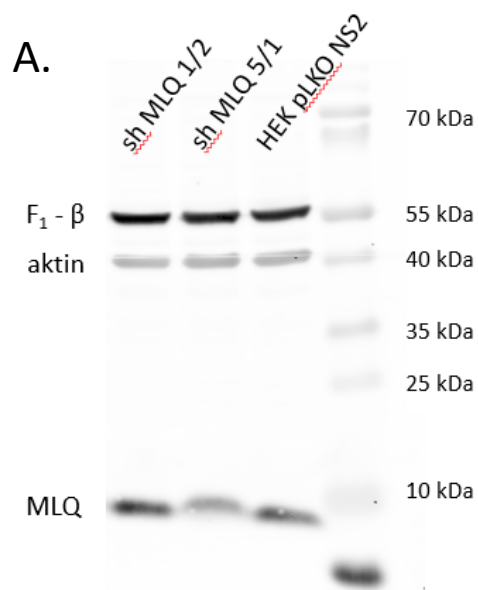
95 °C	15 min	
95 °C	20 s	40
60 °C	1 min	cyklů

Vyhodnocení výsledků proběhlo pomocí ViiA7 Software (Thermo Fisher Scientific, USA).

4 Výsledky

4.1 Knock-down genu pro protein MLQ pomocí shRNA vlásenek

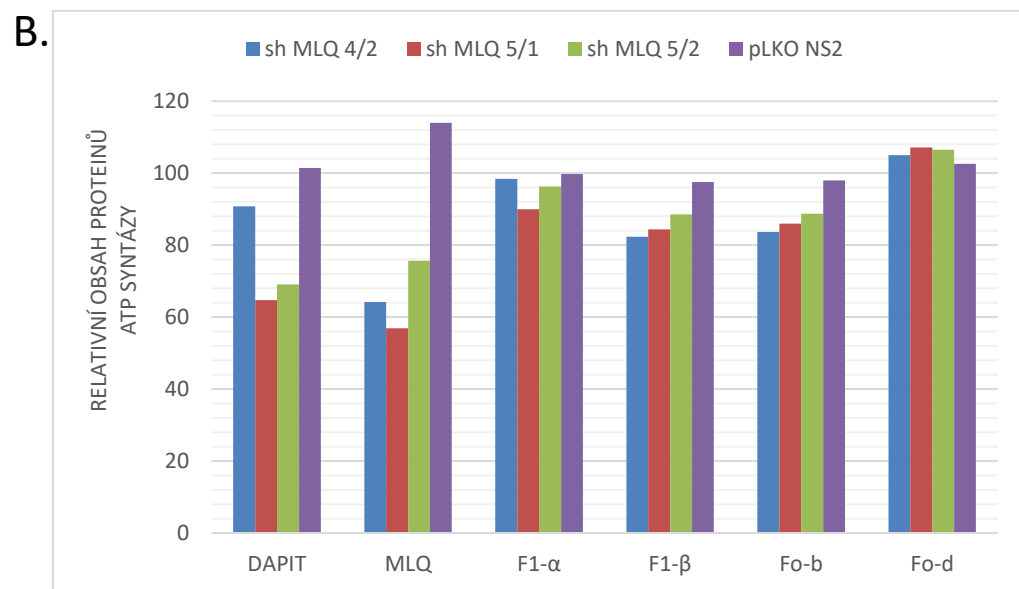
Pro tvorbu savčího modelu pro studium funkce proteinu MLQ bylo testováno pět shRNA komplementárních k úseku druhého exonu mRNA MLQ. Účinnost utišení exprese byla testována ve vyselektovaných liniích se stabilní expresí jednotlivých vlásenek na úrovni množství MLQ proteinu Western blot detekcí. Hodnotila jsem relativní množství MLQ proteinu k hodnotám v kontrolní linii transfekované necílenou vlásenkou. Množství MLQ bylo vždy normalizováno na nanáškovou kontrolu, za kterou byl zvolen aktin. (Protilátka rozpoznávající rovnocenně α , β , γ aktin. Ta byla následně používána pro normalizaci i ve všech dalších experimentech, není-li uvedeno jinak). Kromě relativního množství MLQ a aktinu bylo detekováno i několik dalších podjednotek mitochondriální ATP syntázy, konkrétně katalytické podjednotky $F_1\text{-}\alpha$ a $F_1\text{-}\beta$, komponenty periferního stonku enzymu $F_0\text{-}b$ a $F_0\text{-}d$ a podjednotku DAPIT z membránové domény. Zatímco u linií transfekovaných vlásenkami shRNA 1, 2, a 3 nebylo pozorováno snížení obsahu MLQ proteinu, účinek vlásenek 4 a 5 vedl ke snížení relativního obsahu MLQ na 55-70 % vůči kontrolní linii (Obr. 18 A). Po kvantitativní analýze PVDF membrán se jako nejúčinnější ukázala být vlásenka shRNA 5/1, kde došlo k 43% snížení exprese proteinu MLQ (tzn., že bylo exprimováno 57 % proteinu) (Obr. 18 B). Vliv snížení relativního obsahu MLQ na ostatní podjednotky ATP syntázy byl nevýrazný, obsah detekovaných podjednotek se pohyboval v rozmezí 80–100 % kontroly. Pouze u linií transfekovaných vlásenkou shRNA 5 korelovalo množství F_0 podjednotky DAPIT s obsahem MLQ (Obr. 18 B). Na základě těchto výsledků byla jako perspektivní pro další experimenty vybrána linie transfekovaná vlásenkou shRNA 5.



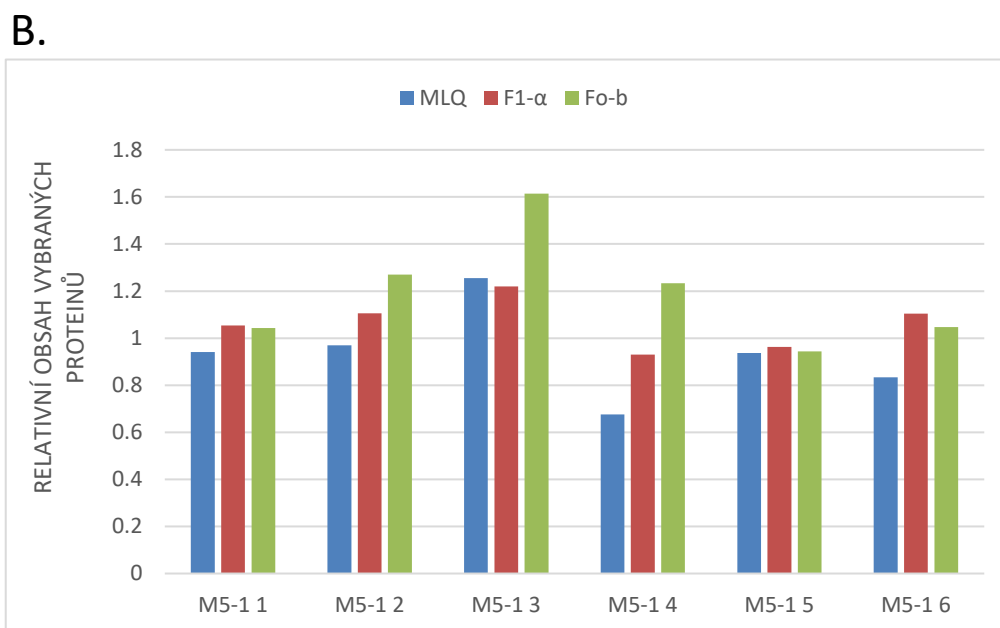
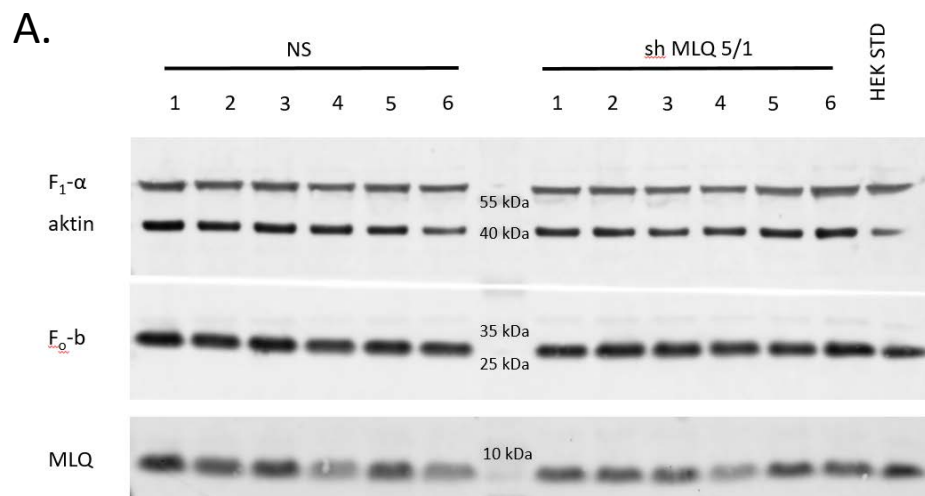
Obr. 18 | Utišení exprese proteinu MLQ

Linie s nejvíce sníženou expesí proteinu MLQ byla transfekována vlásenkou shRNA 5. A) Western blotová analýza proteinu (25 µg proteinu) – jednotlivé proužky byly kvantifikovány a zpracovány do grafu B. B) Relativní obsah proteinů ATP syntázy ve vybraných sh MLQ liniích. Hodnoty byly normalizovány na aktin a vztaženy ke kontrolní NS linii.

HEK pLKO NS2 – kontrolní buněčná linie
sh MLQ – experimentální linie
F₁-β – podjednotka β domény F₁



U kontrolní linie a linie sh MLQ 5/1 jsem tedy přistoupila ke klonování, kdy jsem z každé linie odvodila šest jednobuněčných klonů (Obr. 19 A). Po rozpěstování byl v těchto klonech analyzován relativní obsah MLQ proteinu. Bohužel v žádném z odvozených klonů nebylo detekováno výraznější utišení genové exprese než v případě výchozí směsné linie. Nejnižší obsah vykazoval klon MLQ 5/1 4, ale s konečnými 68 % proteinu nelze považovat tuto linii za vhodný model pro studium důsledků sníženého množství proteinu MLQ (Obr. 19 B).



Obr. 19 | Analýza úspěšnosti utišení exprese proteinu MLQ v kloněch odvozených z sh MLQ 5/1

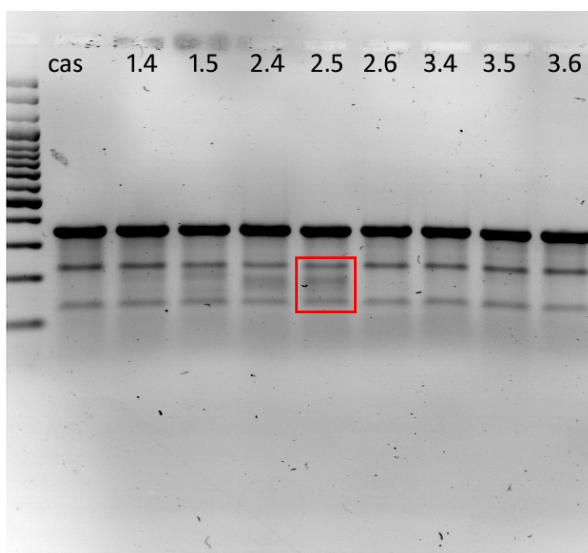
(A) Western blotová detekce proteinů v kloněch odvozených z sh MLQ 5/1 linie a kontrolní linie NS (naneseno 25 μ g proteinu). (B) Relativní obsah proteinu MLQ ve zkoumaných liniích. Hodnoty byly normalizovány na aktin a vztaženy k průměru NS klonů.

4.2 Knock-out genu C14orf2

Ve druhé fázi projektu jsem upustila od buněčného modelu MLQ KD a rozhodla jsem se pokusit se vytvořit model s absencí proteinu MLQ pomocí inaktivace genu C14orf2 metodou CRISPR/Cas9 s párovanými nikázami.

4.2.1 Selekce gRNA párů

V projektu byly využity celkem 3 gRNA nasedající na sense vlákno (označeny 4, 5, 6) a 3 gRNA nasedající na antisense vlákno (označeny 1, 2, 3) genu C14orf2. Ty byly relevantních kombinací (viz sekce XY – metody) transfekovány spolu s nikázou Cas9 do HEK293 buněk a účinnost mutagenese byla hodnocena pomocí SURVEYOR Mutation Detection kitu. Surveyor nukleáza detekuje špatně spárované báze a v daném místě pak štěpí DNA heteroduplex – na agarózovém gelu po elektroforéze lze pak pozorovat fragmenty naštěpené DNA. Nejvíce fragmentů bylo detekováno u kombinací gRNA 2+4 a 2+5 (Obr. 20) - tu jsem vybrala pro tvorbu buněčného modelu s vyřazením genu kódujícího protein MLQ.

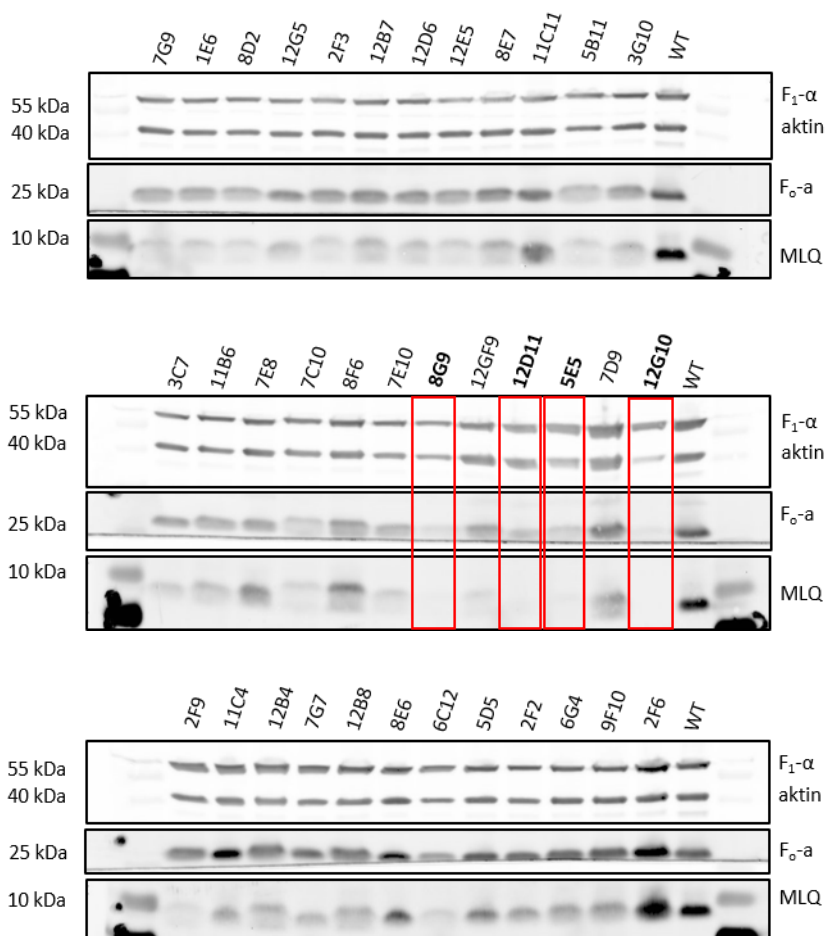


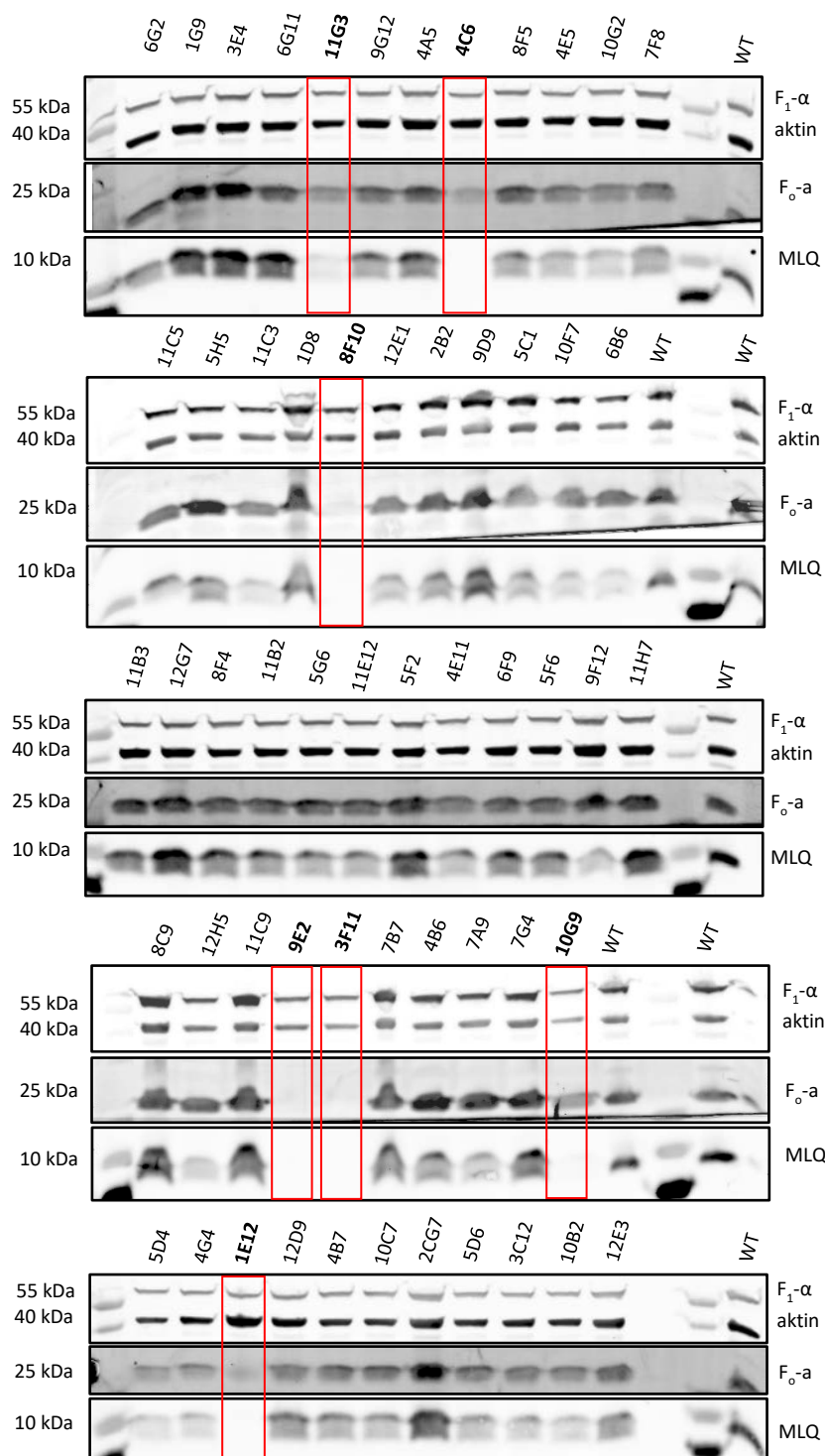
Obr. 20 | Analýza gRNA kombinací

Nejvíce u gRNA dvojí 2+4 a 2+5. Pro tvorbu buněčného modelu jsem použila kombinaci 2+5.

4.2.2 Selekce linií s absencí MLQ proteinu

Výběr klonů s vyřazením funkce genu *c14orf2* probíhal metodou Western blot imunodetekcí proteinu MLQ. Ve vzorcích jednotlivých klonů byl dále detekován obsah aktinu jako nanášková kontrola a dvě reprezentativní podjednotky ATP syntázy – $F_1\text{-}\alpha$ a $F_o\text{-}a$, zastupující jak dvě klíčové domény enzymu F_1 a F_o , tak jaderně ($F_1\text{-}\alpha$) a mitochondriálně ($F_o\text{-}a$) kódované geny. Jelikož typická úspěšnost vytvoření KO metodou CRISPR se pohybuje okolo 10 % (Ran, Hsu, Wright, *et al.*, 2013), analyzovali jsme velké množství vzorků – celkem 92 jednobuněčných klonů. V tomto souboru vzorků jsme pozorovali široké spektrum obsahu proteinu MLQ v porovnání s kontrolní linií HEK293 (WT), přičemž v 11 z nich nebyl protein MLQ detekován a představují tak klony, kde došlo k knock-outu genu (Obr. XY). Kromě očekávané a vyžadované absence proteinu MLQ bylo v těchto klonech detekováno i nižší množství podjednotky $F_o\text{-}a$ ATP syntázy oproti kontrolním buňkám (WT), zatímco relativní obsah katalytické podjednotky $F_1\text{-}\alpha$ nevykazoval výraznou změnu (Obr. 21).





Obr. 21 | Hledání klonů s poškozenou expresí proteinu MLQ

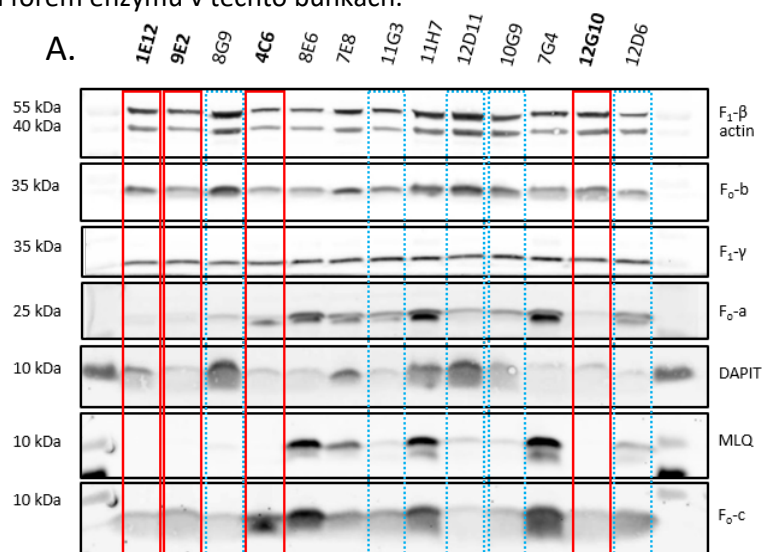
Z celkem 92 zkoumaných klonů vzešlo 11 klonů s možným vyřazeným genem C14orf2.

Jako nanášková kontrola je použit aktin. Naneseno bylo 30 μ g proteinu.

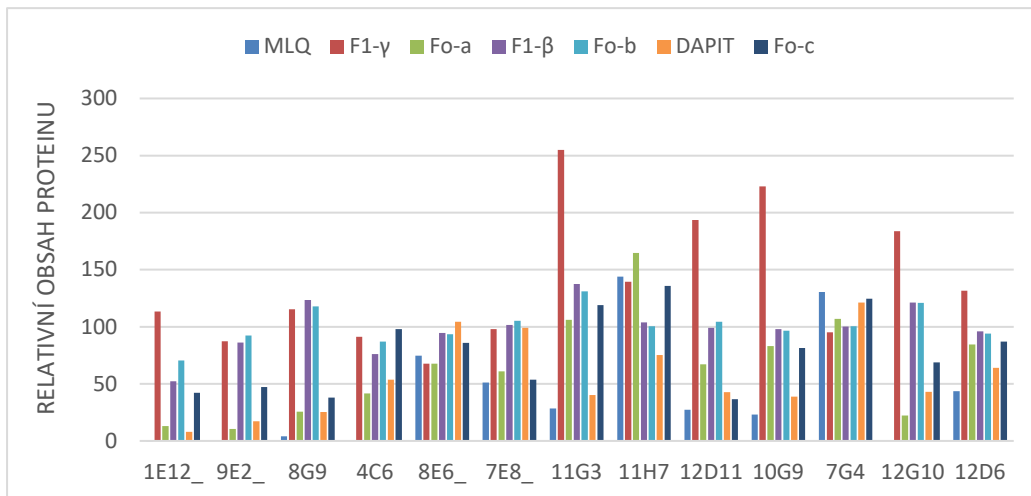
4.2.3 Analýza obsahu podjednotek mitochondriální ATP syntázy u vybraných klonů

Relativní obsah širšího spektra podjednotek ATPázy byl hodnocen u tří skupin klonů vybraných z celkového souboru. Klony 1E12, 9E2, 4C6 a 12G10 (označené červeně) jsou skutečně knock-outované (KO), zatímco klony 8G9, 11G3, 12D11, 10G9 a 12D6 (označené modře) mají pravděpodobně mutaci, která snižuje expresi či stabilitu MLQ proteinu, třetí skupina klonů (8E6, 7E8, 11H7, a 7G4) měla v primárním šetření podobný obsah MLQ jako WT buňky, a v tomto experimentu představovaly kontrolní skupinu. Vybrané klony byly znovu testované pro přítomnost či absenci MLQ a obsah podjednotek $F_1\text{-}\beta$, $F_1\text{-}\gamma$, $F_o\text{-}a$, $F_o\text{-}b$, $F_o\text{-}c$ a DAPIT. Aktin sloužil jako nanášková kontrola (Obr. 22 A).

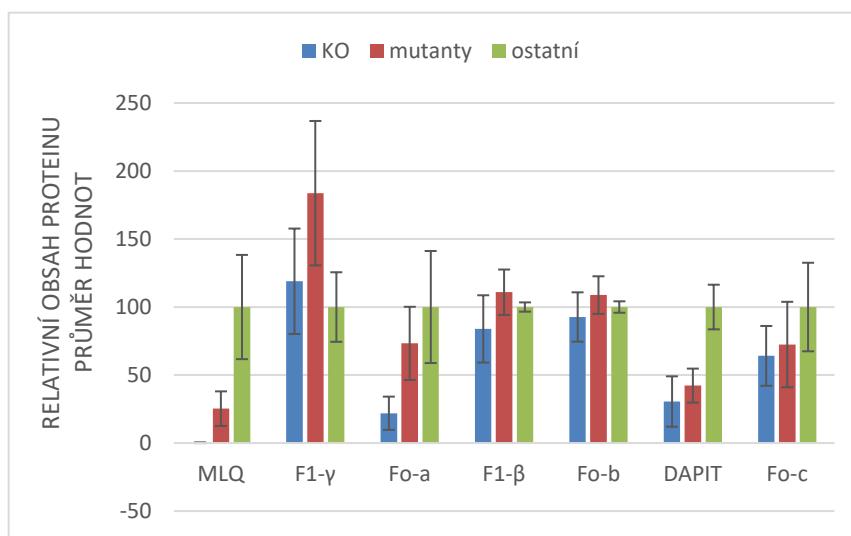
U MLQ KO klonů bylo potvrzeno snížené množství podjednotky a (přibližně 22% kontrolního průměru), která je kódovaná mtDNA a tvoří protonový kanál, nezbytný pro funkci enzymu. Dále jsme pozorovali výrazné snížení obsahu podjednotky DAPIT (30 % kontrolního průměru) a snížena byla i podjednotka c (cca 64% kontrolního průměru) (Obr. 22 B). Ve všech těchto případech se jedná o podjednotky F_o části enzymu. Ke snížení obsahu všech těchto podjednotek došlo i u klonů se sníženou expresí MLQ, ale rozdíly již nebyly tak patrné. Hladiny podjednotek F_1 domény a periferního stonku nebyly u KO klonů signifikantně sníženy, dokonce u čtyř mutantních klonů a jednoho knock-outovaného klonu došlo až ke znásobení množství $F_1\text{-}\gamma$ podjednotky, což by mohl být důsledek kompenzace způsobeného defektu v buňkách (Obr. 22 B). Zdá se tedy, že by přítomnost proteinu MLQ mohla hrát roli při inkorporaci či stabilizaci podjednotek F_o -domény, zatímco periferní stonku a F_1 -doména tímto proteinem regulovány nejsou. Hladiny podjednotek ATPázy v odlišných stechiometrických poměrech než u kontrol dále naznačují přítomnost nekompletních forem enzymu v těchto buňkách.



B.



C.



Obr. 22 | Absence MLQ se ovlivňuje protonový kanál a další podjednotky F_o-domény.

Western blotová analýza (A) a následná kvantifikace (B, C) potvrdily snížené množství proteinu α (F_o-a) u mutovaných klonů MLQ; mimo to ale ukázaly i snížené množství pro proteiny F_o-c a DAPIT, což naznačuje, že by MLQ mohlo mít stabilizační úlohu v rámci ATP syntázy. A) objem naneseného proteinu je ekvivalentní ¼ jamky ve 24-jamkové destičce. B) Normalizováno na aktin, vztaženo k průměru kontrolních linií. C) Průměr naměřených hodnot, normalizováno na aktin, vztaženo k průměru kontrolních linií. Chybové úsečky značí směrodatnou odchylku.

4.3 Vliv absence MLQ na strukturu komplexu ATP syntázy

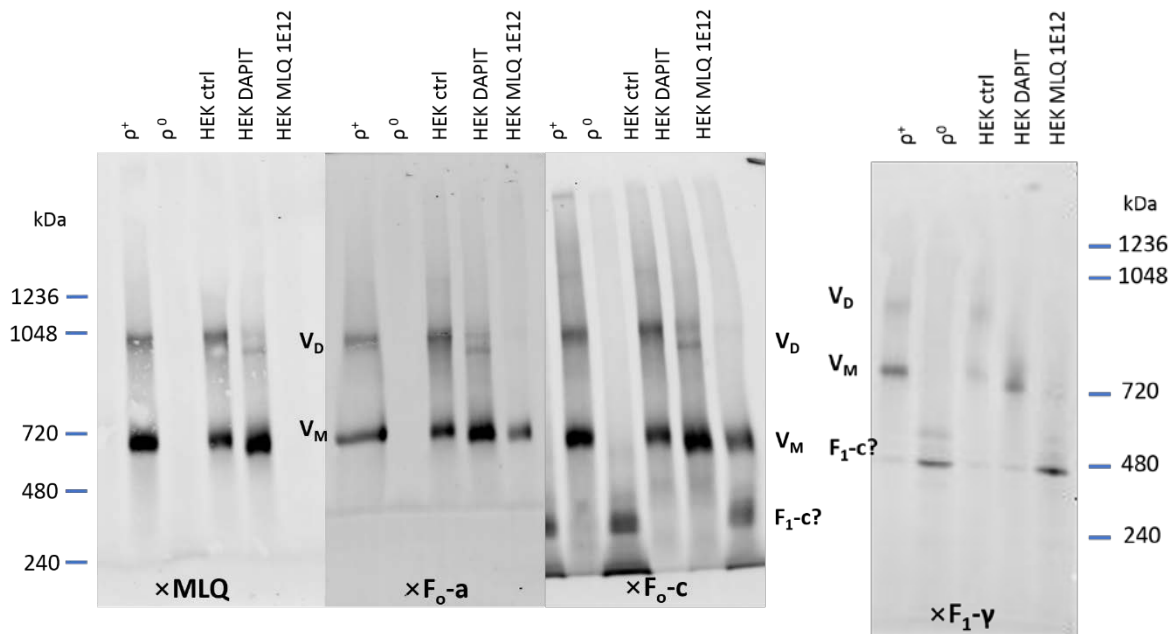
Po kvantitativní analýze vybraných jednotlivých podjednotek ATP syntázy a odhalení jejich odlišných stechiometrickým poměrů u MLQ KO jsem chtěla zkoumat, jak je ovlivněno množství a podjednotkové složení enzymového komplexu a přítomnost případných asemblačních nebo rozpadových subkomplexů. Pro tento účel jsme použili nativní proteinové elektroretické systémy, které umožňují separaci multipodjednotkových komplexů. Konkrétně jsme zvolili BNE-PAGE a CNE-PAGE, jejichž výhody a nevýhody jsou diskutovány v kapitole 3.2.6.

Vedle buněk s knock-outem MLQ jsme na základě základních informací o zastoupení jednotlivých podjednotek do srovnání zahrnuli i jiné relevantní dostupné modelové systémy a chyběním či deplecí dalších ATP syntázových podjednotek. Konkrétně se jednalo o následující linie:

- ρ^+ = buněčná linie 143B – linie s deficiencí thymidin kinázy odvozená z lidského osteosarkomu, kontrola pro ρ^0
- ρ^0 = buněčná linie 143B s depletovanou mtDNA pomocí ethidium bromidu
- HEK ctrl = kontrolní WT HEK293 buňky
- HEK DAPIT = HEK293 buňky se ztišenou expresí proteinu DAPIT
- HEK MLQ 1E12 = HEK293 buňky s absencí MLQ

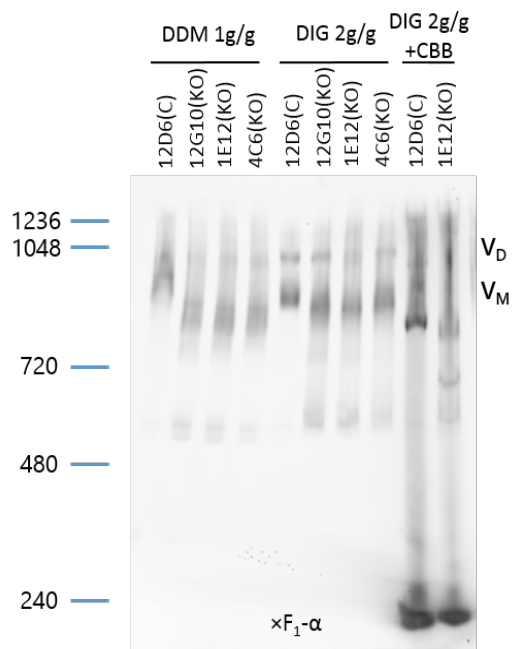
Nejdříve jsem separovala proteiny pomocí BNE-PAGE, která je běžně využívána a má vysoké rozlišení. Vzorky byly solubilizovány jemným detergentem digitoninem (DIG) (Obr. 23). U ρ^0 jsem očekávala absenci proteinů A6L a podjednotky F_0-a vzhledem k chybějící mtDNA. Překvapivě jsem ale, stejně jako MLQ KO klonu 1E12, pozorovala i chybění proteinu MLQ, který je kódován jadernou DNA. Zatímco u MLQ KO linií bylo pozorováno snížení obsahu proteinu DAPIT, zdá se, že tato interakce není obousměrná a v případě buněk se sníženou expresí DAPIT (DAPIT KD) jsem pokles podjednotky MLQ nepozorovala. ATPázový komplex velikostí nejbližší k monomeru ATP syntázy u kontrolních buněk byl u MLQ KO detekován protilátkami proti podjednotkám F_0-a , F_0-c i $F_1-\gamma$. Oproti kontrole migruje tento komplex o něco rychleji, jeho velikost je snížena minimálně o nepřítomný protein MLQ. Její nižší relativní obsah vůči kontrole je určován sníženou hladinou podjednotky F_0-a , která je detekována pouze v tomto komplexu. Při imunodetekci podjednotky F_0-c a $F_1-\gamma$ u MLQ KO byly detekovány subkomplexy ATP syntázy o přibližné velikosti 300–400 kDa, srovnatelné se subkomplexy u ρ^0 buněk. Na základě předchozích studií (Wittig *et al.*, 2010) se domnívám, že se jedná o důsledek interference Coomassie barvy s nestabilním enzymem, který se

následně rozpadá. Proto jsem následně přistoupila k CNE-PAGE, kde nedochází ke změnám náboje vlivem přidání anionické barvy a proteiny a proteiny pak migrují na základě vlastního vnitřního náboje.



Obr. 23 | Imunodetekce vybraných podjednotek ATP syntázy (BNE-PAGE)

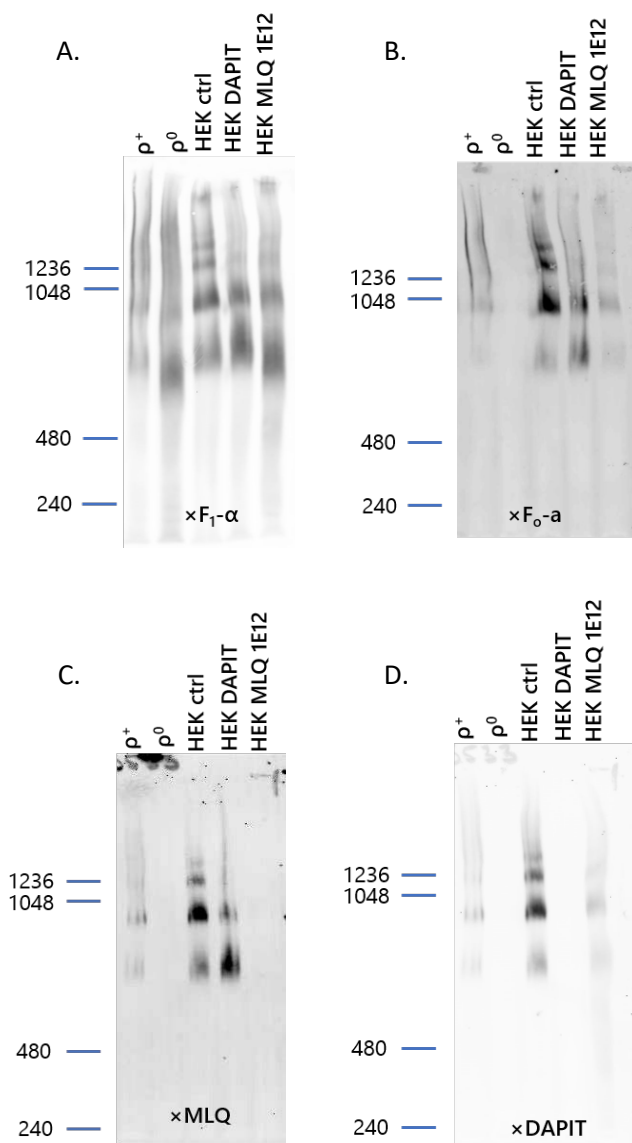
CNE-PAGE má sice nižší rozlišení než BNE-PAGE, ale je šetrnější k separovaným proteinům. Porovnávala jsem tři klony bez proteinu MLQ s jedním klonem kontrolním (Obr. 24). Vzorky byly solubilizovány dvěma různými jemnými detergenty, dodecyl maltosidem (DDM) a digitoninem (DIG). Komplexy ATPázy jsem detekovala protilátkou proti podjednotce $F_1\text{-}\alpha$. CNE-PAGE potvrdila menší velikost monomerické ATP syntázy u MLQ KO, ale na rozdíl od BN-PAGE je většina obsahu F_1 domény asociována s monomerem či dimerem enzymu. Rozpadové subkomplexy (pravděpodobně doména F_1 a podjednotka c) se u MLQ KO objevují ve větší míře až po přidavku Coomassie barvy (CBB) do vzorku (Obr. 24), kdy se fakticky systém CNE-PAGE mění a BNE-PAGE. Dále můžeme porovnat rozdíl mezi účinky DDM a DIG, kde proteiny solubilizované DDM jsou méně zaostřené a menší než proteiny solubilizované DIG.



Obr. 24 | Pilotní analýza ATP syntázy (CNE-PAGE)

Detailnější analýzu složení komplexů ATP syntázy s použitím CNE-PAGE jsem proto provedla ve vzorku z klonu MLQ KO 1E12 solubilizovaného digitoninem (Obr. 25). Komplexy ATP syntázy u MLQ KO buněk jsou zaostřeny v širším pásu než p^0 buněk. V tomto pásu se pravděpodobně detekuje směs komplexů enzymu obsahující subkomplex bez podjednotek MLQ, DAPIT a $F_0\text{-}a$, totožný s ATP syntázou p^0 buněk, a téměř kompletní monomer bez MLQ, jehož obsah je určován zbytkovým množstvím proteinů $F_0\text{-}a$ (obrázek 25 D.). Na základě těchto dat lze uzavřít, že MLQ podjednotka se

bud' účastní inkorporace ostatních F_0 podjednotek během asemblace enzymu, nebo stabilizuje jejich interakce v rámci vzniklého komplexu. Naopak se pravděpodobně nepodílí na dimerizaci ATP syntázy, jelikož poměr obsahu monomeru a dimeru je u MLQ KO podobný jako u kontrolních buněk.

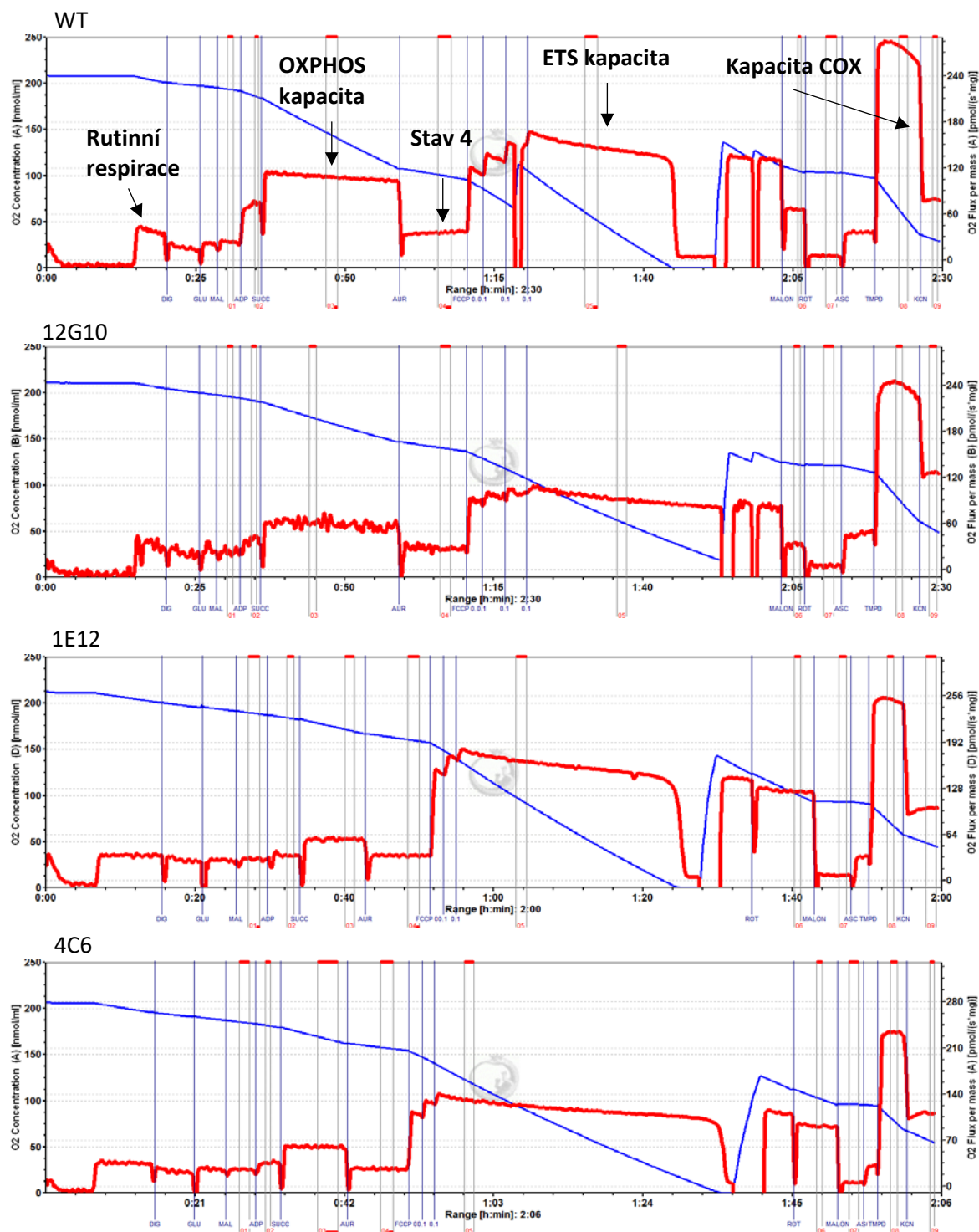


Obr. 25 | Imunodetekce vybraných podjednotek ATP syntázy (CNE-PAGE)

4.4 Analýza funkčnosti oxidativní fosforylace pomocí oxygrafu

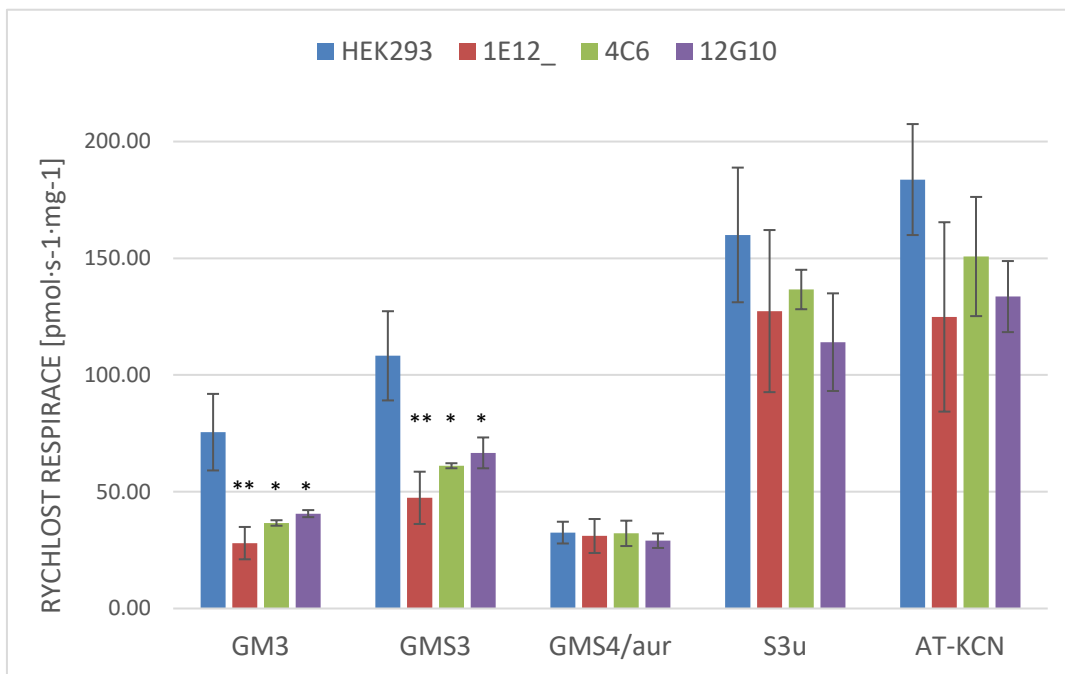
V každém měření byly spolu porovnávány vždy jeden MLQ KO klon a kontrolní HEK 293 buňky. Sledovali jsme především čtyři stavy – OXPHOS kapacitu, kdy je celý systém oxidační fosforylace dostatečně saturován substráty a ADP a vidíme tak maximální funkční kapacitu ATP syntázy. Dalším sledovaným stavem byl stav 4 po inhibici ATP syntázy aurovertinem, ve kterém spotřeba kyslíku reprezentuje aktivitu respiračního řetězce kompenzující nesespecifický únik protonů z mezimembránového prostoru do matrix („proton leak“). Dále je to ETS (eletron-transportní systém) kapacita – to je stav již nezávislý na aktivitě ATP syntázy (protože byla inhibována). Funkční je již jen dýchací řetězec, jehož aktivita je nejvyšší za rozpřaženého stavu – v tomto případě lipofilní ionofor FCCP disipuje gradient H^+ jeho transportováním skrz vnitřní mt membránu. Narušený gradient se pak protonové pumpy ETS snaží opět vybudovat. Posledním sledovaným stavem je maximální využitelná kapacita komplexu IV, kterou je možno zkoumat po inhibici přenosu elektronů z komplexu III na cyt c. Elektrony pro komplex IV je pak nutno uměle dodat v podobě TMPD a askorbátu. Faktickým donorem elektronů je zde TMPD, ale protože je schopen autooxidace, musí být přítomen i askorbát, který TMPD udržuje v redukovaném stavu. Skutečnou hodnotu kapacity komplexu IV je pak možné určit po odečtení autooxidace TMPD – míru autooxidace zjistíme po inhibici komplexu IV pomocí KCN. Zbytková respirace po inhibici celého OXPHOS je pak právě autooxidace TMPD.

Na obr. 26 jsou vybrané typické záznamy měření respirace daných klonů a kontroly. Již vizuálně lze odhadnout rozdíly mezi funkční kapacitou ATP syntázy kontroly a klonů bez proteinu MLQ. Kvantifikované hodnoty jednotlivých respiračních stavů jsou poté vyjádřeny sloupcovými grafy na obr. 27. Kapacita OXPHOS (GMS3) se u KO klonů pohybovala v rozmezí 45–60 % kontrolních hodnot. Hodnoty respirace ve stavu 4 se mezi kontrolou a KO buňkami nelišily. U kapacity ETS a maximální elektrontransportní aktivity komplexu IV byly průměrné hodnoty u všech klonů sniženy o cca 25 % vůči kontrole, ale kvůli vysokému rozptylu hodnot nebyly rozdíly signifikantní.



Obr. 26 | Záznam měřené respirace

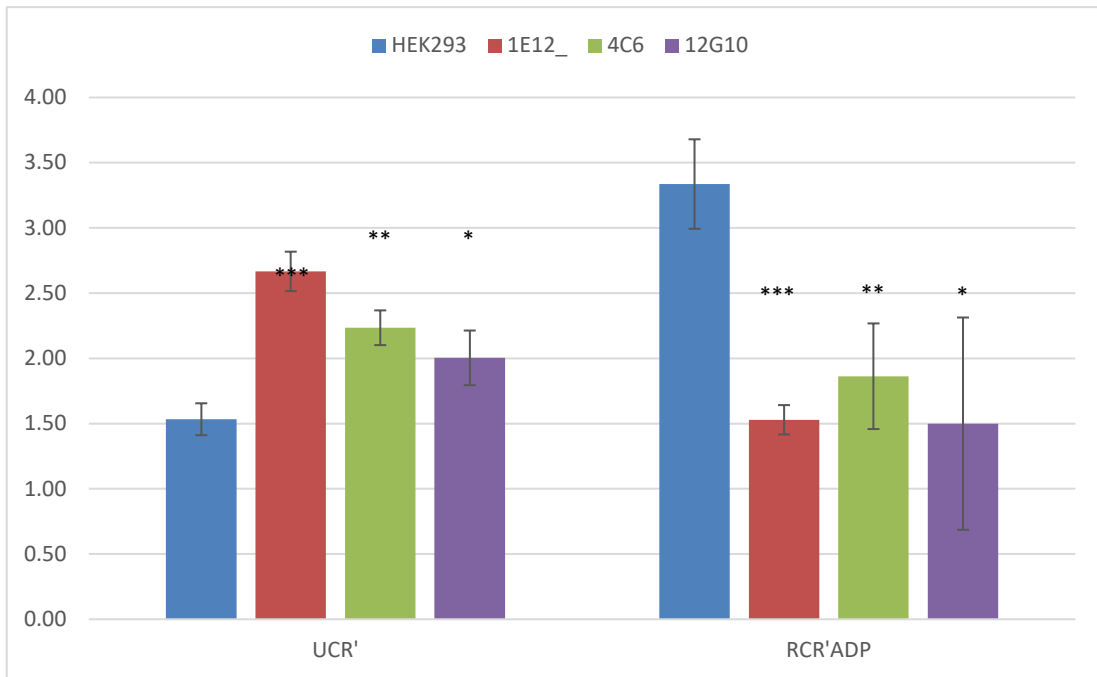
Příklady měřené spotřeby O₂ na třech vybraných kloních MLQ KO a na kontrolní linii HEK 293 (WT). Buňky byly permeabilizovány digitoninem. Na grafu pro WT jsou vyznačeny sledované stavy – stav maximální fosforylace (OXPHOS kapacita), stav maximální respirace (ETS kapacita), stav 4 a stav maximální aktivity komplexu IV. Modrá křivka ukazuje koncentraci O₂ (osa Y1), červená spotřebu O₂ (osa Y2). Osa X = čas měření



Obr. 27 | Kvantifikace naměřených hodnot

Hodnoty v grafu jsou průměrem všech naměřených hodnot pro dané klony stavu plné saturace komplexu I (GM3 – glutamát + malát) je signifikantní pokles spotřeby O_2 systémem, stejně tak po saturaci celého OXPHOS (GMS3 – glutamát + malát + ADP + sukcinát). Ve stavu GMS4/aur je již inhibována ATP syntáza aurovertinem a ve stavu S3u se zvýšila spotřeba O_2 v důsledku přidání protonoforu FCCP. Protonmotivní síla ETS je nejvyšší. AT-KCN je označení pro maximální funkční kapacitu komplexu IV po odečtení autooxidace TMPD a askorbátu (AT = askorbát + TMPD, KCN – inhibitor komplexu IV). Chybové úsečky značí směrodatnou odchylku. (n=3)

Z naměřených dat lze také spočítat respirační kontrolní poměry. UCR (rozpřahující kontrolní poměr) je poměr mezi hodnotou OXPHOS kapacity a ETS kapacity. OXPHOS kapacita bude mít vždy vyšší hodnotu než ETS kapacita, tedy $UCR > 1$, ale čím větší tento poměr je, tím více svědčí o defektu v ATP syntáze spíše než v komplexech dýchacího řetězce. Hodnota UCR u KO klonů kolísala mezi 2 a 2,5 a byla signifikantně vyšší než kontrolní hodnota 1,5. RCR'ADP (respirační kontrolní poměr po přidání nukleotidů) je poměr mezi plně saturovaným OXPHOS a stavem po inhibici ATP syntázy. Nižší hodnota tohoto poměru vyjadřuje buď sníženou kapacitu syntézy ATP v OXPHOS nebo narušení vnitřní mitochondriální membrány. Tento poměr byl u KO klonů signifikantně snížen oproti kontrole (Obr. 28). Hodnoty těchto poměrů spolu s nižší absolutní spotřebou kyslíku ve stavu 3 přesvědčivě vypovídají o snížené funkční kapacitě ATP syntázy u MLQ KO.



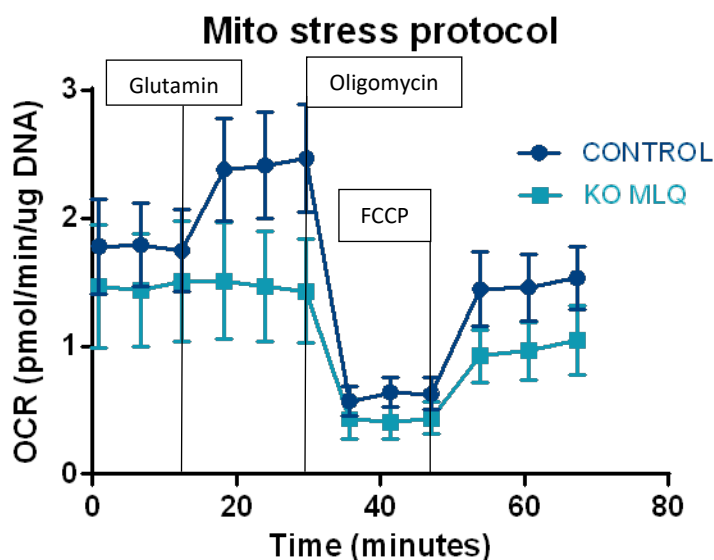
Obr. 28 | Kontrolní poměry respirace

Hodnoty v grafu jsou průměrem všech naměřených hodnot pro dané klony (n=3).

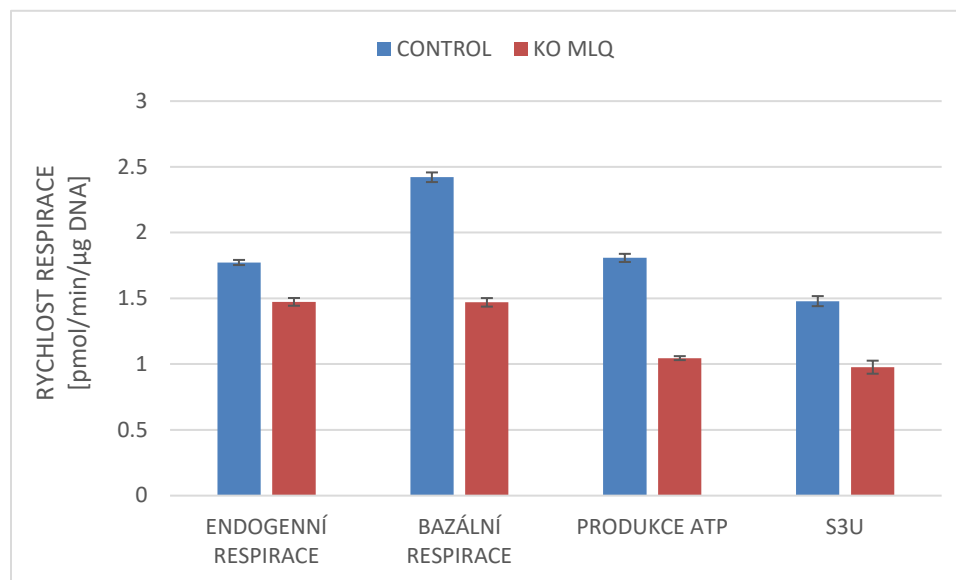
Chybové úsečky značí směrodatnou odchylku.

Měření probíhalo v intaktních buňkách, abychom mohli pozorovat metabolismus buněk ve fyziologickém stavu za aerobních podmínek. Abychom eliminovali případné rozdíly v rychlosti proliferace mezi MLQ KO a kontrolními HEK293 jsou měření normalizována na obsah DNA v jamkách, který proporcčně odpovídá počtu buněk.

V Mito stress protokolu bylo použito kulturační DMEM médium bez respiračně významných substrátů (glukóza, glutamin, pyruvát). Bazální respirace endogenních substrátů byla u MLQ KO snížena o 15 % vůči kontrole. Prvním přídatkem byl glutamin (2 mM), který je hydrolyzován na glutamát a dále transaminován na α -ketoglutarát. Ten vstupuje jako substrát do Krebsova cyklu, který dodává redukovaný koenzym NADH komplexu I. Zatímco u kontrol došlo k výraznému zvýšení respirace díky volné kapacitě OXPHOS pro oxidaci přidaného substrátu, u MLQ KO buněk zůstávala spotřeba kyslíku nezměněna (Obr. 29). Přidáním oligomycinu (1 μ M), inhibitoru ATP syntázy, jsme eliminovali respiraci spřaženou s tvorbou ATP. Reziduální respirace odpovídající aktivitě respiračního řetězce kompenzující nespecifický únik protonů přes vnitřní mitochondriální membránu byla u MLQ KO snížena na 70 % kontrolní hodnoty. Po disipaci protonového gradientu rozpřahovačem FCCP (1 μ M) pozorujeme stav maximální respirace, který byl u MLQ KO snížen o 30 % oproti kontrole. Největší rozdíl mezi kontrolou a MLQ KO vykazovala hodnota respirace spřažené s produkcí ATP, vypočítaná odečtením hodnot respirace před a po přidání oligomycinu. Fosforylační kapacita OXPHOS u MLQ KO představovala pouze 55 % kontroly (Obr. 30).



Obr. 29 | Vybraný záznam průběhu mito stress experimentu. Měření začalo pouze s endogenními substráty buněk. Glutamin oxidovaný v Krebsově cyklu způsobil zvýšení spotřeby kyslíku u kontrolních buněk, zatímco MLQ KO buněk přidavek glutaminu nevedl ke změně v respiraci.

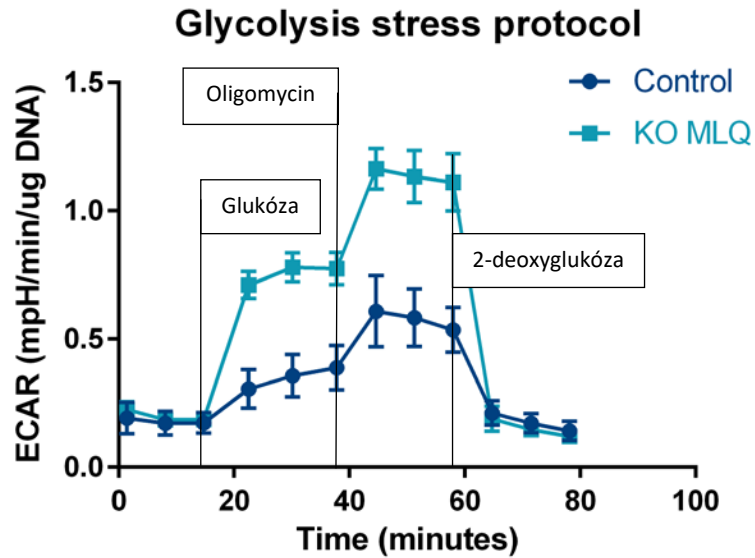


Obr. 30 | Měření respirace intaktních buněk

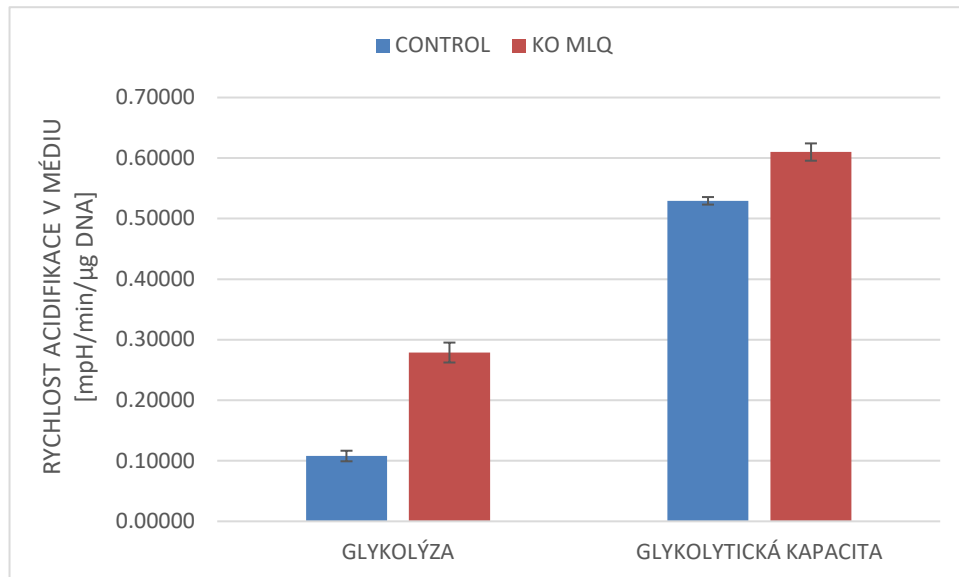
Kvantifikace naměřených dat. Endogenní respirace – bez přidaných substrátů. Bazální respirace – po přidavku glutaminu. ATP produkce – část respirace využívaná k produkci ATP (bazální respirace – respirace po přidavku oligomycinu). S3U – maximální funkční kapacita ETS respirace po přidavku rozpřahovače. (n=2)

Chybové úsečky značí směrodatnou odchylku.

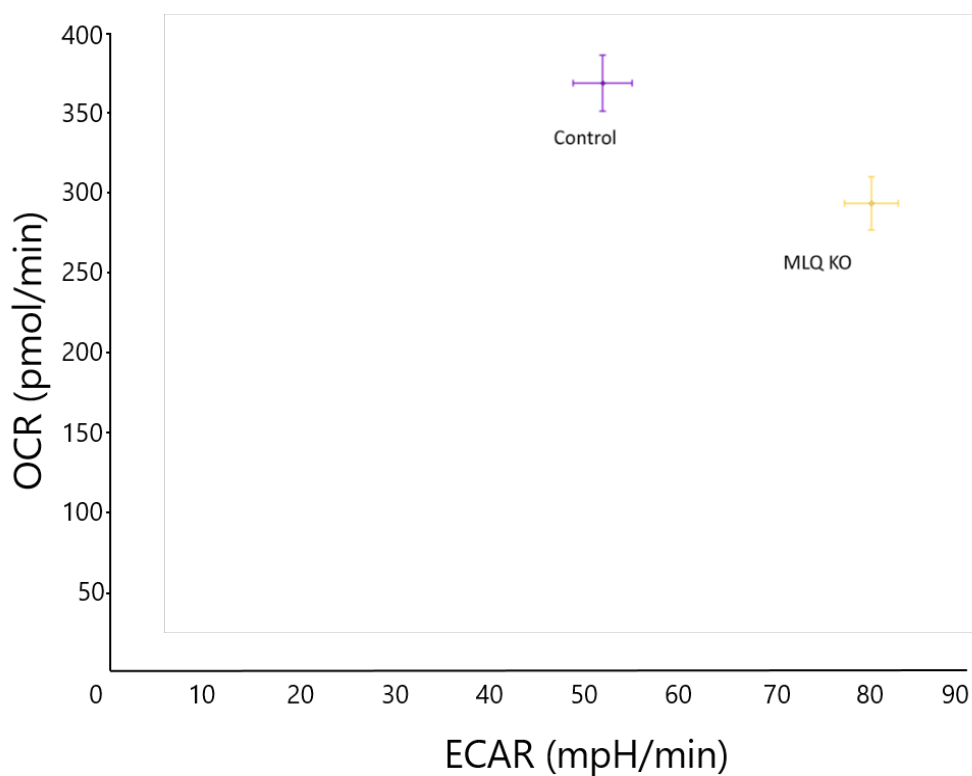
Pro sledování glykolytické kapacity jsme buňky měřili v médiu obohaceném o glutamin (2 mM), aby byl dýchací řetězec saturován a aktivní (Obr. 31). Přídavek glukózy (10 mM) čtyřnásobně zvýšil rychlost acidifikace média v MLQ KO buňkách v porovnání s 1,7-násobným nárůstem u kontrol. Vzhledem k výše uvedené nezměněné hladině respirace u KO buněk je zřejmé, že tyto buňky pro získání energie upřednostňují glykolýzu před oxidační fosforylací. Tento fenomén byl popsán u nádorových buněk jako Crabtreeho efekt, kdy buňka dokáže v přítomnosti glukózy krátkodobě potlačit respiraci a „přepnout“ metabolismus ve prospěch glykolýzy (Diaz-Ruiz *et al.*, 2009). Oligomycin (1 μM) znemožnil získávat ATP z OXPHOS, můžeme pak sledovat maximální kapacitu glykolýzy. Tato kapacita je u MLQ KO buněk přibližně dvojnásobná oproti WT buňkám (Obr. 32). 2-deoxyglukóza, která je strukturně podobná glukóze, kompetitivně inhibuje hexokinázu, čímž je přerušena glykolytická dráha. Reziduální hodnota acidifikace média je pak odečtena od ostatních hodnot jako pozadí. Celkově je vidět, že buňky s MLQ KO upřednostňují glykolýzu před aerobní respirací, což nejlépe vynikne při vynesení těchto dvou veličin do tzv. fenogramu (obr. 33)



Obr. 31 | Vybraný záznam průběhu hodnocení glykolytické aktivity. Buňky byly měřeny v médiu obohaceném o glutamin. Po přidavku glukózy došlo k výrazné acidifikaci v médiu MLQ KO buněk oproti kontrolním buňkám. Po inhibici ATP syntázy byla závislost na glykolýze u MLQ KO buněk ještě znatelnější.



Obr. 32 | Měření průběhu glykolýzy. Buňky byly měřeny v médiu obohaceném o glutamin. Glykolýza – míra acidifikace média po přidavku glukózy. Glykolytická kapacita – maximální acidifikace média po přidavku oligomycinu. Vždy je odečteno pozadí v podobě nespecifické acidifikace po přidavku 2-deoxy glukózy. (n=2)



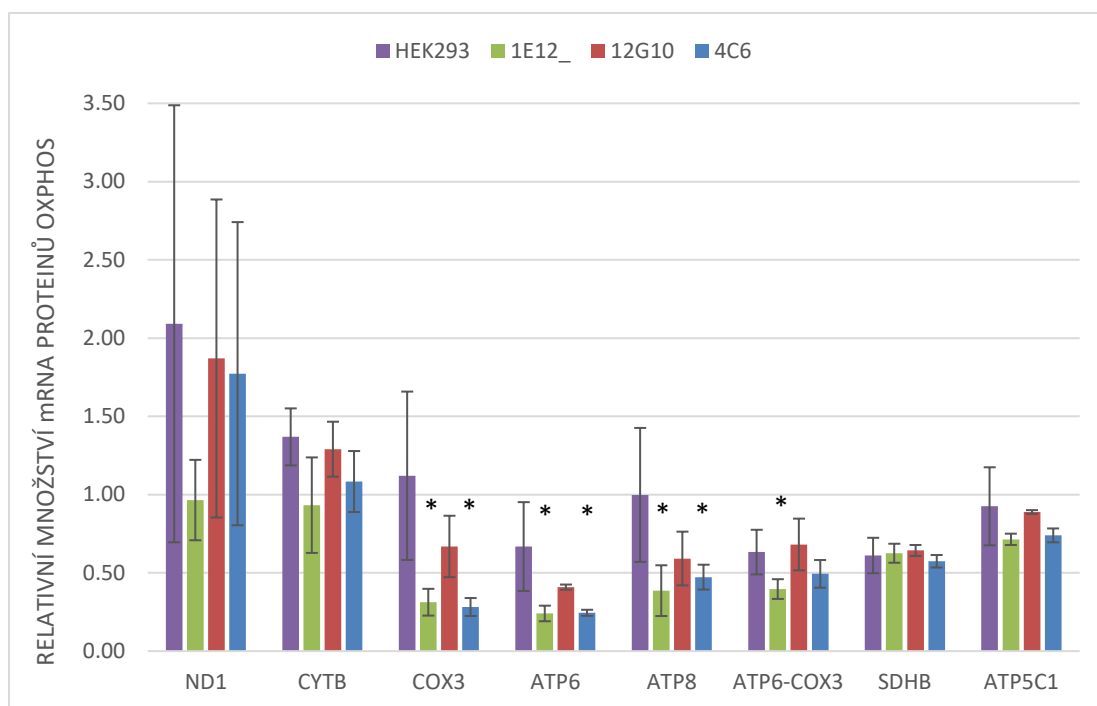
Obr. 33 | Fenogram provedených měření – porovnání OCR a ECAR. Proložení dat získaných z obou protokolů bylo pomocí fenogramu potvrzeno, že MLQ KO buňky získávají energii spíše z glykolýze než z respirace.

4.5 Vliv absence genu C14orf2 na transkripci mtDNA genů

Pozorované snížení obsahu mtDNA kódované podjednotky a nás vedlo k domněnce, že u MLQ KO buněk by mohla být narušena transkripce mtDNA genů obecně. Kvantitativní PCR bylo prováděno na vzorcích z biologických hexaplikátů klonů 12G10, 1E12, 4C6 a kontrolních HEK293. Měření samotné probíhalo v technických duplikátech pro každý vzorek. Vybrané geny OXPHOS (Tab. 8) jsem analyzovala pomocí qPCR. Jako kontrola byly použity dva jaderně kódované referenční „housekeeping“ (provozní) geny *B2M* a *HPRT1*.

Dosažené výsledky qPCR jsou prezentovány ve sloupcových grafech (Obr. 34). Absence proteinu MLQ u jednotlivých KO buněk se neprojevila na hladině transkriptů vybraných jaderně kódovaných genů OXPHOS (konkrétně *SDHB*, gen kódující protein SDHB – podjednotka komplexu II obsahující Fe-S klastry, a gen *ATP5C1*, který kóduje podjednotku γ F_1 domény ATP syntázy). V případě hladin mtDNA transkriptů byly pozorovány rozdílné výsledky. Naměřené hodnoty pro *CYTB* (mtDNA

kódovaná podjednotka komplexu III) a ND1 (jedna z mtDNA podjednotek komplexu I) nedoznaly výrazných změn oproti kontrole. Signifikantní snížení hladiny mRNA nastalo u klonů 1E12 a 4C6 v případě genu ATP6 pro protonový kanál a F_o domény ATP syntázy stejně tak jako u druhého mtDNA kódovaného genu pro ATP syntázu ATP8 (protein A6L F_o domény). Tyto výsledky naznačují, že snížený obsah podjednotky pozorovaný na proteinových elektroforézách je u MLQ KO ovlivněn už na úrovni mRNA. Signifikantní pokles hladiny mRNA byl překvapivě pozorován i u COX3 (kóduje jednu ze tří mtDNA podjednotek komplexu IV OXPHOS). Protože komplex genů ATP6/ATP8/COX3 je přepisován jako polycistronní transkript, který je dále maturován, analyzovali jsme i hladiny nesestřížené bicistronní mRNA ATP6-COX3. V ní jsme mezi MLQ KO klony a kontrolou nepozorovali tak výrazné rozdíly jako v případě maturovaných transkriptů. Snížené hladiny transkriptů pro podjednotky ATP syntázy a COX jsou tedy spíše důsledkem jejich vyššího obratu než poruchy mRNA procesování.



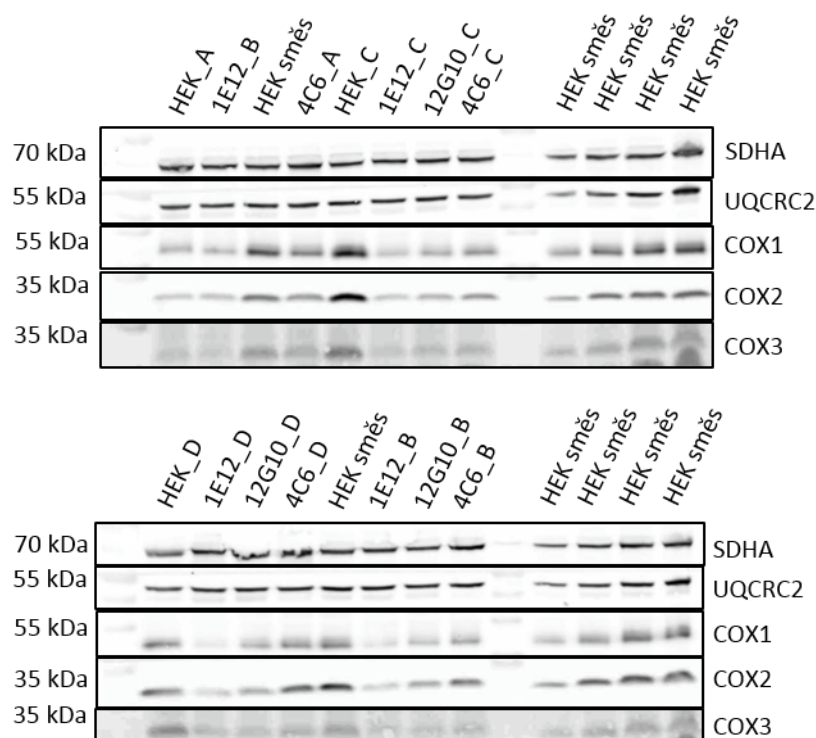
Obr. 34 | Výsledky analýzy transkripce vybraných genů OXPHOS

Měřené hodnoty jsou vztaženy na průměr obou housekeeping genů (*HPRT1*, *B2M*). Hladina mRNA je signifikantně snížena u těchto genů (klony 4C6 a 1E12) - mtDNA kódované *ATP6* (F_o-a), *ATP8* (F_o-A6L), *COX3* (mtDNA kódovaná podjednotka komplexu IV), zatímco mRNA jaderně kódovaných genů (*SDHB*, *ATP5C1* (F1-γ)) nejsou ovlivněny takřka vůbec. (n=6)

4.6 Vliv absence genu *C14orf2* na obsah mtDNA kódovaných podjednotek COX

Komplex IV, neboli cytochrom c oxidáza je homodimer, v jehož katalytickém jádru se nachází tři mtDNA kódované podjednotky COX1, COX2 a COX3 (Tsukihara *et al.*, 1996). Zjistili jsme, že absence MLQ vede ke snížení hladiny mRNA pro COX3. Zároveň komplex IV nedosahuje takové funkční kapacity jako kontrolní buňky, přestože změna nebyla statisticky signifikantní. Proto jsme se následně zaměřili na analýzu všech mtDNA kódovaných podjednotek komplexu IV na proteinové úrovni pomocí Western blotu a imunodetekce.

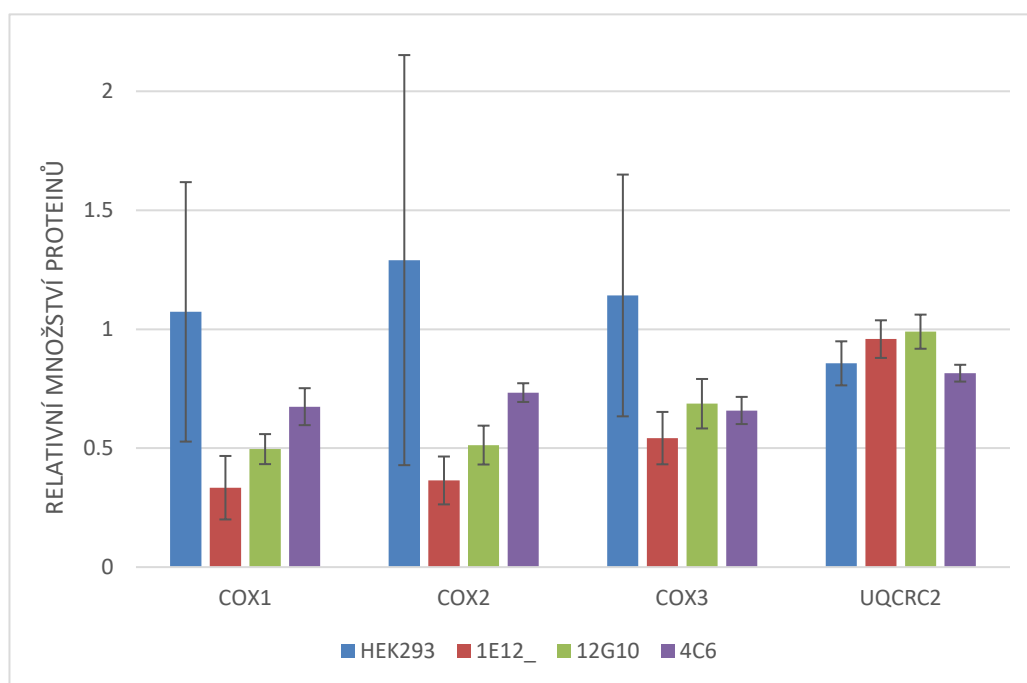
K analýze byly použity vždy čtyři biologické replikáty MLQ KO klonů 1E12, 12G10 a 4C6 a tři replikáty kontrolních HEK293 buněk. Jednalo se o alikvoty buněčných suspenzí, které byly paralelně použity pro respirometrická měření. Kromě COX1, -2, -3 byly do analýzy zahrnuty



Obr. 35 | Western blotová analýza COX proteinů

Imunodetekce proteinů na PVDF membráně. Jednotlivá písmena A/B/C/D odpovídají vzorkům sklizeným ve stejný den. HEK směs je směsí klonů HEK A/C/D. Protein SDHA (komplex II) byl použit jako nanášková kontrola. Poslední čtyři HEK směsi se liší hmotností naneseného proteinu (12, 24, 36 a 48 µg; ostatní vzorky obsahovaly 36 µg proteinu).

i proteiny UQCRC2 (jaderně kódovaná podjednotka core 2 komplexu III) a SDHA (jaderně kódovaná podjednotka komplexu II) jako marker množství mitochondrií. Detekované proteiny jsou zobrazeny na obr. 35, hodnoty z kvantifikace signálů pak ve sloupcových grafech na obr. 36. Průměrné hladiny obsahu podjednotek COX1, 2 a 3 se u MLQ KO klonů pohybovaly v rozmezí 35–70 % průměru kontrolních vzorků. Snížení množství ale nebylo u žádného klonu signifikantní z důvodu velkého rozptylu hodnot signálů u kontrolních buněk. Relativní množství proteinu UQCRC2 i nanáškové kontroly SDHA bylo srovnatelné mezi KO klony a kontrolou.



Obr. 36 | Kvantifikace předchozí Western blotové analýzy COX proteinů

Naměřené hodnoty byly normalizovány k hodnotám SDHA a vztaheny k interní kontrole (HEK směs – 36 µg proteinu).

Chybové úsečky představují směrodatnou odchylku. (n=2)

5 Diskuze

F_1F_o -ATP syntáza byla poprvé studována v roce 1960, kdy se rakouské skupině Efraima Rackera podařilo z hovězího srdce izolovat a popsat vůbec první enzym účastnící se oxidační fosforylace (Penefsky *et al.*, 1960; Pullman *et al.*, 1960). Tuto solubilní adenosintrifosfatázu pojmenovali jako Faktor 1 (neboli F_1). F_o část enzymu objevili o šest let později, kdy E. Racker spolu s Yasuou Kagawou identifikovali membránovou část proteinu, která faktor F_1 kotvila. Tu nazvali F_1 -vzájící faktor F_o – index „o“ je zkratkou pro oligomycin, který se váže do F_o domény ATP syntázy a inhibuje ji (Kagawa and Racker, 1966).

Od té doby byla F_1F_o -ATP syntáza ve středu zájmu mnohých biochemických laboratoří. Ještě více na důležitosti nabyl její výzkum poté, co Peter Mitchell postuloval chemioosmotickou teorii v roce 1961. Významně k výzkumu struktury ATP syntázy přispěl sir John E. Walker, který velkou část struktury enzymu objasnil metodou rentgenové krystalografie. Díky tomu bylo možno doplnit Boyerův „binding-change“ mechanismus syntézy ATP, za což oba sdílí Nobelovu cenu z roku 1997.

Dodnes ale neznáme kompletní strukturu membránové části enzymu, ani detailní mechanismus, kterým se tok protonů přes podjednotku a mění v rotační pohyb c-oligomeru. V této souvislosti otevřel nedávný objev membránových podjednotek DAPIT a MLQ specifických pro obratlovce zcela nové a neprozkoumané pole výzkumu jednoho z nejkoničtějších enzymů buněčného metabolismu.

5.1 Vytvoření buněčného modelu pro studium funkce proteinu MLQ

Pro studium funkce proteinu MLQ jsem se rozhodla vytvořit buněčnou linii z HEK293 buněk s defektem v syntéze proteinu MLQ pomocí RNA interference. Vzhledem k dlouhému poločasu obratu OXPHOS proteinů (Dai *et al.*, 2014) i požadavkům na velké množství buněk pro plánované experimenty jsem se rozhodla použít variantu se stabilní expresí shRNA vlásenek namísto častěji používané transientní transfekce hotovými vlásenkami. Testovala jsem pět shRNA komplementárních k exonu 2 proteinu MLQ. Western blotová analýza ukázala na jednu vlásenku, která snížila expresi proteinu o 43% v porovnání s kontrolní linií. Z dané linie jsem následně odvodila šest klonů pocházejících z jedné buňky, ale bohužel již nedošlo k výraznější redukci obsahu proteinu v buňkách – v neúspěšnějším klonu bylo detekováno 32% snížení obsahu proteinu. V případě MLQ se tedy bohužel nepotvrdily dobré zkušenosti s touto metodou, pomocí které byly v laboratoři připraveny modely s výrazně sníženou expresí podjednotek centrálního stonku ATP syntázy (Pecina *et al.*, v přípravě; Havlíčková *et al.*, 2010). Tyto linie tedy nebylo možné použít pro studium důsledků

sníženého množství proteinu MLQ. Jelikož se úspěšnost jednotlivých shRNA pohybuje okolo 50 % (Goel, Desai and Voorhoeve, 2010), bylo možné tento přístup dále optimalizovat použitím kombinace dvou a více vlásenek v jedné transfekci. Vzhledem k pozitivním výsledkům paralelně probíhajícího pokusu o úplné vyřazení genu metodou CRISPR už ale nebyla další optimalizace provedena.

Vytvoření buněčného modelu s inaktivovaným genem C14orf2 (MLQ KO) bylo dosaženo s metodou CRISPR Cas9 s párovanými nikázami. Podařilo se selektovat funkční pár gRNA, který byl transfekován do HEK293 buněk – z 92 klonů vzešly čtyři buněčné linie s absencí proteinu MLQ, také vznikly linie pravděpodobně obsahující mutaci, jejímž důsledkem je snížená exprese či stabilita proteinu MLQ. Dosažená úspěšnost úplného vyřazení genu v rozmezí 5 – 10 % odpovídá publikovaným údajům (Ran, Hsu, Wright, *et al.*, 2013). Na základě pozitivních zkušeností v tomto i jiných běžících projektech je nyní v naší laboratoři CRISPR Cas9 preferovanou metodou pro tvorbu nových buněčných modelů s deficiencemi OXPHOS proteinů.

5.2 Vliv chybějícího proteinu MLQ na strukturu a stabilitu ATP syntázy

V pilotní Western blotové analýze tří vybraných klonů MLQ KO byly testovány vybrané podjednotky F_1F_o -ATP syntázy – MLQ, $F_1\text{-}\beta$, $F_1\text{-}\gamma$, $F_o\text{-}a$, $F_o\text{-}b$, $F_o\text{-}c$ a DAPIT. Ukázalo se, že absence proteinu MLQ způsobuje, ať již přímo či nepřímo, výrazné snížení množství podjednotky *a* (protonový kanál v F_o doméně, který je kódovaný mtDNA) na 22% kontrolního průměru, také obsah podjednotky DAPIT byl redukován na 30 %. V menší míře, ale stále signifikantně pokleslo i množství podjednotky *c* (64% kontroly). Naopak obsah podjednotek F_1 domény a podjednotky *b* tímto knock-outem dotčen nebyl.

V následné analýze komplexů ATP syntázy pomocí nativních elektroforéz byly v rámci širší studie porovnány kontrolní WT linie a MLQ KO linie také s p^+ a p^0 buněčnými liniemi (Wittig *et al.*, 2010) – p je označení pro buňky linie 143B odvozené z buněk lidského osteosarkomu, kde p^0 postrádají mtDNA (a tedy neexprimují žádné mitochondriální proteiny, včetně ATP syntázových podjednotek *a* a A6L) a p^+ jsou jejich kontrolou. Obecně je komplex ATP syntázy MLQ KO buněk menší (minimálně díky chybějícímu proteinu MLQ), migruje tedy rychleji. Ukázalo se, že MLQ KO linie a p^0 linie vykazují podobný elektroforetický profil. Absence podjednotky *a* v p^0 buněčné linii vede k akumulaci subkomplexu ATP syntázy, který dále postrádá i podjednotky DAPIT, MLQ a A6L. V případě absence MLQ je detekován tentýž subkomplex, část komplexů je ale téměř kompletní a asociuje s nimi

reziduální množství podjednotky a přítomné v buňkách. Metodou volby pro studium mitochondriálních membránových komplexů je BNE-PAGE (Wittig and Schägger, 2008). Při jejím použití pro studium modelů s defekty biogeneze ATP syntázy má však své limity. Ukázalo se, že kvůli interferenci s Coomassie barvou dochází k rozpadu nestabilního enzymu v ρ^0 buňkách (Wittig *et al.*, 2010), což bylo dlouhou dobu vykládáno jako přítomnost asemblačních intermediátů. Obdobnou situaci jsme pozorovali i v MLQ KO buňkách, kde zbylé podjednotky F_0 disociují a jsou detekovány pouze stabilnější subkomplexy F_1 -c oligomer. Z výsledků elektroforetických analýz je možné formulovat hypotézu, že protein MLQ má pravděpodobnou úlohu ve stabilizaci podjednotek F_0 -domény – může mít roli v inkorporaci podjednotek do enzymu nebo je důležitý pro interakci mezi jednotlivými proteiny.

Tato zjištění se částečně rozcházejí s daty, která byla prezentována v publikaci Fujikawy a kol. (Fujikawa *et al.*, 2014). Této skupině se podařilo vytvořit studijní model z HeLa buněk s knock-downovaným MLQ proteinem (10-40% v porovnání s kontrolou) pomocí shRNA. V MLQ-KD buňkách pozorovali v SDS-PAGE i hrCNE-PAGE analýze snížení množství podjednotek α a β korelující s redukováním množství MLQ. Toto je ale v rozporu s výsledky této diplomové práce, kde knock-out podjednotky MLQ nijak neovlivnil proteiny F_1 domény a nevedl k tak generalizovanému defektu ATP syntázy. Stejně tomu je v buňkách s depletovanou mtDNA, tj. ρ^0 linie (Wittig *et al.*, 2010), nebo v cybridní linii odvozené z buněk pacienta s mikrolecí 9205delTA v mtDNA (chybění pouze podjednotky a) (Hejzlarová *et al.*, 2015), které mají podobný, avšak závažnější fenotyp, než jaký pozorujeme v MLQ KO buňkách (zcela postrádají protonový kanál, který je pro funkci ATP syntázy esenciální). V obou studiích došli autoři k závěru, že k poškození dochází v F_0 u podjednotek bezprostředně souvisejících s protonovým kanálem, zatímco F_1 doména je zachována včetně interakce s c kruhem a periferním stonkem. Rozdílná zjištění by mohla být také zapříčiněna použitím odlišných studijních modelů, kde japonský tým používal MLQ KD buněčnou linii vytvořenou lentivirovou transfekcí vektorů exprimujících shRNA, kdežto já jsem měla k dispozici buněčný model s úplně vyřazeným genem *c14orf2*. Ale i v tomto případě by se dalo spíše očekávat, že v MLQ KD, kde je přítomno reziduální množství zkoumaného proteinu, budou pozorovány mírnější projevy defektu než v buňkách, kde protein MLQ zcela chybí. Autoři dané publikace také připouštějí, že jejich způsob přípravy mitochondrií nejspíše vedl k nahromadění volných monomerů α a β , což naznačuje, že by jejich práce s mitochondriemi mohla být šetrnější. Je na škodu, že tato publikace není příliš detailní a japonská vědecká komunita nedetekovala také mtDNA kódované podjednotky ATP syntázy, protože by jejich závěry mohly více korespondovat s našimi nálezy.

V čem se oba výzkumy shodují, je ovšem hypotéza, že protein MLQ má stabilizační funkci. Pro její ověření by bylo vhodné využít metody pro zkoumání dynamiky (obratu) proteinů. Např. pomocí tzv. pulse-chase experimentů (McKenzie, Lazarou and Ryan, 2009) by bylo možné radioaktivním pulsem v kultivovaných buňkách označit mtDNA kódované podjednotky a proteinovými elektroforézami sledovat, zdali je jejich snížené množství způsobeno redukovanou syntézou, zhoršenou inkorporací do sestavovaného enzymu nebo rychlejší degradací v důsledku nestability enzymu.

5.3 Defekt ATP syntázy v oxidativní fosforylaci

Pomocí měření respirace permeabilizovaných buněk na oxygrafu jsem sledovala, jak se promítlo množství a asemblační stav do funkce oxidační fosforylace. Analyzovala jsem celkem čtyři stavy – OXPHOS kapacitu, tedy maximální funkční kapacitu ATP syntázy, stav 4 pro kontrolu, zda nedochází k nespecifickému toku H^+ z intermembránového prostoru do matrix, ETS kapacitu, tj. maximální aktivitu respiračního řetězce, a nakonec maximální funkční kapacitu komplexu IV. Změna ve funkci ATP syntázy byla signifikantní – oproti kontrolní linii byla OXPHOS kapacita MLQ KO linií o 38-56 % nižší. Spolu se signifikantně vyšší hodnotou UCR (kontrolní poměr mezi ETS kapacitou a OXPHOS kapacitou) a signifikantně nižší hodnotou RCR'ADP (kontrolní poměr mezi OXPHOS kapacitou a stavem 4) u MLQ KO linií oproti kontrolám (UCR = 2 – 2,67, RCR'ADP = 1,5 – 1,86, zatímco kontrolní linie UCR = 1,53, RCR'ADP = 3,34) jednoznačně ukazují na výrazný defekt enzymu. Pokud dáme do souvislosti respirometrická data s nálezy elektroforetických experimentů, lze předpokládat, že syntéza ATP u MLQ KO buněk probíhá na nestabilních a neúplných enzymových komplexech, jejichž obsah určuje residuální množství podjednotky ϵ . Z našich experimentů vyplývá, že její relativní množství je nižší než 30 % kontroly. Tato hodnota se udává jako prahové (tzv. threshold) množství ATP syntázy pro manifestaci biochemického defektů. U MLQ KO tedy došlo k podobně závažnému defektu respirace jako u buněk pacientů s deficiencí ATP syntázy způsobených mutacemi v asemblačním faktoru TMEM70 (Čížková *et al.*, 2008) nebo v genu kódujícím podjednotku ϵ (Mayr *et al.*, 2010) nebo u buněčných modelů odvozených od HEK293 s shRNA utišením exprese podjednotek centrálního stonku (Pecina *et al.*; Havlíčková *et al.*, 2010). Snížená funkční kapacita oxidační fosforylace a z toho vyplývající menší energetická výtěžnost zapříčinila posun MLQ KO buněk směrem ke glykolýze, jak bylo zjištěno měřením glykolytické kapacity v intaktních buňkách na přístroji Seahorse.

Ve stavu 4 byla spotřeba O₂ u MLQ KO stejná jako u kontrolních buněk, tudíž na nekompletní a nestabilní formě ATPázové komplexu u knock-outů nedochází k nespecifickému úniku H⁺, který by mohl disipovat mitochondriální membránový potenciál a tím ještě více prohloubit energetickou krizi v MLQ KO buňkách, jak je tomu u některých defektů ATP syntázy v kvasinkách (Duvezin-Caubet *et al.*, 2006). Díky nedostatečné kapacitě ATP syntázy lze naopak spekulovat, že vnitřní mitochondriální membrána je hyperpolarizována a může tak docházet ke zvýšení mitochondriální produkce reaktivních forem kyslíku (ROS) jako v jiných případech ATPázových deficiencí (Mráček *et al.*, 2006).

5.4 Vliv absence MLQ na komplexy respiračního řetězce

Oproti očekávání bylo během respirometrických analýz pozorováno i snížení hodnot kapacity ETS stejně jako i samotného komplexu IV, které jsou nezávislé na funkci ATP syntázy. Ač nebyly průměrné hodnoty u MLQ KO klonů signifikantně odlišné od kontrolních buněk komplexu IV, podnítil mě tento náález k dalším experimentům. Analýzou hladiny transkriptů pro mtDNA kódované podjednotky OXPHOS, jsem ve dvou ze tří MLQ KO linií (a to 4C6 a 1E12) prokázala signifikantní pokles mRNA exprimované z genu *COX3*, stejně jako v případě mRNA exprimovaných z genů *ATP6* (*F_o-a*), *ATP8* (*F_o-A6L*) a bicistronního nematurovaného transkriptu *ATP6-COX3* u jedné z MLQ KO linií. Defekt COX podjednotek byl prokázán i na úrovni proteinu pomocí Western blotu, jako snížené hladiny proteinů COX1, COX2 a COX3. Všechny tři metody (qPCR, western blot i respirometrická analýza) tedy navzájem korespondují a ukazují na defekt cytochrom c oxidázy v MLQ KO buňkách. Snížení obsahu COX v případě defektu protonového kanálu bylo již dříve pozorováno u kvasinek *S. cerevisiae* s vyřazením genu *ATP6*. V těchto kvasinkách byla následně narušena translace podjednotky COX1. (Rak *et al.*, 2007). Roli protonového kanálu v biogenezi komplexu IV diskutují Soto a kol. (Soto *et al.*, 2009) v kvasinkovém modelu postrádajícím protein ATP10, který je důležitým asemblačním faktorem ATP syntázy. Zjistili, že i u tohoto modelu je translace Cox1p proteinu (homolog COX1 v savcích) narušená a hladina COX1 podjednotky je významně snížena v buňkách s poškozenou ATP syntázou. Analogický náález byl v této práci pozorován i u lidských patientských buněk s mutacemi v genu kódujícím asemblační faktor ATP12 (chaperon podjednotky α). Naopak v patientských buňkách s obdobnou mírou deficience ATP syntázy, ale v důsledku absence TMEM70 bylo pozorováno kompenzační zvýšení obsahu komplexů III a IV, ke kterému dochází na posttranskripční úrovni (Havlíčková Karbanová *et al.*, 2012).

Mezi důkazy o vzájemné provázanosti obsahu různých OXPHOS komplexů patří např. i studie buněčných linií odvozených z myší s deficitem komplexu III – Acín-Pérez a kol. zjistili, že deficience

komplexu III způsobená mutací v jediné mtDNA kódované podjednotce enzymu vyústila také v destabilizaci asemblovaného komplexu I (Acín-Pérez *et al.*, 2004).

Všechny práce citované v této souvislosti popisovaly jevy odehrávající se až na translační, případně asemblační úrovni regulace exprese OXPHOS proteinů. Nejsou tedy zcela analogické k výsledkům u MLQ KO buněk, kde je defekt COX pozorován již na úrovni hladiny mRNA. Zda je tento jev jenom sekundárním důsledkem změn v energetice a metabolismu buněk s MLQ KO, nebo by mohl protein MLQ mít přímý funkční vliv na hladiny COX transkriptů, představuje zajímavou otázku pro další studium tohoto buněčného modelu.

5.5 Závěr

- Protein MLQ je podjednotkou F_o domény F_1F_o -ATP syntázy. Jeho knock-out v HEK293 buňkách vyústil v destabilizaci protonového kanálu a a také redukcí množství proteinu DAPIT a c -oligomeru.
- Funkční měření prokázaly signifikantní defekt ve funkční kapacitě ATP syntázy v MLQ KO buňkách, a také mírný, byť nesignifikantní vliv tohoto defektu na funkční kapacitu komplexu IV.
- V MLQ KO buňkách bylo také detekováno snížení hladiny mRNA genů *ATP6*, *ATP8* a *COX3*. Mitochondriálně kódované COX podjednotky byly sníženy i na proteinové úrovni, kdy jsme pozorovali pokles v hladinách proteinů COX1, COX2 a COX3.
- MLQ KO buňky v přítomnosti glukózy dávají přednost produkci ATP v glykolytické dráze před jejím využitím v mitochondriální respiraci.
- Hlavní úloha proteinu MLQ pravděpodobně spočívá v regulaci inkorporace podjednotky F_o - a při biogenezi ATP syntázy nebo v její stabilizaci v rámci F_o domény.

6 Reference

- Abrahams, J. P. *et al.* (1994) 'Structure at 2.8 Å resolution of F₁-ATPase from bovine heart mitochondria.', *Nature*, 370(6491), pp. 621–628.
- Acín-Pérez, R. *et al.* (2004) 'Respiratory complex III is required to maintain complex I in mammalian mitochondria', *Molecular Cell*, 13(6), pp. 805–815. doi: 10.1016/S1097-2765(04)00124-8.
- Ackerman, S. H. and Tzagoloff, A. (2005) 'Function, structure, and biogenesis of mitochondrial ATP synthase.', *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, 80, pp. 95–133. doi: 10.1016/S0079-6603(05)80003-0.
- Alavian, K. N. *et al.* (2014) 'An uncoupling channel within the c-subunit ring of the F₁FO ATP synthase is the mitochondrial permeability transition pore.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(29), pp. 10580–5. doi: 10.1073/pnas.1401591111.
- Alberts, B. *et al.* (2015) 'Molecular Biology of the Cell', in *Molecular Biology of the Cell*. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.
- Allegretti, M. *et al.* (2015) 'Horizontal membrane-intrinsic α -helices in the stator a-subunit of an F-type ATP synthase', *Nature*, 521, pp. 237–240. doi: 10.1038/nature14185.
- Anderson, S. *et al.* (1981) 'Sequence and organization of the human mitochondrial genome', *Nature*, pp. 457–465. doi: 10.1038/290457a0.
- Arnold, I. *et al.* (1998) 'Yeast mitochondrial F₁FO-ATP synthase exists as a dimer: Identification of three dimer-specific subunits', *EMBO Journal*, 17(24), pp. 7170–7178.
- Arnold, I. *et al.* (1999) 'ATP synthase of yeast mitochondria. Isolation of subunit j and disruption of the ATP18 gene.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 274(1), pp. 36–40. doi: 10.1074/JBC.274.1.36.
- Belogradov, G. I., Tomich, J. M. and Hatefi, Y. (1996) 'Membrane topography and near-neighbor relationships of the mitochondrial ATP synthase subunits e, f, and g', *Journal of Biological Chemistry*, 271(34), pp. 20340–20345. doi: 10.1074/jbc.271.34.20340.
- Bonora, M. *et al.* (2013) 'Role of the c subunit of the FO ATP synthase in mitochondrial permeability transition.', *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 12(4), pp. 674–83. doi: 10.4161/cc.23599.
- Boyer, P. D. (1975) 'A model for conformational coupling of membrane potential and proton translocation to ATP synthesis and to active transport', *FEBS Letters*, 58(1–2), pp. 1–6. doi: 10.1016/0014-5793(75)80212-2.
- Brunner, S., Everard-Gigot, V. and Stuart, R. a. (2002) 'Structure of the yeast F₁FO-ATP synthase forms homodimers', *Journal of Biological Chemistry*, 277(50), pp. 48484–48489. doi: 10.1074/jbc.M209382200.
- Cabezón, E. *et al.* (2000) 'Dimerization of bovine F₁-ATPase by binding the inhibitor protein, IF₁.', *The Journal of biological chemistry*, 275(37), pp. 28353–5. doi: 10.1074/jbc.C000427200.
- Cabezón, E. *et al.* (2000) 'Modulation of the oligomerization state of the bovine F₁-ATPase inhibitor protein, IF₁, by pH', *Journal of Biological Chemistry*, 275(33), pp. 25460–25464. doi: 10.1074/jbc.M003859200.
- Cabezón, E. *et al.* (2002) 'The structure of bovine IF₁, the regulatory subunit of mitochondrial F-ATPase', *EMBO Journal*, 20(24), pp. 6990–6996. doi: 10.1093/emboj/20.24.6990.
- Carroll, J. *et al.* (2006) 'Bovine complex I is a complex of 45 different subunits', *Journal of Biological Chemistry*, 281(43), pp. 32724–32727. doi: 10.1074/jbc.M607135200.

- Collinson, I. R. *et al.* (1996) 'The F1F0-ATPase complex from bovine heart mitochondria: the molar ratio of the subunits in the stalk region linking the F1 and F0 domains.', *Biochemistry*. American Chemical Society, 35(38), pp. 12640–6. doi: 10.1021/bi960969t.
- Čížková, A. *et al.* (2008) 'TMEM70 mutations cause isolated ATP synthase deficiency and neonatal mitochondrial encephalomyopathy.', *Nature genetics*, 40(11), pp. 1288–1290. doi: 10.1038/ng.246.
- D'Agostino, Y. and D'Aniello, S. (2017) 'Molecular basis, applications and challenges of CRISPR/Cas9: a continuously evolving tool for genome editing', *Briefings in Functional Genomics*, p. elw038. doi: 10.1093/bfgp/elw038.
- Dai, D. F. *et al.* (2014) 'Altered proteome turnover and remodeling by short-term caloric restriction or rapamycin rejuvenate the aging heart', *Aging Cell*, 13(3), pp. 529–539. doi: 10.1111/accel.12203.
- Davies, K. M. *et al.* (2011) 'Macromolecular organization of ATP synthase and complex I in whole mitochondria.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 108(34), pp. 14121–6. doi: 10.1073/pnas.1103621108.
- Davies, K. M. *et al.* (2012) 'Structure of the yeast F1Fo-ATP synthase dimer and its role in shaping the mitochondrial cristae', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(34), pp. 13602–13607. doi: 10.1073/pnas.1204593109.
- Denda, K. *et al.* (1989) 'A gene encoding the proteolipid subunit of Sulfolobus acidocaldarius ATPase complex', *J. Biol. Chem.*, 264(13), pp. 7119–7121.
- Diaz-Ruiz, R. *et al.* (2009) 'Tumor cell energy metabolism and its common features with yeast metabolism', *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, pp. 252–265. doi: 10.1016/j.bbcan.2009.07.003.
- Dubot, A. *et al.* (2004) 'GUG is an efficient initiation codon to translate the human mitochondrial ATP6 gene', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 313(3), pp. 687–693. doi: 10.1016/j.bbrc.2003.12.013.
- Dudkina, N. V. *et al.* (2005) 'Structure of dimeric ATP synthase from mitochondria: An angular association of monomers induces the strong curvature of the inner membrane', *FEBS Letters*, 579(25), pp. 5769–5772. doi: 10.1016/j.febslet.2005.09.065.
- Duvezin-Caubet, S. *et al.* (2006) 'A "petite obligate" mutant of Saccharomyces cerevisiae. Functional mtDNA is lethal in cells lacking the δ subunit of mitochondrial F1-ATPase', *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 281(24), pp. 16305–16313. doi: 10.1074/jbc.M513805200.
- Ernster, L. and Schatz, G. (1981) 'Mitochondria: A historical review', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.91.3.227s.
- Esch, F. S. and Allison, W. S. (1979) 'On the subunit stoichiometry of the F1-ATPase and the sites in it that react specifically with p-fluorosulfonylbenzoyl-5'-adenosine.', *Journal of Biological Chemistry*, 254(21), pp. 10740–10746.
- Faccenda, D. and Campanella, M. (2012) 'Molecular Regulation of the Mitochondrial F1Fo-ATP synthase: Physiological and Pathological Significance of the Inhibitory Factor 1 (IF1)', *International Journal of Cell Biology*, 2012, pp. 1–12. doi: 10.1155/2012/367934.
- Fearnley, I. M. and Walker, J. E. (1986) 'Two overlapping genes in bovine mitochondrial DNA encode membrane components of ATP synthase.', *The EMBO journal*, 5(8), pp. 2003–2008.
- Fernández-Vizarra, E., Tiranti, V. and Zeviani, M. (2009) 'Assembly of the oxidative phosphorylation

system in humans: what we have learned by studying its defects.', *Biochimica et biophysica acta*, 1793(1), pp. 200–11. doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.05.028.

Ferrick, D. A., Neilson, A. and Beeson, C. (2008) 'Advances in measuring cellular bioenergetics using extracellular flux', *Drug Discovery Today*, pp. 268–274. doi: 10.1016/j.drudis.2007.12.008.

Fujikawa, M. *et al.* (2014) 'Population of ATP synthase molecules in mitochondria is limited by available 6.8-kDa proteolipid protein (MLQ).', *Genes to cells: devoted to molecular & cellular mechanisms*, 19(2), pp. 153–60. doi: 10.1111/gtc.12121.

Galkin, A., Dröse, S. and Brandt, U. (2006) 'The proton pumping stoichiometry of purified mitochondrial complex I reconstituted into proteoliposomes.', *Biochimica et biophysica acta*, 1757(12), pp. 1575–81. doi: 10.1016/j.bbabi.2006.10.001.

Gibbons, C. *et al.* (2000) 'The structure of the central stalk in bovine F(1)-ATPase at 2.4 Å resolution.', *Nature structural biology*. Nature Publishing Group, 7(11), pp. 1055–61. doi: 10.1038/80981.

Giorgio, V. *et al.* (2009) 'Cyclophilin D modulates mitochondrial FOF1-ATP synthase by interacting with the lateral stalk of the complex', *Journal of Biological Chemistry*, 284(49), pp. 33982–33988. doi: 10.1074/jbc.M109.020115.

Giorgio, V. *et al.* (2013) 'Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(15), pp. 5887–92. doi: 10.1073/pnas.1217823110.

Gnaiger, E. (2008) 'Polarographic oxygen sensors, the oxygraph and high-resolution respirometry to assess mitochondrial function.', *Mitochondrial dysfunction in drug-induced toxicity.*, p. 327–52. doi: 10.1002/9780470372531.ch12.

Gnaiger, E. (2014) *Mitochondrial Pathways and Respiratory Control An Introduction to OXPHOS Analysis, Mitochondrial Physiology Network*. Available at: http://wiki.oroboros.at/images/f/fc/Gnaiger_2014_Mitochondr_Physiol_Network_MitoPathways.pdf.

Goel, S., Desai, K. and Voorhoeve, M. (2010) 'Chapter 2 – Genomic Technologies for Systems Biology', in *Systems Biomedicine*, pp. 15–44. doi: 10.1016/B978-0-12-372550-9.00002-X.

Hahn, A. *et al.* (2016) 'Structure of a Complete ATP Synthase Dimer Reveals the Molecular Basis of Inner Mitochondrial Membrane Morphology', *Molecular Cell*, 63(3), pp. 445–456. doi: 10.1016/j.molcel.2016.05.037.

Halestrap, A. P. *et al.* (1998) 'Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart', *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1366, pp. 79–94. doi: 10.1016/S0005-2728(98)00122-4.

Hardonnière, K. *et al.* (2017) 'Role for the ATPase inhibitory factor 1 in the environmental carcinogen-induced Warburg phenotype', *Scientific Reports*, 7(1), p. 195. doi: 10.1038/s41598-017-00269-7.

Havlíčková, V. *et al.* (2010) 'Knockdown of F1 epsilon subunit decreases mitochondrial content of ATP synthase and leads to accumulation of subunit c', *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1797(6–7), pp. 1124–1129.

Havlíčková Karbanová, V. *et al.* (2012) 'Compensatory upregulation of respiratory chain complexes III and IV in isolated deficiency of ATP synthase due to TMEM70 mutation.', *Biochimica et biophysica acta*, 1817(7), pp. 1037–43. doi: 10.1016/j.bbabi.2012.03.004.

He, J. *et al.* (2017) 'Persistence of the mitochondrial permeability transition in the absence of subunit

- c of human ATP synthase.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(13), pp. 3409–3414. doi: 10.1073/pnas.1702357114.
- Hejzlarová, K. *et al.* (2011) 'Expression and processing of the TMEM70 protein', *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1807(1), pp. 144–149. doi: 10.1016/j.bbabi.2010.10.005.
- Hejzlarová, K. *et al.* (2015) 'Alteration of structure and function of ATP synthase and cytochrome c oxidase by lack of F_o-a and Cox3 subunits caused by mitochondrial DNA 9205delTA mutation', *Biochem. J.*, 466, pp. 601–611. doi: 10.1042/BJ20141462.
- Heler, R., Marraffini, L. A. and Bikard, D. (2014) 'Adapting to new threats: The generation of memory by CRISPR-Cas immune systems', *Molecular Microbiology*, 93(1), pp. 1–9. doi: 10.1111/mmi.12640.
- Hong, S. and Pedersen, P. L. (2008) 'ATP synthase and the actions of inhibitors utilized to study its roles in human health, disease, and other scientific areas.', *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 72(4), p. 590–641, Table of Contents. doi: 10.1128/MMBR.00016-08.
- Horan, M. P., Pichaud, N. and Ballard, J. W. O. (2012) 'Review: Quantifying mitochondrial dysfunction in complex diseases of aging', *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, pp. 1022–1035. doi: 10.1093/gerona/qlr263.
- Horvath, P. and Barrangou, R. (2010) 'CRISPR/Cas, the Immune System of Bacteria and Archaea', *Science*, 327(5962), pp. 167–170. doi: 10.1126/science.1179555.
- Houštěk, J. *et al.* (1999) 'A novel deficiency of mitochondrial ATPase of nuclear origin', *Human Molecular Genetics*, 8(11), pp. 1967–1974. doi: 10.1093/hmg/8.11.1967.
- Houštěk, J., Kmoch, S. and Zeman, J. (2009) 'TMEM70 protein - A novel ancillary factor of mammalian ATP synthase', *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1787(5), pp. 529–532. doi: 10.1016/j.bbabi.2008.11.013.
- Chaudhry, Z. *et al.* (2013) 'Streptozotocin is equally diabetogenic whether administered to fed or fasted mice', *Laboratory Animals*, 47(4), pp. 257–265. doi: 10.1177/0023677213489548.Streptozotocin.
- Chen, R. *et al.* (2007) 'Association of two proteolipids of unknown function with ATP synthase from bovine heart mitochondria', *FEBS Letters*, 581(17), pp. 3145–3148. doi: 10.1016/j.febslet.2007.05.079.
- Ikon, N. and Ryan, R. O. (2017) 'Cardiolipin and mitochondrial cristae organization', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1859(6), pp. 1156–1163. doi: 10.1016/j.bbamem.2017.03.013.
- Iwata, S. *et al.* (1998) 'Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc(1) complex', *Science*, 281(5373), pp. 64–71. doi: 10.1126/science.281.5373.64.
- Jesina, P. *et al.* (2004) 'Diminished synthesis of subunit a (ATP6) and altered function of ATP synthase and cytochrome c oxidase due to the mtDNA 2 bp microdeletion of TA at positions 9205 and 9206', *The Biochemical journal*, 383(Pt. 3), pp. 561–571. doi: 10.1042/BJ20040407.
- Jinek, M. *et al.* (2012) 'A Programmable Dual-RNA – Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity', *Science (New York, N.Y.)*, 337(August), pp. 816–822. doi: 10.1126/science.1225829.
- Junge, W., Lill, H. and Engelbrecht, S. (1997) 'ATP synthase: an electrochemical transducer with rotatory mechanics', *Trends in Biochemical Sciences*, 22(11), pp. 420–423. doi: 10.1016/S0968-0004(97)01129-8.
- Kagawa, Y. and Racker, E. (1966) 'Partial Resolution of the Enzymes Oxidative Phosphorylation X. RECONSTRUCTION OF OLIGOMYCIN-SENSITIVE ADENOSINE TRIPHOSPHATASE', *Journal of Biological*

Chemistry, 241(10), pp. 2467–2474.

Kontro, H. *et al.* (2012) 'Cellular and tissue expression of DAPIT, a phylogenetically conserved peptide', *European Journal of Histochemistry*, 56(2), pp. 1–6. doi: 10.4081/ejh.2012.e18.

Kratochvílová, H. *et al.* (2014) 'Mitochondrial membrane assembly of TMEM70 protein', *Mitochondrion*, 15(1), pp. 1–9. doi: 10.1016/j.mito.2014.02.010.

Krause, F. *et al.* (2005) 'Active oligomeric ATP synthases in mammalian mitochondria', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 329(2), pp. 583–590. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.02.010.

Ladoukakis, E. D. and Zouros, E. (2017) 'Evolution and inheritance of animal mitochondrial DNA : rules and exceptions', *Journal of Biological Research-Thessaloniki*, 24(1), pp. 1–7. doi: 10.1186/s40709-017-0060-4.

Lee, J., Ding, S., *et al.* (2015) 'Organisation of Subunits in the Membrane Domain of the Bovine F-ATPase Revealed by Covalent Cross-linking', *Journal of Biological Chemistry*, p. jbc.M115.645283. doi: 10.1074/jbc.M115.645283.

Lee, J., Ding, S. J., *et al.* (2015) 'Organization of subunits in the membrane domain of the bovine F-ATPase revealed by covalent cross-linking', *Journal of Biological Chemistry*. in Press, 290(21), pp. 13308–13320. doi: 10.1074/jbc.M115.645283.

Mannella, C. A. (2006) 'The relevance of mitochondrial membrane topology to mitochondrial function', *Biochimica et biophysica acta*, 1762(2), pp. 140–147. doi: 10.1016/j.bbadis.2005.07.001.

Marraffini, L. A. and Sontheimer, E. J. (2010) 'CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea', *Nature Reviews Genetics*, 11(3), pp. 181–190. doi: 10.1038/nrg2749.

Martin, W. F., Garg, S. and Zimorski, V. (2015) 'Endosymbiotic theories for eukaryote origin.', *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 370(1678), p. 20140330. doi: 10.1098/rstb.2014.0330.

Masaïke, T. *et al.* (2008) 'Cooperative three-step motions in catalytic subunits of F(1)-ATPase correlate with 80 degrees and 40 degrees substep rotations.', *Nature structural & molecular biology*, 15(12), pp. 1326–1333. doi: 10.1038/nsmb.1510.

Mayr, J. A. *et al.* (2010) 'Mitochondrial ATP synthase deficiency due to a mutation in the ATP5E gene for the F1 ε subunit', *Human Molecular Genetics*. Oxford University Press, 19(17), pp. 3430–3439. doi: 10.1093/hmg/ddq254.

McKenzie, M., Lazarou, M. and Ryan, M. T. (2009) 'Chapter 18 Analysis of Respiratory Chain Complex Assembly with Radiolabeled Nuclear- and Mitochondrial-Encoded Subunits', *Methods in Enzymology*, 456, pp. 321–339. doi: 10.1016/S0076-6879(08)04418-2.

Meunier, B. *et al.* (2013) 'Respiratory complex III dysfunction in humans and the use of yeast as a model organism to study mitochondrial myopathy and associated diseases.', *Biochimica et biophysica acta*, 1827(11–12), pp. 1346–61. doi: 10.1016/j.bbabi.2012.11.015.

Meyer, B. *et al.* (2007) 'Identification of two proteins associated with mammalian ATP synthase', *Mol Cell Proteomics*, 6(10), pp. 1690–1699. doi: 10.1074/mcp.M700097-MCP200.

Mitchell, P. (1961) 'Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism.', *Nature*, 191, pp. 144–148. doi: 10.1038/191144a0.

Moradi-Ameli, M. and Godinot, C. (1983) 'Characterization of monoclonal antibodies against mitochondrial F1-ATPase', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80(20), pp. 6167–6171. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6194526>.

Mráček, T. *et al.* (2006) 'Two components in pathogenic mechanism of mitochondrial ATPase

- deficiency: Energy deprivation and ROS production', *Experimental Gerontology*, 41(7), pp. 683–687. doi: 10.1016/j.exger.2006.02.009.
- Nicholls, D. G. and Ferguson, S. J. (2013) *Bioenergetics, Bioenergetics*. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-388425-1.00005-1.
- Noji, H. *et al.* (1997) 'Direct observation of the rotation of F1-ATPase.', *Nature*, pp. 299–302. doi: 10.1038/386299a0.
- Ohsakaya, S. *et al.* (2011) 'Knockdown of DAPIT (diabetes-associated protein in insulin-sensitive tissue) results in loss of ATP synthase in mitochondria.', *The Journal of biological chemistry*, 286(23), pp. 20292–6. doi: 10.1074/jbc.M110.198523.
- Osman, C. *et al.* (2007) 'Prohibitins Interact Genetically with Atp23, a Novel Processing Peptidase and Chaperone for the F1F0-ATP Synthase', *Molecular Biology of the Cell*, 18, pp. 627–635. doi: 10.1091/mbc.E06.
- Päivärinne, H. and Kainulainen, H. (2001) 'DAPIT, a novel protein down-regulated in insulin-sensitive tissues in streptozotocin-induced diabetes', *Acta Diabetologica*, 38(2), pp. 83–86.
- Pecina, P. *et al.* (no date) 'Role of the mitochondrial ATP synthase central stalk subunits γ and δ in the activity and assembly of the mammalian enzyme', *v přípravě*.
- Penefsky, H. *et al.* (1960) 'Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. II. Participation of a soluble adenosine triphosphatase in oxidative phosphorylation.', *The Journal of biological chemistry*, 235, pp. 3330–3336. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13734097>.
- Pullman, M. *et al.* (1960) 'Partial Resolution Oxidative of the Enzymes Phosphorylation Catalyzing oxidative phosphorylation', *The Journal of biological chemistry*, 235(11), pp. 3322–3329.
- Pullman, M. E. and Monroy, G. C. (1963) 'A Naturally Occurring Inhibitor of Mitochondrial Adenosine Triphosphatase', *J. Biol. Chem.*, 238(11), pp. 3762–3769.
- Rak, M. *et al.* (2007) 'Yeast cells lacking the mitochondrial gene encoding the ATP synthase subunit 6 exhibit a selective loss of complex IV and unusual mitochondrial morphology', *Journal of Biological Chemistry*, 282(15), pp. 10853–10864. doi: 10.1074/jbc.M608692200.
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Lin, C. Y., *et al.* (2013) 'Double nicking by RNA-guided CRISPR cas9 for enhanced genome editing specificity', *Cell*, 154(6), pp. 1380–1389. doi: 10.1016/j.cell.2013.08.021.
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., *et al.* (2013) 'Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system.', *Nat Protoc*, 8(11), pp. 2281–2308. doi: 10.1038/nprot.2013.143.
- Rühle, T. and Leister, D. (2015) 'Assembly of F1F0-ATP synthases', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. Elsevier B.V. doi: 10.1016/j.bbabi.2015.02.005.
- Rutter, J., Winge, D. R. and Schiffman, J. D. (2010) 'Succinate dehydrogenase - Assembly, regulation and role in human disease.', *Mitochondrion*, 10(4), pp. 393–401. doi: 10.1016/j.mito.2010.03.001.
- Sagan, L. (1967) 'On the Origin of Mitosing Cells', *Journal of Theoretical Biology*, pp. 225–274.
- Sánchez-Aragó, M. *et al.* (2013) 'Expression, regulation and clinical relevance of the ATPase inhibitory factor 1 in human cancers.', *Oncogenesis*, 2(October 2012), p. e46. doi: 10.1038/oncsis.2013.9.
- Senior, A. E. and Brooks, J. C. (1971) 'The subunit composition of the mitochondrial oligomycin-insensitive ATPase', *FEBS Letters*, 17(2), pp. 327–329. doi: 10.1016/0014-5793(71)80178-3.
- Schagger, H. (2006) 'Tricine-SDS-PAGE', *Nature Protocols*, 1(1), pp. 16–22. doi: nprot.2006.4 [pii];10.1038/nprot.2006.4 [doi].

- Schägger, H. and von Jagow, G. (1987) 'Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa', *Analytical Biochemistry*, 166(2), pp. 368–379. doi: 10.1016/0003-2697(87)90587-2.
- Schägger, H. and Pfeiffer, K. (2000) 'Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria.', *The EMBO journal*, 19(8), pp. 1777–1783. doi: 10.1093/emboj/19.8.1777.
- Soto, I. C. *et al.* (2009) 'Synthesis of cytochrome c oxidase subunit 1 is translationally downregulated in the absence of functional F1FO-ATP synthase', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1793(11), pp. 1776–1786. doi: 10.1016/j.bbamcr.2009.09.002.
- Stock, D., Leslie, A. G. and Walker, J. E. (1999) 'Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase.', *Science (New York, N.Y.)*, 286(5445), pp. 1700–1705. doi: 10.1126/science.286.5445.1700.
- Strauss, M. *et al.* (2008) 'Dimer ribbons of ATP synthase shape the inner mitochondrial membrane.', *The EMBO journal*, 27(7), pp. 1154–60. doi: 10.1038/emboj.2008.35.
- Sun, F. *et al.* (2005) 'Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II.', *Cell*, 121(7), pp. 1043–57. doi: 10.1016/j.cell.2005.05.025.
- Szkudelski, T. (2001) 'The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas', *Physiological Research*, pp. 537–546.
- Terzi, E. *et al.* (1990) 'Isolation and amino acid sequence of a novel 6.8-kDa mitochondrial proteolipid from beef heart. Use of FAB-MS for molecular mass determination', *FEBS Letters*, 260(1), pp. 122–126. doi: 10.1016/0014-5793(90)80082-T.
- Tran, Q. M. *et al.* (2006) 'The Quinone Binding Site in Escherichia coli Succinate Dehydrogenase Is Required for Electron Transfer to the Heme b *', *Published JBC Papers in Press*. doi: 10.1074/jbc.M607476200.
- Tsukihara, T. *et al.* (1996) 'The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å.', *Science (New York, N.Y.)*, 272(5265), pp. 1136–1144.
- Tzagoloff, A. *et al.* (2004) 'Atp10p Assists Assembly of Atp6p into the FO Unit of the Yeast Mitochondrial ATPase', *Journal of Biological Chemistry*, 279(19), pp. 19775–19780. doi: 10.1074/jbc.M401506200.
- Walker, J. E. *et al.* (1985) 'Primary structure and subunit stoichiometry of F1-ATPase from bovine mitochondria', *Journal of Molecular Biology*, 184(4), pp. 677–701. doi: 10.1016/0022-2836(85)90313-4.
- Walker, J. E. (1994) 'The regulation of catalysis in ATP synthase', *Current Opinion in Structural Biology*, 4(6), pp. 912–918. doi: 10.1016/0959-440X(94)90274-7.
- Walker, J. E. (1998) 'ATP synthesis by rotary catalysis (Nobel lecture)', in *Angewandte Chemie - International Edition*, pp. 2308–2319. doi: 10.1002/(SICI)1521-3773(19980918)37:17<2308::AID-ANIE2308>3.0.CO;2-W.
- Walker, J. E. (2012) 'The ATP synthase: The understood, the uncertain and the unknown', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, p. S1.
- Wang, Z. G., White, P. S. and Ackerman, S. H. (2001) 'Atp11p and Atp12p are Assembly Factors for the F1-ATPase in Human Mitochondria', *Journal of Biological Chemistry*, 276(33), pp. 30773–30778. doi: 10.1074/jbc.M104133200.
- Watt, I. N. *et al.* (2010) 'Bioenergetic cost of making an adenosine triphosphate molecule in animal

- mitochondria.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(39), pp. 16823–16827. doi: 10.1073/pnas.1011099107.
- Wirth, C. *et al.* (2016) 'Structure and function of mitochondrial complex I', *BBA - Bioenergetics*, 1857(7), pp. 902–914. doi: 10.1016/j.bbabi.2016.02.013.
- Wittig, I. *et al.* (2010) 'Assembly and oligomerization of human ATP synthase lacking mitochondrial subunits a and A6L.', *Biochimica et biophysica acta*. Elsevier B.V., 1797(6–7), pp. 1004–11. doi: 10.1016/j.bbabi.2010.02.021.
- Wittig, I., Braun, H.-P. and Schägger, H. (2006) 'Blue native PAGE.', *Nature protocols*, 1(1), pp. 418–428. doi: 10.1038/nprot.2006.62.
- Wittig, I. and Schägger, H. (2005) 'Advantages and limitations of clear-native PAGE', *Proteomics*, 5(17), pp. 4338–4346. doi: 10.1002/pmic.200500081.
- Wittig, I. and Schägger, H. (2008) 'Features and applications of blue-native and clear-native electrophoresis', *Proteomics*. WILEY-VCH Verlag, pp. 3974–3990. doi: 10.1002/pmic.200800017.
- Zeng, X. *et al.* (2008) 'ATP25, a New Nuclear Gene of *Saccharomyces cerevisiae* Required for Expression and Assembly of the Atp9p Subunit of Mitochondrial ATPase', *Molecular biology of the cell*, 19(1), pp. 308–317. doi: 10.1091/mbc.E07.
- Zeng, X., Hourset, A. and Tzagoloff, A. (2007) 'The *Saccharomyces cerevisiae* ATP22 gene codes for the mitochondrial ATPase subunit 6-specific translation factor', *Genetics*, 175(1), pp. 55–63. doi: 10.1534/genetics.106.065821.
- Zeng, X., Neupert, W. and Tzagoloff, A. (2007) 'The Metalloprotease Encoded by ATP23 Has a Dual Function in Processing and Assembly of Subunit 6 of Mitochondrial ATPase', *Molecular Biology of the Cell*, 18, pp. 617–626. doi: 10.1091/mbc.E06.
- Zhang, J. *et al.* (2016) 'LIN28 Regulates Stem Cell Metabolism and Conversion to Primed Pluripotency', *Cell Stem Cell*, 19(1), pp. 66–80. doi: 10.1016/j.stem.2016.05.009.
- Zhou, A. *et al.* (2015) 'Structure and conformational states of the bovine mitochondrial ATP synthase by cryo-EM', *eLife*, 4. doi: 10.7554/eLife.10180.