

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE - PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA GENETIKY A MIKROBIOLOGIE



KONSTRUKCE A OPTIMALIZACE MITOCHONDRIÁLNÍHO ČIPU

Diplomová práce

Alena Čížková

Praha 2004

Vedoucí diplomové práce: **MUDr. Josef Houštěk, DrSc.**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

Souhlasím se zapůjčením práce ke studijním účelům.

V Praze dne 27. 4. 2004

Alena Čížková

Tato práce byla umožněna za podpory grantů IGA MZ ČR (NE 65 33 – 3), Centra integrované genomiky (LN 00A079), Výzkumného záměru 111100003 1. LF UK a Výzkumného záměru AVOZ 5011922 FgÚ.

Na tomto místě bych chtěla poděkovat MUDr. Josefu Houšťkovi, DrSc. za systematické vedení, zájem, ochotu a čas, který věnoval mé práci. Děkuji také Ing. Stanislavu Kmochovi, CSc. za odborné konzultace a všem členům laboratoře ÚDMP 1. LF a laboratoře Bioenergetiky FgÚ AV ČR, především Ing. Lence Piherové, Mgr. Robertu Ivánkovi a Mgr. Janu Paulovi za cenné rady a obětavou pomoc při práci.

OBSAH

| | |
|---|-----------|
| 1. ÚVOD..... | 8 |
| 2. CÍLE..... | 9 |
| 3. PŘEHLED LITERATURY | 10 |
| 3.1 STRUKTURA A FUNKCE MITOCHONDRIE..... | 10 |
| 3.1.1 Lokalizace a tvar mitochondrie..... | 10 |
| 3.1.2 Funkce mitochondrie | 11 |
| 3.1.3 Oxidační fosforylace..... | 11 |
| 3.2 BIOGENEZE MITOCHONDRIÍ | 13 |
| 3.2.1 Mitochondriální genom..... | 14 |
| 3.2.2 Kooperace mezi ncDNA a mtDNA..... | 16 |
| 3.2.3 Transport proteinů..... | 19 |
| 3.3 MITOCHONDRIÁLNÍ ONEMOCNĚNÍ..... | 22 |
| 3.3.1 Poruchy mtDNA | 22 |
| 3.3.2 Poruchy ncDNA..... | 25 |
| 3.4 EXPRESE MITOCHONDRIÁLNÍCH GENŮ ZA FYZIOLOGICKÝCH A PATOLOGICKÝCH PODMÍNEK..... | 28 |
| 3.5 STUDIUM GENOVÉ EXPRESE..... | 30 |
| 3.6 DNA ČIP | 30 |
| 3.6.1 Základní charakteristika..... | 30 |
| 3.6.2 Konstrukční postupy | 31 |
| 3.6.3 Využití čipu - hybridizace a analýza dat..... | 32 |
| 4. MATERIÁL A METODY..... | 34 |
| 4.1 MATERIÁL..... | 34 |
| 4.1.1 Chemikálie..... | 34 |
| 4.1.2 Roztoky..... | 35 |
| 4.1.3 Kity..... | 36 |
| 4.1.4 Biologický materiál..... | 36 |
| 4.1.5 Přístroje..... | 36 |
| 4.1.6 Počítačové vybavení a programy pro čipové technologie..... | 37 |
| 4.1.7 Databáze..... | 37 |
| 4.2 METODY | 38 |
| 4.2.1 Příprava nosičů..... | 38 |
| 4.2.2 Navržení sekvencí a příprava oligonukleotidů..... | 39 |
| 4.2.3 Tisk, fixace sond, blokování pozadí..... | 39 |
| 4.2.4 Izolace RNA | 40 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 4.2.5 | Značení cDNA | 41 |
| 4.2.6 | Hybridizace | 44 |
| 4.2.7 | Získání a analýza dat – statistika..... | 44 |
| 4.2.8 | Uchování dat - BioArray Software Environment (BASE)..... | 45 |
| 5. | VÝSLEDKY | 46 |
| 5.1 | OPTIMALIZACE POUŽITÝCH METOD | 46 |
| 5.1.1 | Výběr genů..... | 46 |
| 5.1.2 | Navržení sekvencí a příprava oligonukleotidů..... | 46 |
| 5.1.3 | Izolace RNA | 47 |
| 5.1.4 | Značení cDNA | 48 |
| 5.1.5 | Hybridizace | 49 |
| 5.2 | MITO-ČIP VERZE 1..... | 49 |
| 5.3 | HODNOCENÍ KVALITY SIGNÁLU | 53 |
| 5.3.1 | Získané úrovně signálu | 53 |
| 5.3.2 | Detekce exprese genů v modelových buňkách a tkáních | 56 |
| 5.3.3 | Skener - vyhodnocování..... | 57 |
| 5.4 | MITO-ČIP VERZE 2..... | 61 |
| 5.5 | MITO-ČIP VERZE 3..... | 62 |
| 6. | DISKUSE..... | 64 |
| 6.1 | TECHNOLOGIE DNA ČIPŮ | 64 |
| 6.2 | NAVRŽENÍ A KONSTRUKCE MITO-ČIPU..... | 65 |
| 6.3 | IZOLACE RNA A PŘÍPRAVA cDNA..... | 66 |
| 6.4 | DETEKCE HYBRIDIZAČNÍCH SIGNÁLŮ A VYHODNOCENÍ DAT | 66 |
| 6.5 | ROZŠÍŘENÉ FORMY MITO-ČIPU..... | 68 |
| 7. | ZÁVĚR | 70 |
| 8. | POUŽITÁ LITERATURA..... | 71 |
| 9. | PŘÍLOHY..... | 82 |

Seznam zkratek

| | |
|------------------------|--|
| AMK | aminokyselina |
| ATP | adenozintrifosfát |
| ATPáza | H ⁺ -translokující F ₀ F ₁ -ATP-syntáza |
| bp | páry bází (<i>base pairs</i>) |
| BSA | bovinní sérový albumin |
| cDNA | komplementární DNA |
| DCE | dichlorethan |
| D-loop | D-smyčka |
| DMSO | dimethylsulfoxid |
| dUTP | deoxyuridintrifosfát |
| EtOH | ethanol |
| FA | formamid |
| FADH ₂ /FAD | flavinadenindinukleotid |
| Hsp | <i>Heat-shock protein</i> |
| IF ₁ | proteinový inhibitor F ₁ části ATPázy |
| kDa | kilodalton |
| MilliQ | demineralizovaná voda |
| Mt1, Mt3, Mt4 | <i>metallothionein 1, 3, 4</i> |
| mtDNA | mitochondriální DNA |
| mTERF | mitochondriální transkripční terminační faktor |
| mTFA | mitochondriální transkripční faktor A |
| mTFB | mitochondriální transkripční faktor B |
| NADH/NAD ⁺ | nikotinamidadenindinukleotid |
| ncDNA | jaderná DNA |
| NRF-1, NRF-2 | jaderný respirační faktor (<i>nuclear respiratory factor</i>) |
| OXPHOS | oxidační fosforylace (<i>oxidative phosphorylation</i>) |
| Pi | anorganický fosfát |
| PCR | polymerázová řetězová reakce (<i>polymerase chain reaction</i>) |
| PGC-1 α | transkripční koaktivátor 1 α integrující s PPAR γ (<i>peroxisome proliferator-activated receptor-gama coactivator 1 alpha</i>) |

| | |
|---------|---|
| PPAR | receptor aktivovaný peroxizomálními proliferátory (<i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>) |
| QRT-PCR | kvantitativní real time – PCR |
| RC | respirační řetězec (<i>respiratory chain</i>) |
| RNA | ribonukleová kyselina |
| PRC | <i>PGC-1α-related coactivator</i> |
| RT | reverzní transkripce |
| RT PCR | polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí |
| SDS | dodecyl sulfát sodný |
| Sp1 | stimulační protein 1 (<i>stimulating protein 1</i>) |
| TIM | translokáza vnitřní mitochondriální membrány (<i>translocase of the inner membrane</i>) |
| TOM | translokáza vnější mitochondriální membrány (<i>translocase of the outer membrane</i>) |
| YY1 | ying yang 1 (<i>yin yang 1</i>) |

1. ÚVOD

Mitochondrie jsou velmi důležitými a nepostradatelnými organelami eukaryotické buňky. Zabezpečují tvorbu většiny buněčného ATP, univerzálního energetického “paliva“ buňky. V procesu oxidační fosforylace (OXPHOS) hraje hlavní roli dýchací řetězec (RC) a mitochondriální F_0F_1 -ATP-syntáza (ATPáza). Dýchací řetězec a ATPáza jsou multipodjednotkové komplexy. Podjednotky OXPHOS komplexů jsou kódovány jaderným i mitochondriálním genomem. Vzájemná koordinace obou genomů je nezbytná k expresi přibližně 100 mitochondriálních genů nutných pro biosyntézu podjednotek a sestavení funkčních OXPHOS komplexů.

O biogenezi mitochondrií a její regulaci toho stále víme poměrně málo a zůstává mnoho otázek, na které zatím neznáme odpověď. Jednoznačně lze říci, že pokud dojde k mutacím OXPHOS genů, ať už v ncDNA (jaderné DNA) nebo mtDNA (mitochondriální DNA), projeví se to na funkci mitochondrií a v energetickém metabolismu organismu. Komplexnost a vzájemná provázanost energetického metabolismu stěhuje snahy porozumět kooperaci mezi genomy. K objasnění těchto vztahů je důležité porozumět expresi „mitochondriálních“ genů za různých fyziologických či patologických stavů, neboť exprese genů se mění v závislosti na stavu a potřebách buňky. Změny v genové expresi můžeme pozorovat buď jednotlivě, např. pomocí northern blotu a QRT-PCR (kvantitativní real-time PCR) nebo u velkého množství genů metodou DNA čipu. Výhodou této metody je, že umožňuje srovnávat expresní profily standardní s expresními profily patologickými. K popsání patologických mechanismů je výhodné sledovat změny exprese většího množství genů, a proto je perspektivní využití DNA čipu i k diagnostickým účelům.

V současné době známe již celou řadu onemocnění, která mají svůj původ v poruchách funkce mitochondrií. Pro nositele takovéto poruchy to může představovat velmi závažné následky. Vzhledem k chybějící kauzální léčbě je velmi důležitá rychlá a spolehlivá diagnostika mitochondriálních chorob. Z tohoto důvodů bylo naším cílem vytvořit mitochondriální oligonukleotidový čip, který nám umožní studovat expresi širokého spektra genů, a tak snáze identifikovat daný defekt.

2. CÍLE

- vytvořit a otestovat oligonukleotidový čip pro sledování exprese mitochondriálních genů a jaderných genů souvisejících s funkcí mitochondrie
- optimalizovat dílčí kroky přípravy čipu, jako je úprava skel a příprava sond, a zefektivnit techniky izolace RNA a značení cDNA
- provést pilotní hybridizační experimenty testující funkčnost (detekční schopnost) jednotlivých oligonukleotidů s využitím různých biologických materiálů
- provést analýzu kontrolních vzorků vybraných tkání a tkáňových kultur
- navrhnout a rozšířit soubor „mitochondriálních“ oligonukleotidů

3. PŘEHLED LITERATURY

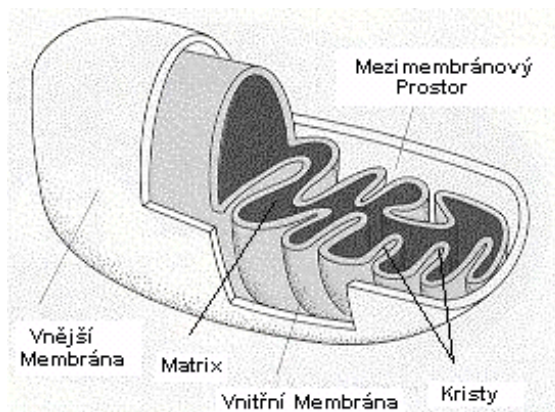
3.1 STRUKTURA A FUNKCE MITOCHONDRIE

3.1.1 Lokalizace a tvar mitochondrie

Mitochondrie byly objeveny již v 19. století. Jsou to orgány charakterizované vysokým stupněm genetické a metabolické autonomie, lokalizované v cytoplazmě eukaryotních buněk. Tvarově jsou velmi rozmanité, ale nejvíce dominuje tvar elipsoidní. Na šířku mají 0,5 – 1 μm , délka se pohybuje v rozmezí 1 – 3 μm . V závislosti na energetických nárocích buňky se počet mitochondrií v jedné buňce pohybuje od desítek až po několik tisíc.

Mitochondrie je ohraničena dvěma membránami, vnější a vnitřní, které vymezují mezimembránový a vnitřní mitochondriální prostor, neboli matrix. Membrány jsou od sebe vzdáleny 8 – 10 nm a vzájemně se liší strukturou i funkcí (viz Obr. 3.1). Vnější membrána obsahuje poriny umožňující transport látek do velikosti 10 kDa. Vnitřní membrána tvoří křisty a je bohatší na proteiny, než membrána vnější. Kromě komplexů dýchacího řetězce obsahuje i četné transportní proteiny, které regulují průchod některých metabolitů, např. ATP, ADP, pyruvátu, vápenatých iontů, fosfátu a jiných. Látky, jako oxid uhličitý, kyslík či molekuly vody, membránou volně prostupují.

Proteiny, podílející se na transportu elektronů a oxidační fosforylaci, jsou zabudovány do vnitřní membrány. Množství a velikost povrchu křist odráží intenzitu oxidačně fosforylačního metabolismu v daném buněčném typu nebo tkáni. Například jaterní tkáň (mající nízkou rychlost respirace) obsahuje mitochondrie s poměrně malým množstvím křist, kdežto mitochondrie srdečního svalu jich obsahuje mnoho (Voet and Voet, 1995).



Obr. 3.1: Mitochondrie.

Upraveno podle <http://faculty.nl.edu/jste/mitoch1.gif>

3.1.2 Funkce mitochondrie

Buňky potřebují neustálý přísun energie pro růst a udržovací děje (housekeeping processes). Mezi ně patří především udržování iontových gradientů na membránách a obnova organických složek buňky. Buňka se iontovým složením cytoplazmy vždy liší od zevního prostředí.

Buňka pro své potřeby používá energii uloženou v univerzálním palivu, neboli molekule ATP. Syntéza ATP je výsledkem přeměny energie obsažené v substrátech. U aerobních organismů je hlavním zdrojem energie aerobní respirace, při které dochází k postupné oxidaci substrátů až na H_2O . Právě aerobní respirace je dějem, který probíhá na vnitřní mitochondriální membráně. Takto je získáváno až 90% energie, která je následně využita buňkou k syntéze ATP z ADP a anorganického fosfátu. Celý děj je katalyzován komplexem oxidační fosforylace zabudovanými do vnitřní mitochondriální membrány.

3.1.3 Oxidační fosforylace

Volná energie, potřebná k tvorbě ATP, je získána z oxidace NADH a $FADH_2$ v řetězci transportu elektronů sérií čtyř proteinových komplexů, kterými elektrony postupně procházejí směrem od nižších k vyšším redoxním potenciálům až na molekulární kyslík (Voet and Voet, 1995). Řetězec je složen ze čtyř proteinových komplexů a dvou mobilních přenašečů (viz Obr. 3.2). Energie uvolňovaná při transportu elektronů respiračním řetězcem je využívána k tvorbě elektrochemického potenciálu gradientu protonů. Komplexy I, III a IV využívají energii elektronového přenosu k translokaci protonů přes vnitřní mitochondriální membránu a produkují tak protonový gradient. Ten je využíván mitochondriální ATPázou, komplexem V, ke katalýze syntézy ATP.

Komplex I (NADH-ubichinon reduktáza)

Komplex I je nejsložitějším multipodjednotkovým komplexem dýchacího řetězce. Jeho velikost v savčích mitochondriích je zhruba 850 kDa a skládá se ze 43 podjednotek. Dále komplex obsahuje molekulu flavinmononukleotidu (FMN) a šest až sedm Fe-S center. Komplex přenáší elektrony z NADH na CoQ (koenzym Q), což je první mobilní přenašeč elektronů. Elektronový transport je spojen s translokací protonů přes vnitřní mitochondriální membránu.

Komplex II (sukcinát-ubichinon reduktáza)

Jako jediný komplex v systému OXPHOS je plně kódován pouze jadernou DNA. Komplex tvoří čtyři podjednotky, dvě hydrofilní (SDH1, SDH2) a dvě hydrofóbní (SDH3, SDH4), molekulová hmotnost komplexu je 120 kDa. Největší podjednotka komplexu SDH1 – 70 kDa obsahuje kovalentně vázaný FAD. SDH2 je Fe-S proteinovou podjednotkou tvořenou ze tří Fe-S skupin přenášejících elektrony ze sukcinátu na CoQ.

Komplex III (ubichinol-cytochrom *c* reduktáza)

Komplex o velikost 480 kDa je tvořen z 11 podjednotek (proteiny Core1, Core2, cytochrom *b*, cytochrom *c*₁, Fe-S protein, nízkomolekulární polypeptidy). Elektrony jsou zde přenášeny z redukovaného CoQ na cytochrom *c*, druhý mobilní přenašeč. Komplex translokuje dva protony na každý elektron, který komplexem projde.

Komplex IV (cytochrom *c* oxidáza, COX)

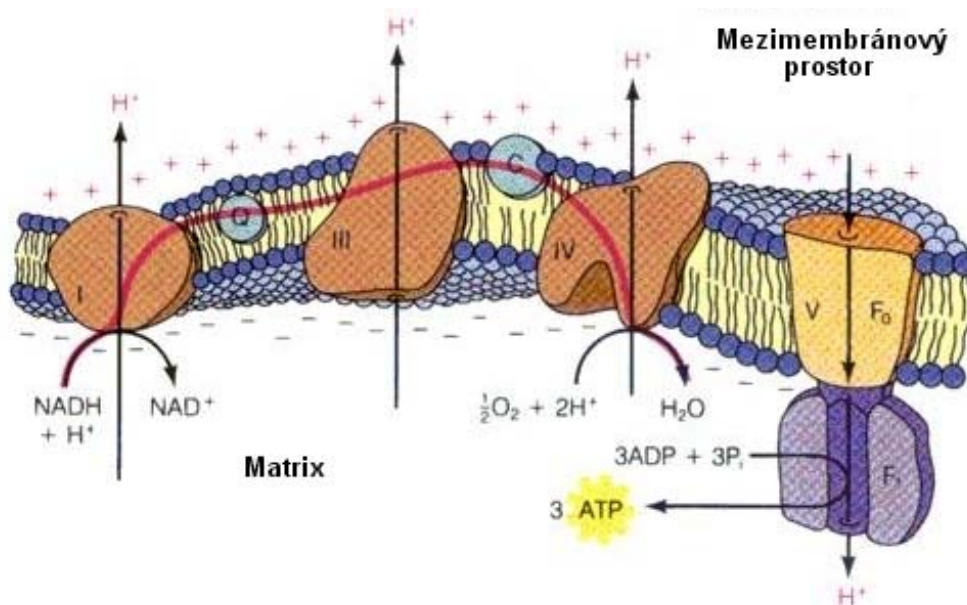
Komplex IV je terminálním enzymovým komplexem dýchacího řetězce, jeho velikost je 205 kDa. Komplex předává elektrony přinášené redukovaným cytochromem *c* na kyslík, který je redukován na vodu. Dochází zde k transportu H⁺. Savčí COX se skládá ze 13 polypeptidových podjednotek. Podjednotky COX1, COX2 a COX3 jsou kódovány mtDNA, zbývající podjednotky kóduje ncDNA. Komplex IV má tvar „Y“ a je umístěn v membráně transverzálně. Větší část komplexu zasahuje do mezimembránového prostoru. Hydrofóbní podjednotky COX1 a COX2 obsahují atomy mědi Cu_A a Cu_B a hemy *a* a *a*₃, jež tvoří čtyři redoxní centra pro přenos elektronů (Chung, et al., 1992, Musatov, 1991). Pro správnou funkci COX je nutná interakce podjednotky COX3 s typickým fosfolipidem vnitřní mitochondriální membrány – kardiolipinem (Robinson, 1993). Podjednotky COX2 a COX3 interagují s transmembránovou doménou COX1, nikoli však navzájem mezi sebou.

Komplex V (F₀F₁-ATP-syntáza)

Komplex V je posledním enzymovým komplexem systému OXPHOS. Komplex o velikost 670 kDa se skládá ze dvou sektorů: membránově vázaného F₀ a solubilního F₁. Segment F₁ katalyzuje ATP syntézu/hydrolýzu. F₀ segment obsahuje protonoforický kanál, kterým protony tečou do mitochondriální matrix a jejich energie je využívána k syntéze ATP v F₁ sektoru (Hatefi, 1985). Savčí ATP-syntáza je tvořena 16 podjednotkami, sektor F₀ je tvořen z deseti a sektor F₁ z pěti podjednotek a inhibitorového proteinu IF₁. Komplex katalyzuje syntézu ATP, která je poháněná

elektrochemickým potenciálem gradientu protonů vytvářeným komplexy I, III a IV. Část ATP použije mitochondrie pro svou vlastní potřebu, ale většina je transportována mimo organelu pomocí adeninnukleotidového přenašeče pro další buněčné funkce (Hatefi, 1985, Saraste, 1999).

Některé komplexy dýchacího řetězce jsou těsněji propojeny a tvoří superkomplexy. Po objevení superkomplexů v dýchacím řetězci bakterií a kvasinek byla jejich přítomnost potvrzena i v savčích mitochondriích. Vzájemná interakce byla ukázána nejen mezi komplexy I a III, a III a IV, ale také mezi komplexy I a IV (Schagger and Pfeiffer, 2000).



Obr. 3.2: Dýchací řetězec.

Upraveno podle <http://www.aw-bc.com/mathews/ch15/fi15p15.gif>

3.2 BIOGENEZE MITOCHONDRIÍ

Mitochondriální biogeneze je výsledkem vzájemně řízené kooperace jaderného a mitochondriálního genomu (Contamine and Picard, 2000). Jaderný genom kóduje většinu mitochondriálních proteinů, což zahrnuje některé podjednotky respiračního řetězce a všechny proteiny nutné pro replikaci, transkripci a translaci mtDNA. Kromě toho je zde řada transkripčních faktorů, které ovlivňují expresi jaderně kódovaných mitochondriálních proteinů.

Mitochondriální preproteiny vzniklé v cytoplasmě jsou transportovány na místo určení, kde nabývají finální konformace. Transportu se účastní soubor Hsp proteinů a

specifických přenašečů přes vnější a vnitřní mitochondriální membránu.

Mitochondriální proteiny rozdělujeme podle funkce na proteiny strukturní, proteiny účastníci se biogeneze, sestavování, transportu a proteiny proteosyntetického aparátu. Přibližně 1000 proteinů s mitochondriální funkcí se podílí na širokém spektru biochemických drah (Mootha, et al., 2003, Thorburn, 2004). Mutace v jednom z těchto genů nemusí ovlivnit vlastní mitochondriální biogenezi, ale na úrovni celého organismu může být příčinou vážného onemocnění. (Scheffler, 2000).

Funkci a vlastní regulaci mitochondriálních procesů ovlivňuje řada faktorů. Časový faktor představuje funkční mitochondriální změny objevující se v průběhu stárnutí organismu. Rozdílné energetické nároky zohledňuje tkáňový faktor. Mezi tkáně s nejvyššími energetickými nároky patří mozek, sval a játra. Rozdílná energetická potřeba různých tkání a proces stárnutí ovlivňuje složité regulační mechanismy, stupeň biogeneze a zánik mitochondrie. To se odráží i v různé expresi genů, která je důsledkem stárnutí, typu tkáně i možných negativních změn, např. mutací, se kterými se musí organismus vyrovnat.

Funkční omezení či dysfunkce mitochondrií je výsledkem řady faktorů a změn. Mutace genu může vyvolat nefunkčnost příslušného proteinu. Jeho úloha pak musí být kompenzována zvýšenou expresí jiných genů, vyvolávající reakci celého biogenetického aparátu. Změny můžeme pozorovat buď jednotlivě pomocí QRT-PCR, northern blotu nebo globálně, např. metodami DNA čipu. DNA čipy mohou nést tisíce sond, a tím nám umožní studovat míru exprese širokého spektra genů a zároveň sledovat jejich vzájemné interakce v rámci buňky. Celkově technologie DNA čipů umožní lépe porozumět energetickému metabolismu a fungování mitochondrií.

3.2.1 Mitochondriální genom

Mitochondriální DNA byla objevena v šedesátých letech minulého století. Současně byly popsány komplexy dýchacího řetězce, mobilní přenašeče a ATP-syntáza. V roce 1981 byla kompletně osekvenovaná savčí mtDNA.

Mitochondriální genom savců je tvořen dvouvláknou kruhovou molekulou DNA (mtDNA), která má u člověka velikost 16 569 bp (viz Obr. 3.3). Vlákna mtDNA jsou označovaná jako lehký a těžký řetězec podle vznášivé hustoty v gradientu cesium chloridu. Nekódující sekvence představuje méně než 1/10 délky a z toho je naprostá

většina lokalizována do oblasti D-loop (D smyčky). Velikost D-loop je ~ 900 bp. Menší částí nekódující sekvence je oblast replikačního počátku lehkého řetězce (30 bp).

Mitochondriální genom kóduje 37 genů, z toho 22 tRNA, 2 rRNA a 13 strukturních proteinů. Asi 77 % kódující sekvence nese informaci pro proteiny, 14 % pro rRNA a 9 % pro tRNA. Všechny geny kódující strukturní proteiny kódují proteiny oxidační fosforylace. Jedná se o 7 z 39 podjednotek komplexu I, 1 z 10 podjednotek komplexu III, 3 ze 13 podjednotek komplexu IV a 2 z 16 podjednotek komplexu V (viz Tab. 3.1).

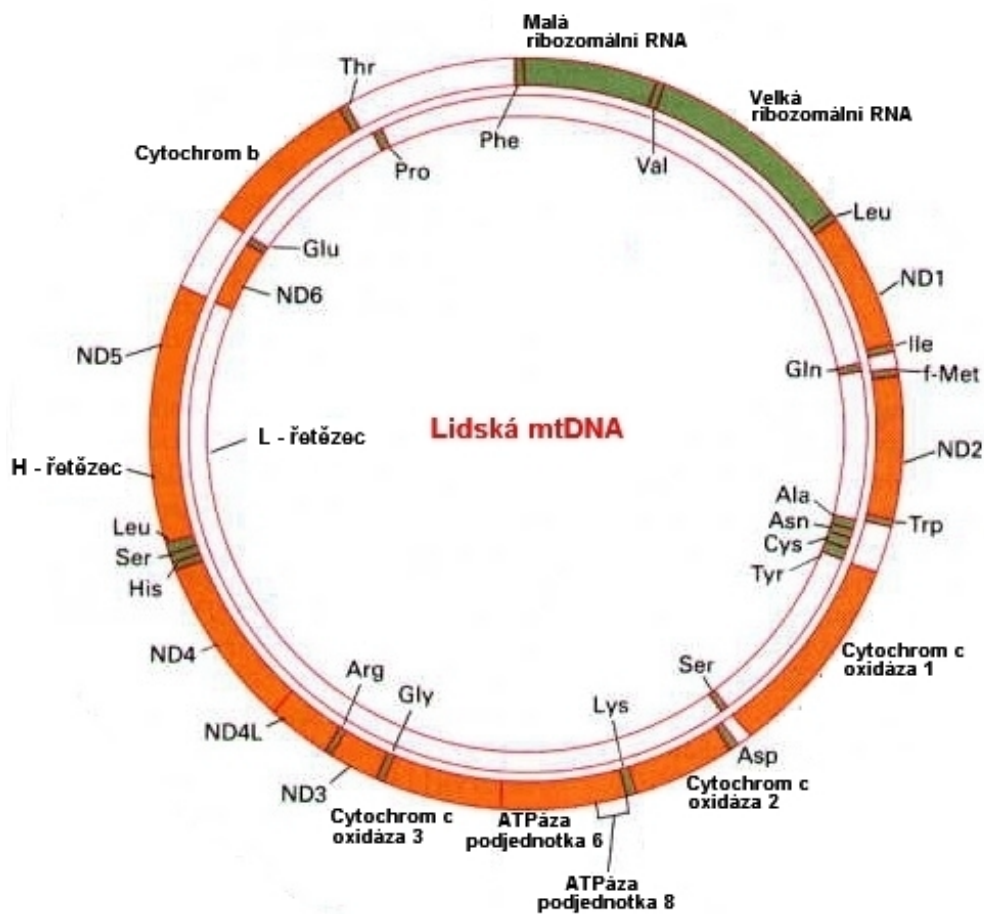
| Komplex | Gen |
|---------|------------------|
| I. | ND1 - ND6, ND4L |
| III. | CYTB |
| IV. | COX1, COX2, COX3 |
| V. | ATP6-a, ATP8-A6L |

Tab. 3.1: Geny mtDNA kódující strukturní proteiny oxidační fosforylace.

Informace je mezi oba řetězce rozdělena nerovnoměrně. Těžký řetězec nese informaci pro většinu strukturních genů i RNA, lehký řetězec kóduje jen 8 tRNA a jednu podjednotku dýchacího řetězce z komplexu I.

Mitochondriální genom je uspořádán velmi úsporně. Nekódující sekvence jsou minimalizovány a nacházíme zde i překryvy kódujících sekvencí. K překryvům dochází střídáním lehkého a těžkého řetězce v kódování, nebo posunem čtecích rámců. (Larsson, et al., 1994, Poulton, et al., 1994). Příkladem je bicistronní transkript podjednotek mitochondriální ATP-syntázy (a, A6L) (Anderson, et al., 1981).

Každá buňka je vybavena určitým množstvím mitochondrií a každá mitochondrie obsahuje několik kopií mtDNA. Běžná somatická buňka tak obsahuje 1 - 5 x 10³ kopií mtDNA na buňku, ale počet mtDNA je v různých lidských buňkách rozdílný. Pohybuje se v rozmezí 10 - 10⁴ (Chen, et al., 1995, Lightowers, et al., 1997, Piko and Taylor, 1987). Molekuly mtDNA neplavou volně v matrix, ale tvoří malé shluky (nukleoidy) několika kopií, které se přichytávají k vnitřní membráně (Yaffe, 1999).



Obr. 3.3: Savčí mitochondriální genom. Upraveno podle (Lodish, 2000).

3.2.2 Kooperace mezi ncDNA a mtDNA

Komplexy OXPHOS jsou multipodjednotkové a tvoří je proteiny kódované jadernou i mitochondriální DNA. Biogeneze těchto komplexů je komplikovaná právě díky nutné souhře dvou genomů, jaderného a mitochondriálního. Příkladem může být mitochondriální ATPáza, která je tvořena z 16 podjednotek, z toho 2 kóduje mtDNA a zbylých 14 ncDNA. Nezbytná je proto správná koordinace exprese podjednotek tak, aby vznikly funkční komplexy. To však nevylučuje, aby byly některé geny transkribovány s vyšší intenzitou, než je třeba. Zde se pak uplatňuje složitý systém post-transkripčních regulací, které se týkají jak jednotlivých mRNA, tak de-novo vytvořených proteinů (Andersson, et al., 2000, Goldberg, 1992, Tvrdik, et al., 1992).

Byly objeveny dvě skupiny transkripčních regulátorů, které hrají důležitou úlohu v mitochondriální biogenezi. První skupinou jsou transkripční faktory, které přímo nebo

nepřímo ovlivňují expresi a funkci dýchacího řetězce (NRF-1, NRF-2, Sp1, YY1). Druhou, nedávno objevenou, skupinou jsou transkripční koaktivátory, které se neváží na DNA, ale na transkripční faktory či jiné koaktivátory, a tím regulují genovou expresi (PGC-1 α , PGC-1 β , PRC). Nové poznatky podporují závěr, že mitochondriální biogeneze je závislá na souhře těchto dvou skupin jaderných faktorů (Scarpulla, 2002).

NRF-1 (nuclear respiratory factor 1)

NRF-1 a NRF-2 hrají důležitou roli v jaderně-mitochondriální komunikaci. NRF-1 se váže do GC-bohatých promotorových sekvencí několika genů, mezi nimiž jsou i geny OXPHOS, faktory regulující replikaci a transkripci mtDNA a gen pro 12S mitoribozomální protein. Působí při aktivaci exprese genů zabezpečujících buněčný růst a zisk energie.

NRF-1 spojuje regulaci jaderně kódovaných mitochondriálních proteinů s mitochondriální transkripcí, neboť reguluje expresi genu pro TFAM (mitochondriální transkripční faktor A) (Virbasius and Scarpulla, 1994).

NRF-2 (nuclear respiratory factor 2)

NRF-2 je složen z pěti podjednotek (α , β_1 , β_2 , γ_1 , γ_2). K DNA se váže pouze podjednotka α (Scarpulla, 2002). Vazebná místa pro NRF-2 obsahují GGAA motiv, který je charakteristický pro transkripční faktory s ETS-doménou (Carter, et al., 1992, Virbasius and Scarpulla, 1991). Vazba NRF-2 na čtyři opakující se ETS-domény aktivuje expresi genů pro podjednotky cytochrom *c* oxidázy (COXVb) (Virbasius, et al., 1993).

Sp1 (stimulating protein1)

Sp1 může působit jako pozitivní i jako negativní regulační element u genů kódujících proteiny OXPHOS (Zaid, et al., 1999). Represivní působení Sp1 je např. u promotoru pro β podjednotku ATP-syntázy (Zaid, et al., 1999), naopak jako pozitivní regulátor působí u promotorů pro geny cytochrom *c* oxidázy (Grossman and Lomax, 1997, Lenka, et al., 1998). Sp1 je tvořen ze tří motivů „zinc-finger“.

YY1 (yin yang 1)

YY1 je dalším faktorem se schopností pozitivní i negativní regulace transkripce. Příkladem jeho pozitivní regulace je gen SURF1. Stejně jako NRF-1 je exprimován již v časně embryogenezi (Scarpulla, 2002).

PGC-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha)

PGC-1 α je součástí malé rodiny transkripčních koaktivátorů, která zahrnuje blízké homology PGC-1 β a PRC (PGC-1 related coactivator) (Glass and Rosenfeld, 2000). U celé skupiny nacházíme velkou míru homologie v N a C terminální části proteinu. Zvláštností této skupiny je přítomnost transkripční aktivační domény a současně i RNA vazebné domény na jedné molekule (Puigserver and Spiegelman, 2003).

Nedávné studie prokázaly zásadní úlohu PGC-1 α v regulaci mitochondriální biogeneze a termogeneze (Puigserver and Spiegelman, 2003). V hnědé tukové tkáni souvisí vysoká hladina exprese PGC-1 α s termogenní funkcí a v kosterním svalu pozorujeme indukci mitochondriální biogeneze vyvolanou expresí PGC-1 α . Zvýšení exprese PGC-1 α je způsobena chladem nebo adrenergními stimuly. Působením PGC-1 α je vyvolaná exprese NRF-1, NRF-2 a MTF1. Fyzická interakce mezi NRF-1 a PGC-1 α stimuluje transkripční aktivitu.

Kontrolu nad transkripcí jaderných genů pro mitochondriální proteiny zabezpečují cis elementy. Mezi cis elementy hrající roli v regulaci transkripce genů OXPHOS patří např. OXBOX, REBOX, Mt1, Mt3 a Mt4. Jejich regulační schopnosti se vzájemně liší dle zastoupení v genomu, síly účinku nebo tkáňové specifity.

OXBOX, REBOX

Jsou regulační sekvence popsané u genů pro ANT (Adenine Nucleotide Translocator) a β podjednotku ATPázy (Chung, et al., 1992, Li, et al., 1990). Jsou funkčně odlišné, ale sekvenčně částečně podobné. OXBOX působí tkáňově specificky ve svalech, REBOX je přítomen ve všech buněčných typech.

Mt1, Mt3, Mt4 (methalothionein 1, 3, 4)

Mt1, 3, 4 jsou dalšími cis-regulačními elementy. Byly nalezeny u enzymů OXPHOS (Suzuki, et al., 1990). U podjednotek α a β ATPázy byly popsány jako nezbytné pro maximální míru exprese (Pierce, et al., 1992, Suzuki, et al., 1990, Tomura, et al., 1990).

Transkripce mtDNA je podobná transkripci bakteriální DNA a je pod jadernou kontrolou, které se účastní přímo nebo zprostředkovaně řada regulačních faktorů. DNA polymeráza je jaderně kódovaná, stejně jako transkripční faktory, které známe tři, TFAM (mtTFA, mitochondriální transkripční faktor A), nedávno objevené TFB1M (mitochondriální transkripční faktor B1), TFB2M (mitochondriální transkripční faktor

B2) (Falkenberg, et al., 2002, McCulloch, et al., 2002) a mTERF (mitochondriální transkripční terminační faktor).

Jaderně kódovaný TFAM je klíčový pro koordinaci obou genetických systémů, a tím i pro mitochondriální biogenezi. Gen TFAM tvoří sedm exonů a šest intronů (Larsson, et al., 1997) a jeho exprese je pod kontrolu NRF-1 a NRF-2 (Escriva, et al., 1999). TFAM je důležitý k aktivaci transkripce mtDNA a k tvorbě RNA primerů nutných k replikace mtDNA (Choi, et al., 2004). TFAM je DNA vazebný 25 kDa velký protein, který je transkripčním aktivátorem na těžkém i lehkém řetězci mtDNA (Fisher and Clayton, 1988). Běžně je navázáno ~ 900 molekul TFAM na jednu molekulu mtDNA (Alam, et al., 2003). Polymeráza a TFAM zahajuje syntézu RNA ze tří různých promotorů, které jsou lokalizovány do oblasti D-loop. Dva promotory jsou pro těžký řetězec (H1, H2) a jeden pro lehký řetězec (L). Přepisem tak vznikají tři polycistrony, které jsou rozštěpeny endo a exonukleázami, např. RNázou P. Vzniknou tak maturované rRNA, tRNA a mRNA. Promotor H2 je zodpovědný za syntézu dvou rRNA, 12S a 16S.

TFB1M a TFB2M jsou silně sekvenčně homologní s bakteriální rRNA methyltransferázou. V přítomnosti TFAM a RNA polymerázy mohou oba faktory, TFB1M i TFB2M, ovlivnit promotorově specifickou iniciaci transkripce (Falkenberg, et al., 2002).

mTERF je tvořen ze dvou hlavních domén a tří motivů leucinového zipu. Motivy leucinového zipu tvoří intramolekulární trojvláknou strukturu „coiled coil“. K vazbě na mtDNA je nutná přítomnost všech pěti částí. Studie ukazují, že k terminaci transkripce je vedle mTERF ještě nutná účast další komponenty (Fernandez-Silva, et al., 1997). Afinita mTERF k mtDNA je výrazně zeslabena záměnou A → G uprostřed vazebné sekvence (Hess, et al., 1991, Chomyn, et al., 1992).

3.2.3 Transport proteinů

Jaderně kódované mitochondriální proteiny jsou syntetizovány v cytozolu jako preproteiny, které mají buď interní signální sekvenci, nebo typickou N-koncovou signální sekvenci. N-koncová sekvence je nazývána „Mitochondrial Targeting Peptide“ (mTP) (Mihara, 2000). Sekvence mTP je bohatá na arginin, alanin a serin (Bannai, et al., 2002). Negativně nabitých AMK, jako je kyselina asparagová a glutamová, je méně

(von Heijne, et al., 1989). Je složená z 20 - 80 AMK a může vytvářet helix s amfipatickými vlnitostmi. V matrix je sekvence zpravidla odstraněna matrixovou peptidázou. Transportované proteiny jsou v nesbaleném stavu přenášeny do mitochondrie pomocí tří translokáz. Jedna se nachází ve vnější membráně a zbylé dvě ve vnitřní. Po dokončení přenosu a odštěpení signální sekvence protein zaujme finální podobu.

Translokázu vnější mitochondriální membrány složenou celkem z osmi proteinů nazýváme TOM (Translocase of the Outer Membrane). Je tvořena z póru a několika receptorů, které váží buď preproteiny s presekvencí (Tom20-Tom22) nebo preproteiny s interními signálními sekvencemi (Tom70-Tom37). Pór (GIP-General Import Pore) má velikost ~ 400 kDa a je tvořen hlavním proteinem Tom40. Tom5 je nejmenší z Tom proteinů a je spojený s Tom40. Plní funkci mediátoru mezi proteinovými receptory a pórem. Stabilitu celého póru zajišťuje Tom6 a Tom7 (Honlinger, et al., 1996).

Vnitřní mitochondriální membrána obsahuje dvě odlišné translokázy označované TIM (Translocase of the Inner Membrane). Tim22 přenáší hydrofóbní proteiny s kryptickou signální sekvencí přímo do vnitřní membrány s využitím elektrochemického potenciálu (Hofmann, et al., 2002). Komplex Tim23 zabezpečuje transport pro proteiny s presekvencí a vyžaduje energii elektrochemického potenciálu i přítomnost ATP v matrix (Hofmann, et al., 2002). K fungování komplexu Tim23 je nutný produkt genu DDP1 (Deafness Dystonia Peptide 1). DDP1 patří do rodiny malých TIM proteinů společně s TIM13, na který se váže. Tyto proteiny se účastní především předávání prekurzoru mezi TIM a TOM translokázami. Tim44 v komplexu s mtHsp70 zajišťuje transport preproteínů do matrix. Maturovaný protein váže chaperon HSP60 a jeho co-chaperonin cpn10, které umožní proteinu zaujmout finální konformaci (Hood, et al., 2003).

Oba komplexy TOM a TIM jsou lokalizovány do míst, kde se vnější a vnitřní membrány mitochondrie téměř dotýkají, což usnadňuje přenos preproteínů z jednoho komplexu na druhý (Schwaiger, et al., 1987). Tato místa vzájemného kontaktu nazýváme „Contact sites“ (Hackenbrock, 1968) a jejich rozměry jsou přibližně 20 nm (Reichert and Neupert, 2002).

V mitochondriích dochází také k přenosu proteinů z matrix do vnitřní mitochondriální membrány. Jaderně kódovaná translokáza Oxa1 zajišťuje přenos mitochondriálně i jaderně kódovaných proteinů do vnitřní mitochondriální membrány

(He and Fox, 1997, Hell, et al., 2001). C-koncová α helikální doména proteinu je orientovaná do matrix (Herrmann, et al., 1997), kde umožňuje vazbu na mitochondriální ribozomy. Vzájemná interakce mezi translačním aparátem a membránově vázanou translokázou umožňuje kotranslační transport vznikajících proteinů (Szyrach, et al., 2003). Translokáza Oxa1 je homooligomer složený ze čtyř podjednotek Oxa1 (43 kDa). Celý komplex má velikost 170 – 180 kDa (Nargang, et al., 2002). Delece C-koncové domény znemožňuje interakci Oxa1 s ribozomy. Následně dochází k akumulaci produktů mitochondriální translace v matrix, což způsobuje absenci některých komplexů dýchacího řetězce ve vnitřní mitochondriální membráně (Szyrach, et al., 2003).

Biogeneze proteinů vnitřní mitochondriální membrány se účastní také kontrolní proteolytický systém. Evolučně silně konzervovaný systém je tvořen ze dvou prohibitinových proteinů (Phb1, Phb2), dvou AAA proteáz (mAAA, iAAA) a z ABC transportéru (Arnold and Langer, 2002).

Prohibitiny představují nový typ membránově vázaných chaperonů. Zabezpečují rychlou vazbu na nově syntetizované proteiny, a tak je ochrání před degradací AAA proteázami. Delece genů pro oba prohibitiny způsobí okamžitou degradaci nově nasyntetizovaných proteinů proteázou mAAA. Naopak jejich zvýšená exprese zabráni degradaci špatně složených proteinů (Nijtmans, et al., 2000). Dále bylo ukázáno, že exprese prohibitinů je zvýšena v případě disbalance mezi expresí jaderného a mitochondriálního genomu, což souvisí i s jejich funkcí regulátoru AAA proteázových komplexů (Artal-Sanz, et al., 2003).

Rodina proteáz AAA (ATPases Associated with a number of cellular Activities) (Neuwald, et al., 1999, Vale, 2000) zabezpečuje degradaci proteinů v eubakteriích, chloroplastech a mitochondriích (Langer, 2000). AAA proteázy tvoří komplex velký přibližně 1000 kDa, ale nevíme nic o jeho struktuře ani o stechiometrii jeho podjednotek. Proteáza mAAA je složená ze dvou podjednotek a svou katalytickou část má lokalizovanou do matrix. Druhá proteáza iAAA tvoří pravděpodobně homooligomer a je tvořena jedním transmembránovým úsekem. Její katalytická část je orientována do mezimembránového prostoru.

Proteiny určené k degradaci jsou nejdříve štěpeny mAAA proteázou v matrix, následně jsou přeneseny pomocí ABC transportéru na proteázu iAAA. Peptidy

z mezimembránového prostoru přecházejí přes vnější membránu pasivní difúzí. Difúze probíhá buď přes poriny, nebo přes TOM (Langer, et al., 2001).

3.3 MITOCHONDRIÁLNÍ ONEMOCNĚNÍ

Mutační rychlost mtDNA je mnohonásobně vyšší než u ncDNA. Je to díky bezprostřednímu působení volných radikálů vznikajících v respiračním řetězci, nepřítomnosti efektivních DNA opravných mechanismů a absenci ochranných DNA vazebných proteinů, jako jsou histony. Mitochondriální onemocnění jsou heterogenní skupinou poruch postihující hlavně energetický metabolismus. Jsou způsobovány poruchami jaderného či mitochondriálního genomu nebo vnějšími faktory. Postihují tkáň v různé míře, především v závislosti na jejich nárocích na energii a schopnosti tvorby ATP mimo oxidační fosforylaci. S defekty v oxidační fosforylaci mohou souviset i různé degenerativní procesy. Aplikace této hypotézy poskytla nové pochopení značně rozsáhlých klinických problémů jako jsou ischemická choroba srdeční, pozdní propuknutí diabetu, Parkinsonova choroba, Alzheimerova choroba a stárnutí (Wallace, 1992).

U onemocnění vázaných na poruchy mitochondriálního genomu je třeba vzít v úvahu odlišnou mitochondriální genetiku. V buňce se nachází mnoho kopií mtDNA, proto se mitochondriální genetika řídí zákony populační genetiky. Naopak jaderný genetický systém, který obsahuje diploidní sadu chromozómů, se řídí genetikou mendelovskou. Pokud dojde k mutaci v mtDNA, může se mutace rozšířit do všech kopií mtDNA a tento stav nazýváme homoplazmie. V případě, že bude buňka současně obsahovat mutované a normální kopie mtDNA, je ve stavu heteroplazmie. Heteroplazmie se vyjadřuje procentem mutovaného genotypu a až do určité prahové hodnoty se na genotypu neprojeví. Prahová hodnota je pro jednotlivé respirační komplexy i pro různé tkáně odlišná vzhledem k jejich nárokům na energii. Nejčastěji postiženými tkáněmi jsou kosterní svalstvo, myokard, centrální nervová soustava a játra (Lightowers, et al., 1997, Rossignol, et al., 2003).

3.3.1 Poruchy mtDNA

Mezi poškození mitochondriálního genomu patří bodové mutace a přestavby genomu, jako jsou delece a inserce. Bodových mutací bylo popsáno už více než 190

(<http://www.mitomap.org>). Byly zjištěny v rRNA, tRNA i strukturních genech a jsou nejčastější příčinou mitochondriálních onemocnění. Většina mitochondriálních onemocnění vyvolaných mutací mtDNA se dědí maternálně, deplece a některé delece mtDNA mají dědičnost mendelovskou.

Mírnější mitochondriální mutace mohou být homoplazmické, zatímco těžké poškození OXPHOS systému jsou většinou vyvolány heteroplazmickými mutacemi, neboť homoplazmie by byla neslučitelná se životem (Houstek, 2000). Heteroplazmie se vyvíjí různě podle toho, zda jde o bodovou mutaci nebo delecii. Zatímco bodové mutace se dědí výhradně maternálně, delece jsou většinou sporadické, nebo v některých případech autozomálně dědičné. Mitochondriální onemocnění popisované jako jeden syndrom může mít různou genetickou podstatu a také jeden typ mutace může mít velmi odlišný klinický průběh a manifestaci. Lepší klasifikace by byla podle genetických poruch, což je nesnadné v praxi. Ve skutečnosti se proto používá směs obou typů dělení (Houstek, 2000, Smeitink, et al., 2001).

Mutace mtDNA (viz Obr. 3.4) postihují pouze OXPHOS, tedy jednotlivé komplexy dýchacího řetězce. Tato onemocnění jsou velmi závažná především proto, že výrazně narušují energetický metabolismus organismu. Jednotlivá onemocnění můžeme rozčlenit do několika skupin (viz Tab. 3.2).

První skupinu tvoří **bodové mutace** strukturních genů OXPHOS, způsobující mitochondriální myopatie, diabetes mellitus, LHON (Leber's Hereditary Optic Neuropathy), NARP (Neurogenic muscle weakness, Ataxia, Retinitis Pigmentosa) a Leighův syndrom. Dále mohou bodové mutace zasáhnout geny tRNA a rRNA, což má za následek vznik myopatií, kardiomyopatií, diabetes mellitus nebo encefalopatií, příkladem jsou syndromy MELAS (Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis and Stroke-like syndrome) a MERRF (Myoclonic Epilepsy and Ragged Red Fibers).

Druhou skupinu tvoří **přestavby mtDNA**, tedy rozsáhlé delece a duplikace, způsobující Pearsonův syndrom, Woframův syndrom (Eller, et al., 2001) a KSS (Kearns-Sayre Syndrome) patřící do skupiny CPEO (Chronic Progressive External Ophthalmoplegia).

Třetím typem jsou poruchy v replikaci mtDNA, projevující se velmi nízkým obsahem mtDNA v buňce, tzv. **deplece mtDNA**. Mají většinou tkáňově specifický charakter. Alpers - Huttenlocher syndrom je způsoben jaderně řízenou deplecí mtDNA.

Podrobnější charakteristiky onemocnění

LHON (Leber's Hereditary Optic Neuropathy)

Tímto onemocněním jsou postihováni především muži. Typicky se začíná projevovat před třicátým rokem života. Charakteristickým projevem je postupná ztráta zraku, při které nejprve dochází k výpadku středu zorného pole, díky atrofii očního nervu (Wallace, et al., 1988).

MELAS (Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis and Stroke-like syndrome)

Je to nejčastější maternálně dědičná mitochondriální choroba. Projevuje se mozkovou mrtvicí u mladých lidí, typicky do čtyřicátého roku věku. Dalšími projevy jsou encefalopatie (demence, záchvaty), laktózová acidóza a křeče (Shoffner, 1996).

MERRF (Myoclonic Epilepsy and Ragged Red Fibers)

Jádrem klinických projevů je poškození CNS, myoklonie, ataxie a epileptické záchvaty. V poškozené svalové tkáni dochází k hromadění mitochondrií v subsarkolematické oblasti. Dalšími rysy, které se mohou vyskytovat, jsou demence, hluchota, oční atrofie a malý vzrůst. Histologické vyšetření ukazuje přítomnost ragged-red fibres (subsarkolemální nahromadění zmnožených mitochondrií) (Wallace, et al., 1988).

NARP (Neurogenic muscle weakness, Ataxia, Retinitis Pigmentosa)

Hlavní projevy tohoto syndromu jsou obsaženy už v jeho názvu. Kromě neuropatie, ataxie a retinitis pigmentosa se projevuje zpožděným vývinem a demencí.

KSS (Kearns-Sayre Syndrome)

Tento syndrom je charakterizován především poškozením oka (retinitis pigmentosa), ataxií, srdeční disritmií, hluchotou a chronickou progresivní externí ophtalmoplegií (CPEO). CPEO je „obrna pohledu nahoru“, při které postižený jedinec musí při pohledu nad horizont zaklonit hlavu. Na očním pozadí bývá retinis pigmentosa, na EKG převodní porucha a v mozkomíšním moku zvýšená koncentrace bílkovin (Ballinger, et al., 1992, Ballinger-SW, et al., 1994).

Leighův syndrom

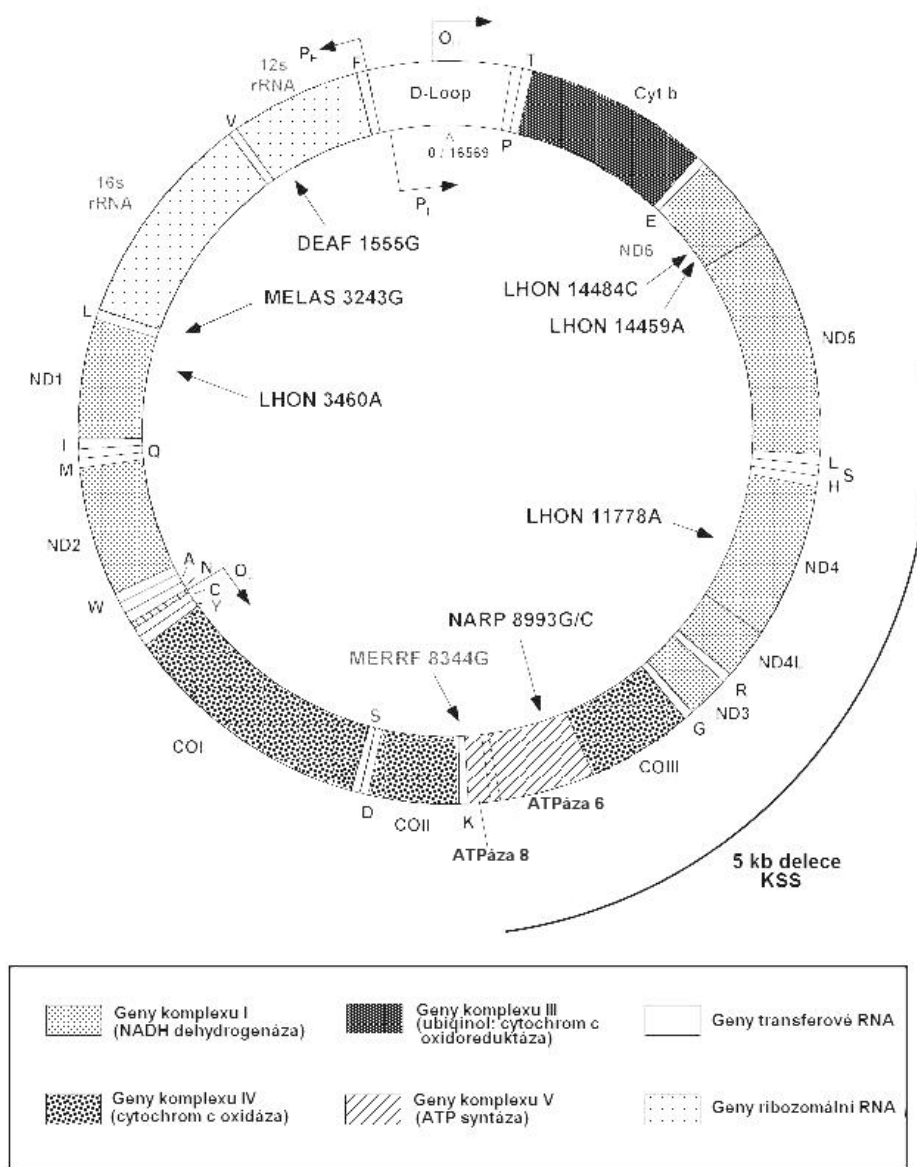
Tento syndrom způsobuje těžkou neurodegenerativní poruchu projevující se symetrickými lézemi na bazálních gangliích (Holt, et al., 1990).

Pearsonův syndrom

Tento syndrom se projevuje sideroplastickou anémií, neprospíváním a insuficiencí zevně sekretorické funkce pankreatu (Jacobs, et al., 2004).

Alpers - Huttenlocher syndrom

Klinicky se syndrom projevuje encefalopatií, myoklonickou epilepsií a hepatopatií až jaterním selháním (Uusimaa, et al., 2003).



Obr. 3.4: Lokalizace nejčastějších poruch mtDNA.

Upraveno podle <http://www.mitomap.org/mitomap/mitomapgenome.pdf>

3.3.2 Poruchy ncDNA

O defektech ncDNA, které postihují dýchací řetězec, víme zatím mnohem méně, než o defektech způsobených poruchou mtDNA. Jaderný genom nese informaci pro většinu mitochondriálních proteinů. Velká část podjednotek enzymů dýchacího řetězce

je kódována jadernou DNA. Potencionálně je zde 70 proteinů OXPHOS kódovaných ncDNA, které mohou být mutovány. Kromě těchto OXPHOS proteinů mohou být postiženy i proteiny související se sestavováním OXPHOS (viz Tab. 3.3). Mimo to je tu celý systém regulace jaderné genové exprese, jehož poškození může vést k nejrůznějším defektům na úrovni fenotypu. V současné době se k vyloučení role mtDNA v etiologii mitochondriálního onemocnění používá metoda transmitochondriálních cybridů, kdy je vytvořena hybridní buňka obsahující mtDNA pacienta a kontrolní jadernou DNA. Pokud po změně jaderné genetické výbavy dojde ke komplementaci defektu, je porucha jaderně vázaná.

Mitochondriální onemocnění, vzniklá defekty ncDNA, lze rozdělit do několika skupin podle typu postižených genů, případně druhu vzniklého defektu. Nacházíme zde zhruba čtyři hlavní skupiny defektů, poruchy podjednotek OXPHOS, sestavovacích proteinů, komponent replikačního aparátu a dalších mitochondriálních proteinů.

Do první skupiny patří mutace v genech pro podjednotky komplexů OXPHOS. Jako první byla popsána u pacienta s Leighovým syndromem, kde se jedná o dysfunkci komplexu II, která byla způsobena mutací v genu pro flavoprotein sukcinátdehydrogenázy (Bourgeron, et al., 1995). Mutace v komplexu I, projevující se u pacienta mentální retardací, hypotonií a degenerací bazálních ganglií, byla lokalizována do 18 kDa podjednotky (van den Heuvel, et al., 1998). Další mutaci nacházíme v komplexu I, kde postižený gen NDUFV1 kóduje 51 kDa protein. U pacienta byla diagnostikována leukodystrofie a myoklonální epilepsie (Schuelke, et al., 1999). V poslední době byly nalezeny patogenní mutace i v genech dalších podjednotek komplexu I. Nalezen byl i selektivní defekt mitochondriální ATP-syntázy, způsobený pozměněnou biosyntézou enzymu. Analýzy mtDNA a transmitochondriálních cybridů prokázaly jadernou lokalizaci defektu. Klinickým projevem je fatální neonatální laktázová acidóza, kardiomegalie a hepatomegalie. Úmrtí pacientů nastává krátce po narození (Houstek, et al., 1999).

Druhou skupinu tvoří mutace postihující geny sestavovacích proteinů. U řady pacientů byla nalezena mutace v genu SURF1, což je gen pro sestavovací protein, který je naprosto nezbytný pro správnou biosyntézu cytochrom *c* oxidázy (COX). Tento defekt byl poprvé popsán v roce 1998 u pacienta s Leighovým syndromem (Tiranti, et al., 1998, Zhu, et al., 1998) a od té doby bylo popsáno více než 30 různých mutací v SURF1 genu (Coenen, et al., 1999, Teraoka, et al., 1999). Dalším sestavovacím

proteinem pro COX je SCO2. Dosud byly popsány dvě patogenní mutace v tomto proteinu (Papadopoulou, et al., 1999).

Jinou oblastí mitochondriálních poruch je import proteinů. Protein DDP1 je nutný k fungování translokázy Tim23. Mutace genu DDP1 způsobuje Mohr-Tranebjaergův syndrom, progresivní neurodegenerativní onemocnění. Mutace genu znemožní správné složení proteinu, čímž je zeslabena vazba s Tim13 a zhoršena biogeneze komplexu Tim23 (Hofmann, et al., 2002).

Doposud byly popsány dva případy mitochondriálních encefalomyopatií způsobených nižší hladinou mtHsp 60, v jednom případě pravděpodobně díky nízké aktivitě translace genu Hsp 60 (Agsteribbe, et al., 1993, Briones, et al., 1997). To je v souladu s poznatky získanými u kvasinek, které ukázaly, že disrupce většiny genů pro proteiny importního aparátu jsou letální. Lze proto očekávat pouze relativně mírná postižení importního aparátu, rozhodně ne úplnou dysfunkci kteréhokoliv z klíčových komponent.

| Mutovaný gen | Biochemické následky | Genotyp | Dědičnost |
|-----------------------------|---|---------------------------------|---|
| Bodové mtDNA mutace | | | |
| strukturní OXPHOS geny | poruchy komplexů I, III, IV, V | LHON, DM, MM, onemocnění ATPázy | maternální |
| tRNA, rRNA geny | porucha syntézy mitoch. kódovaných proteinů | MERF, MELAS, MM, DM, MC | maternální |
| Přestavby mtDNA | | | |
| rozsáhlé delece a duplikace | dysfunkce více OXPHOS komplexů | KSS, Pearson, PEO | sporadická (jednoduché delece), autosomální (mnohočetné delece) |
| Delece mtDNA | | | |
| | nízká aktivita komplexů I, II, IV, V | tkáňově specifický | autosomální |

Tab. 3.2: Poruchy mtDNA.

MM - mitochondriální myopatie

MC - myopatie a kardiomyopatie

DM - diabetes mellitus

LHON - Leber's hereditary optic neuropathy

MERRF - myoclonic epilepsy and ragged red fibers

MELAS - mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis and stroke-like syndrome

KSS - Kearns-Sayre syndrome

PEO – Progressive external ophtalmoplegia

| Mutovaný gen | Biochemické poruchy | Genotyp | Dědičnost |
|------------------------------------|---------------------|---------------------------------------|-------------|
| <i>OXPHOS podjednotky</i> | | | |
| NDUFS8 podjednotka | porucha komplexu I | Leighův syndrom | mendelovská |
| 18 kDa podjednotka komplexu I | porucha komplexu I | nespecifický fatální genotyp | mendelovská |
| 51 kDa podjednotka komplexu I | porucha komplexu I | leukodystrofie, myoklonální epilepsie | mendelovská |
| <i>Sestavovací proteiny</i> | | | |
| mutace SURF1 | porucha komplexu IV | Leighův syndrom | mendelovská |
| mutace SCO2 | porucha komplexu IV | Leighův syndrom | mendelovská |
| mutace genu pro ATPázu (ATP12) | porucha komplexu V | kardiomyopatie, laktátová acidóza | mendelovská |

Tab. 3.3: Poruchy ncDNA.

3.4 EXPRESE MITOCHONDRIÁLNÍCH GENŮ ZA FYZIOLOGICKÝCH A PATOLOGICKÝCH PODMÍNEK

Mitochondriální biogeneze se účastní až 1000 genů a regulace exprese těchto genů je nezbytná. Za fyziologických či patologických podmínek se biogeneze mění v závislosti na potřebách buňky. Tyto děje představují vzájemnou vysoce organizovanou kooperaci mezi genomem mitochondriálním a jaderným. To souvisí i s mírou korelace exprese jaderných a mitochondriálních genů. Snaha objasnit kooperaci mezi genomy vedla k nalezení několika transkripčních faktorů, které regulují expresi mtDNA a také několika jaderných „OXPHOS“ genů. Neexistuje ale jeden typ faktoru, který by ovlivnil například všechny jaderné geny pro podjednotky komplexu I respiračního řetězce a ATPázy.

Defekty, způsobující omezení funkce či úplnou dysfunkci mitochondrií, mohou mít různé příčiny. Hledání příčin mitopatií a sledování reakcí buňky na dané změny je ale dost náročné. Jednou z možných příčin četných defektů může být až desetkrát vyšší mutační rychlost mtDNA. Předpokládá se, že pro vznik mutací je důležité poškození mtDNA především volnými kyslíkovými radikály (ROS – Reactive Oxygen Species). Ty jsou produkovány v těsné blízkosti mtDNA, v respiračním řetězci vnitřní mitochondriální membrány (Kalous and Drahota, 1996). Kyslíkové radikály poškozují i mitochondriální lipidy a proteiny a dochází tak k jejich dysfunkci. To vše má za následek sníženou funkci oxidační fosforylace a nízkou produkci ATP. Mutovaná nebo

jinak poškozená mtDNA snižuje mitochondriální biogenezi a vede až k permanentní dysfunkci organely (Shoffner and Wallace, 1995). Pro objasnění těchto stavů je stěžejní studium exprese většího množství genů za různých biologických podmínek. Výsledky takových studií jsou již k dispozici, např. studie exprese genů během ontogeneze, či studie regulačních mechanismů. Jaderné regulační faktory, např. NRF-1, hrají klíčovou roli v jaderně-mitochondriálních interakcích (Garesse and Vallejo, 2001, Scarpulla, 2002).

Obdobně přibývá studií, které se snaží zjistit změny v expresních profilech mitochondriálních genů u různých patologií. Defekty mohou být čistě mitochondriální, jako mutace mtDNA či selektivní defekty proteinů respiračního řetězce. Mezi další patologie, které ovlivňují funkci mitochondrií, patří např. nádorové procesy a metabolický syndrom. Reaven dokázal existenci metabolického syndromu v roce 1988. Reavenův syndrom (také popisován jako syndrom X) (Nisoli, et al., 2004) představuje poruchu v metabolismu tuků a způsobuje tak metabolické a kardiovaskulární komplikace. Další z možných patologií jsou nádorová onemocnění, jejichž příčinou může být porucha v signálních drahách.

Z výše uvedeného vyplývá, že technologie umožňující simultánní sledování exprese velkého množství genů je zcela klíčová a je dnes základem funkční genomiky. Umožňuje sledovat změny exprese genů, například v patologických stavech, kde lze předpokládat poruchu jednoho z genů v nukleární nebo mitochondriální DNA. Pro poznání patologických mechanismů je nezbytné zjistit i reakce ostatních genů. Funkční genomika a fenotypování představuje snahu přiřazovat funkci definovaným genům, ať již známým nebo neznámým, na základě indukce nebo represe jejich exprese v různých modelových situacích. Sledování genové exprese může probíhat pomocí northern blotu, QRT PCR, oligonukleotidových a DNA čipů (mikroarrays, makroarrays). O expresi genů vypovídají i další metody, např. SAGE (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SAGE/>).

Vedle vlastní regulace transkripce existuje celá řada následných posttranskripčních dějů, na kterých závisí stabilita, odbourávání a translační účinnost jednotlivých mRNA a to jak jaderně, tak mitochondriálně kódovaných.

3.5 STUDIUM GENOVÉ EXPRESE

Spektrum metodických postupů, které můžeme využívat k diagnostice genetických onemocnění, je poměrně široké a zahrnuje řadu metod analýzy DNA i RNA, jako jsou např. komplementační metody, hledání postižených genů, jejich sekvenování, studium změn v jejich expresi pomocí northern blotu, kvantitativní amplifikace cDNA či pomocí DNA čipů. Každý ze jmenovaných postupů má určitou výpovědní hodnotu, a proto je vhodné jejich vzájemné propojení, které nám poskytne komplexní informaci.

Pro měření exprese genů, tedy stanovení kolik dané mRNA vzniká, se stále více osvědčuje metoda RT PCR (RNA→cDNA), která je následovaná kvantifikací cDNA. Kvantifikace cDNA může být buď pomocí kvantitativního PCR, např. light cycler, nebo DNA čip. Zatímco v prvním případě lze s velkou přesností analyzovat expresi jednoho nebo několika genů, v druhém případě je možné analyzovat současně expresi stovek až tisíců genů i když s nižší citlivostí.

DNA čip se využívá při analýze profilů genové exprese a porovnání normálních „standartních“ expresních profilů s profily studovaných patologických stavů. Tento typ analýz může přinést informace o expresních profilech charakteristických pro určité typy onemocnění (Mootha, et al., 2003, Slonim, 2002). Hybridizační vzor, vzniklý nanesením značené cDNA na definované fixované sondy, poskytuje informace o genové expresi.

3.6 DNA ČIP

3.6.1 Základní charakteristika

Analýza expresních profilů poskytuje nový pohled na fyziologické a patofyziologické procesy ve zdraví a nemoci. Poprvé se technologie DNA čipů objevila v roce 1991 a první komerční čip byl vytvořen o tři roky později.

Existují dvě základní podoby DNA čipů, makročipy a mikročipy (DNA macroarrays, DNA microarrays). Sondy makročipů jsou tištěny na nylonovou membránu, na rozdíl od mikročipů, jejichž nosičem je zpravidla sklo. Dalším rozdílem je radioaktivní značení makročipů (^{32}P , ^{33}P). Výhodou makročipů je možnost jejich opakovaného použití, obvykle 3 – 4krát (Jiang, et al., 2001). Makročip umožňuje sledovat expresi řádově desítek genů, zatímco mikročipy, jimiž se budeme dále zabývat,

umožňují sledování exprese tisíců až desetitisíců genů současně. Mikročipy se používají pro kvantitativní určení míry genové exprese, genotypování, predikování funkce genů a sledování metabolických drah.

Základním principem čipů je mechanismus hybridizace. Hybridizace probíhá mezi dvěma systémy, jedním nepohyblivým (vlastní sondy), který je uchycen na pevném podkladu, a druhým pohyblivým, který představuje zkoumaný vzorek a je nanášen na povrch čipu. Transkripční aktivita genů může být srovnávána v nejrůznějších situacích, posuzována z nejrůznějších hledisek a na rozličných úrovních.

3.6.2 Konstrukční postupy

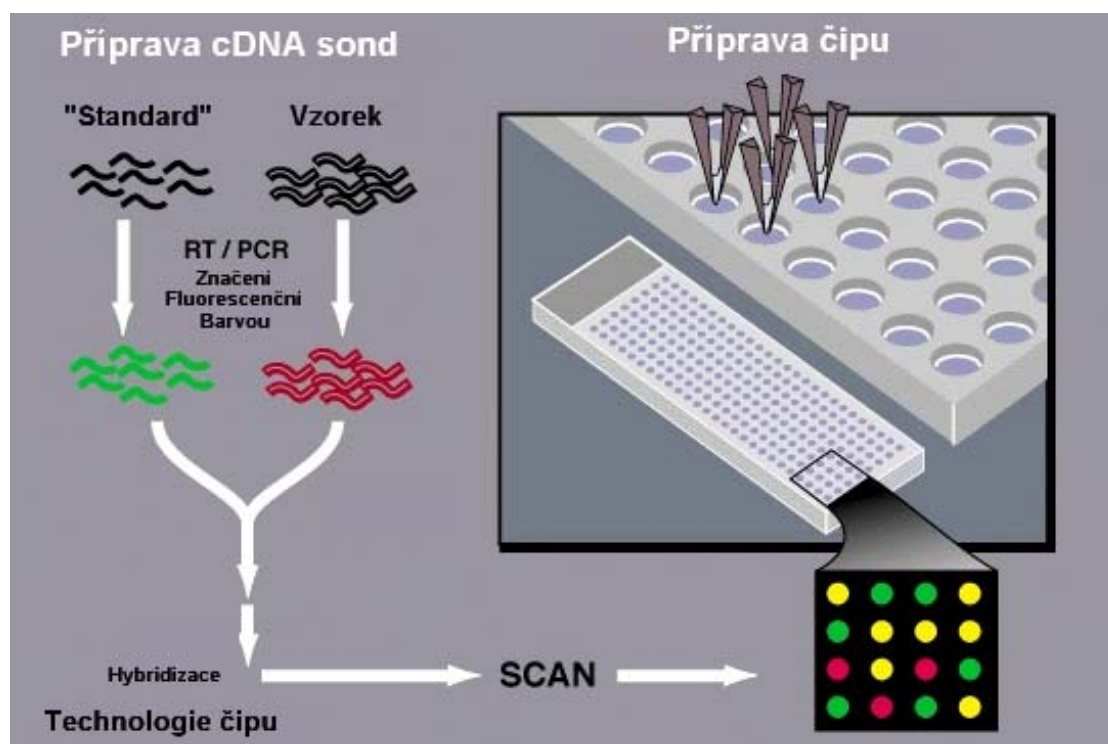
Standardně jsou používány dva hlavní typy DNA čipů (DNA microarrays). Prvním typem jsou komerční DNA čipy založené na *in-situ* syntéze 25 nukleotidových sond, produkované firmami Affymetrix (<http://www.affymetrix.com>) a Agilent (<http://www.agilent.com>). Tento typ umožňuje studium exprese řádově několika tisíc genů. Komerční čipy často neumožňují výběr genů, které chceme sledovat, ale pouze použití již připravených souborů. Dnes je k dispozici celá řada komerčních čipů, problémem je jejich velmi vysoká cena. Druhý typ DNA čipů je založen na robotickém rozmístění DNA sond na zvolený nosič. Tento typ je produkován jak komerčními firmami, tak jednotlivými laboratořemi. Často se objevují tzv. „home made“ čipy, které si laboratoř konstruuje sama a vybírá si pouze cílené skupiny genů.

Pro konstrukci DNA čipů mohou být využity různé povrchy jako je sklo, porcelán, mikrotitrační destička nebo membrána. Sondy, které jsou roboticky rozmístěny na zvolený povrch, mohou pocházet ze dvou různých zdrojů. Sondami mohou být buď PCR produkty, připravené z příslušných cDNA klonů, a nebo oligonukleotidy. Použití PCR produktů je poměrně náročné, neboť příprava klonů může být doprovázena častými kontaminacemi. Pokud zvolíme komerčně syntetizované oligonukleotidy, je nutné správné navržení délky a sekvencí oligonukleotidů. Sekvence oligonukleotidu musí splňovat požadovaná kritéria, jako je např. vzdálenost od 3' konce a teplota tání.

Při výběru genů pro čip je nezbytné mezi studované geny zařadit ještě několik kontrolních vzorků, jako jsou kotvy, negativní a pozitivní kontroly a vzorky obsahující pouze roztok pro tisk. Kontrolní geny umožní vytvořit určitý design experimentu, nezbytný pro normalizaci a zpracování dat. Fluorescenčně naznačené oligonukleotidy

tvoří kotvy, které svítí i v případě, že není na čip hybridizována žádná DNA. Negativní kontrolu představuje soubor exogenních genů, tedy genů nevyskytujících se ve studovaném organismu. Pozitivní kontrolou jsou „housekeeping“ geny, které mají stále stejnou expresi ve sledovaných materiálech (Eisenberg and Levanon, 2003).

Následnou fází přípravy čipu je strojové natištění připravených sond na zvolený povrch v nám známém uspořádání a jejich fixace. Sondy jsou nanášeny pomocí speciálně vyvinutých jehel. Jehly musí splňovat přísná kritéria, aby první i poslední tečka měla stejné rozměry, nedošlo k vynechání natisknutí tečky a aby jehla nabírala vždy co nejmenší množství zásobního roztoku a minimalizovaly se tak ztráty používané sondy.



Obr. 3.5: Schema práce s DNA čipem.

Upraveno podle http://www.accessexcellence.org/AB/GG/microarray_technology.gif

3.6.3 Využití čipu - hybridizace a analýza dat

Pro hybridizaci na čipu potřebujeme fluorescenčně značenou cDNA. Pro její získání jsou klíčové následující kroky: izolace intaktní RNA, dobře provedená reverzní transkripce a následné naznačení vzniklé cDNA fluorescenčními barvami (viz Obr. 3.5). Pro hybridizaci na DNA čip využíváme vždy dva vzorky, jeden kontrolní, pocházející

ze standardní RNA a jeden zkoumaný, který se standardem porovnááme. Pro označení těchto dvou vzorků použijeme dvě různé fluorescenční barvy, což následně umožní sledovat poměr fluorescence. Příprava vorků probíhá odděleně a po jejím dokončení jsou obě cDNA spojeny. Po přidání hybridizačního roztoku směs nanese na povrch čipu, kde probíhá za stálé teploty hybridizace k natištěným sondám. Hybridizační experiment je zakončen skenováním skla a uložením získaného obrazu ve formě TIFF souboru. Tato část představuje přibližně 40% experimentu.

Další a mnohem náročnější část spočívá ve vyhodnocení vzniklého hybridizačního vzoru pomocí počítačové techniky a v analýze získaných dat. Analyzují se vzájemné barevné kombinace fluorescenčních barev a jejich intenzita. Výsledkem je informace, zda k expresi daného genu dochází, popřípadě jak je jeho exprese silná.

4. MATERIÁL A METODY

4.1 MATERIÁL

4.1.1 Chemikálie

V přehledu nejsou zahrnuty nejběžnější používané analytický čistý chemikálie získané od dodavatelů Lachema, Sigma a Fluka.

| | |
|---|------------------------|
| acetylované BSA | Fluka, Švýcarsko |
| agaróza | Serva, Německo |
| aminoallyl-dUTP (aa-dUTP) | Molecular Probes, USA |
| betain | Sigma, USA |
| bovinní sérum albuminu (BSA) | Sigma, USA |
| citrát sodný | Fluka, Švýcarsko |
| dCTP-Cy3, dCTP-Cy5 | Enzo, NEN, USA |
| dihydrogenfosforečnan draselný (KH ₂ PO ₄) | Lachema, ČR |
| hydrogenfosforečnan sodný (Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O) | Lachema, ČR |
| dichlorethan (DCE) | Aldrich, USA |
| DMSO | Sigma, USA |
| DNáza I buffer | TaKaRa, Japonsko |
| DNáza I | TaKaRa, Japonsko |
| dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) | Larova, Německo |
| dodecylsulfát sodný (SDS) | Sigma, USA |
| dUTP | Larova, Německo |
| ethanol | Reidel-deHaën, Německo |
| ethylendiamintetraacetát sodný (EDTA) | Sigma, USA |
| ethidiumbromid | Sigma, USA |
| fenol | Sigma, USA |
| fetal calf serum | Sigma, USA |
| ficoll | Fluka, Švýcarsko |
| formamid, FA | Sigma, USA |
| gentamycin | Sigma, USA |
| glycerol | Sigma, USA |
| human Cot-1DNA (concentration and time) | Invitrogen, USA |
| hydrogenuhličitan sodný (NaHCO ₃) | Penta, USA |
| hydroxid sodný (NaOH) | Fluka, Švýcarsko |
| hydroxylamin | Sigma, USA |
| chlorid draselný (KCl) | Lachema, ČR |
| chlorid hořečnatý (MgCl ₂) | Promega, USA |

| | |
|---|-------------------------------|
| chlorid sodný (NaCl) | Fluka, Švýcarsko, Lachema, ČR |
| chloroform | Sigma, USA |
| ImProm-II ^(tm) | Promega, USA |
| izoamylalkohol | Sigma, USA |
| izopropanol | Sigma, USA |
| N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethan sulfonová kyselina (HEPES) | Sigma, USA |
| N-methylimidazol | Aldrich, USA |
| N-methylpyrolidinon | Aldrich, USA |
| octan sodný | Sigma, USA |
| oligo dT ₁₈ .deg (primer) | Generi Biotech, ČR |
| peroxid vodíku (H ₂ O ₂) | Lachema, ČR |
| poly-L-lyzin (0,1% roztok) | Sigma, USA |
| polyvinylpyrrolidon | Fluka, Švýcarsko |
| RNAlater | Ambion, USA |
| succinimidyl ester Alexa fluor dyes (546, 647) | Molecular Probes, USA |
| sukcinanhydrid | Sigma, USA |
| SuperScript II | Invitrogen, USA |
| ToRNAzol | GeneAge Technologies, ČR |
| TRIzol | GibcoBRL, UK |
| tRNA kvasinková | Sigma, USA |
| trypsin | Sigma, USA |
| ULS reakční směs | Molecular Probes, USA |

4.1.2 Roztoky

Denhardův roztok

2% ficoll

2% polyvinylpyrrolidon

2% acetylovaný BSA

TBE pufr

0,89 mM Tris

0,89 mM kyselina boritá

0,02 mM EDTA

TE pufr

10 mM Tris HCl

1 mM EDTA

PBS pufr

- 140 mM NaCl
- 5,4 mM KCl
- 8 mM Na₂HPO₄·12 H₂O,
- 1,4 mM KH₂PO₂, pH 7,2

SSC

- 3M NaCl
- 0,3M citrát sodný

4.1.3 Kity

Microcon YM – 30 Centrifugal Filter Unit, MILLIPORE, USA

QIAGEN RNeasy (mini, midi)

QIAGEN QIAquick™ PCR Purification Kit

The universal Linkage System (ULS™), Molecular Probes, USA

4.1.4 Biologický materiál

Vzhledem k vysokým nárokům na množství RNA byl k práci použit takový biologický materiál, který lze získat v poměrně velkém množství.

- kontrolní fibroblasty (F1 - F3)
- placenta (P1 - P3)
- buněčná line 293 (L1)
- směs buněčných linií - HeLa G (adenokarcinom děložního čípku)
 - ECV 304 (endoteliální buňky)
 - 293 (ledvinné embryonální buňky)
 - U 937 (histiocyty)
 - JURKAT (lymphom)
 - A 301 (lidské T – lymfocyty)

4.1.5 Přístroje

Autokláv: SANYO LaboAutoclave 2420

Centrifugy: Laboratory Centrifuges, Sigma, USA; Hettlich Zentrifugen, UNIVERSAL 16R

Elektroforézy: Electrophoresis Power Suply – Model 250EX, Gibco BRL, UK
Fotografický přístroj: Olympus C - 2000 Z
Laminární box: Lamin Air Holten
Lednice a mrazáky: Bio – Freezer, Forma Scientific; Ultra Low Temperature Freezer,
New Brunswick Scientific
Pipety: Gilson, Francie
Robotické zařízení pro tisk: GeneSurfer, GeneAge Technologies, ČR
Skener: GTLS IV, Genomic Solutions, USA
Termostaty: Microwave oven RANGE KOR – 61A5, Daewoo
Třepačka: Orbital shaker, MyLabTM, BioSan
Váhy: OHAUS ScoutTM
Vortex: Vortex-Genie 2
Výrobník ledu: BREMA

4.1.6 Počítačové vybavení a programy pro čipové technologie

Apache HTTP Server Project:

<http://httpd.apache.org>

PHP (Hypertext preprocessor):

<http://www.php.net>

MySQL

<http://mysql.com>

OligoPicker:

<http://pga.mgh.harvard.edu/oligopicker/>

*R- project (The R Project for statistical computing):

<http://www.r-project.org/>

*Spot (Software for Analysis of Microarray Images):

<http://experimental.act.cmis.csiro.au/Spot/index.php>

(* použito diplomantem)

4.1.7 Databáze

*BASE (BioArray Software Environment) (Saal, et al., 2002):

<http://lethe.img.cas.cz/>; <http://base.thep.lu.se/>

*Blast (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul, et al., 1990):

<http://www.ncbi.nih.gov/genome/seq/HsBlast.html>

*David (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) (Dennis, et al., 2003):

<http://david.niaid.nih.gov/david/>

Ensembl (Hubbard, et al., 2002):

<http://www.ensembl.org>

*GeneOntology (Ashburner and Lewis, 2002):

<http://www.geneontology.org/>

*LocusLink (Maglott, et al., 2000):

<http://www.ncbi.nih.gov/LocusLink/>

Mitochondrial Proteome 2 (Andreoli, et al., 2004):

<http://ihg.gsf.de/mitop2/start.jsp>

Mitomap (Kogelnik, et al., 1996):

<http://www.mitomap.org/>

MitoProteome Database (Cotter, et al., 2004):

<http://www.mitoproteome.org/html/database.html>

*NCBI (National Center for Biotechnology Information) (Woodsmall and Benson, 1993):

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) (Velculescu, et al., 1995):

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SAGE>

(* použito diplomantem)

4.2 METODY

4.2.1 Příprava nosičů

K přípravě poly-L-lyzinových skel byl použit 10 M roztok NaOH. Skla byla umístěna do stojánku, opláchnuta vodou, ponořena do připraveného roztoku a umístěna na 6 hodin na třepačku. Následně byla skla 30 sekund oplachována destilovanou vodou a ponořena do vaničky s MilliQ. Zde byla skla ponechána přes noc, aby se roztok hydroxidu důkladně odstranil.

Z vodní lázně byla skla vyjmuta, osušena, ponořena do roztoku poly-L-lyzinu, který byl připraven spojením 285 ml MilliQ, 35 ml PBS (bez Ca^{2+} a Mg^{2+}) a 30 ml 0,1% w/v poly-L-lyzinu.

V poly-L-lyzinu byla skla ponechána na třepačce 45 minut, poté vyndána, krátce osušena a ponořena do MilliQ. Následovalo osušení centrifugací při 200 g 2 minuty. Na závěr byla skla sušena 2 hodiny při teplotě 50°C. Skla byla skladována minimálně 14 dní, než byla použita k tisku (Bowtel, 2003).

4.2.2 Navržení sekvencí a příprava oligonukleotidů

První set obsahující 192 genů byl navržen ručně pomocí programu Oligo6 s kritérii minimální vzdálenosti od 3' konce, teplotou tání kolem 80 - 90°C a s eliminací tvorby sekundárních struktur. Specifita oligonukleotidů byla testována proti lidskému genomu v databázi NCBI (<http://www.ncbi.nih.gov/genome/seq/HsBlast.html>). Oligonukleotidy byly připraveny komerčně (Generi Biotech). Rozšířený set, obsahující již 1670 genů, byl navržen automaticky pomocí programu OligoPicker (<http://pga.mgh.harvard.edu/oligopicker/>). Následovala ruční kontrola, aby se zachytily všechny sestřihové varianty a vyloučily pseudogeny. Oligonukleotidy byly syntetizovány komerčně (Illumina).

4.2.3 Tisk, fixace sond, blokování pozadí

Tisk byl prováděn robotickým zařízením GeneSurfer (GeneAge Technologies), které se skládá z několika částí. Zdrojem sond je šest mikrotitračních destiček (jedna po 96 jamkách), odkud jsou sondy následně tisknuty na skla. Skla jsou upevněna na čtyři palety, kde každá nese patnáct skel. Maximální počet skel je šedesát. K dalšímu vybavení patří sonikační stanice pro oplach, stanice pro sušení jehel a pohyblivé rameno nesoucí jehly pro tisk.

Povrchem pro tisk byla klasická podložní skla (76x26 mm). Sondy byly před tiskem rozpuštěny v roztoku 3% DMSO a 1,5 M betainu a po natištění byly zafixovány pomocí UV crosslingu - 2x 400 mJ/cm² a zapečeny 2 hodiny při 80°C. Na závěr byla skla důkladně dvakrát omyta v 0,1 % SDS při 42°C a dvakrát v MilliQ. Lázeň byla umístěna na třepačku vždy na 1 minutu.

Po imobilizaci byly zbylé aktivní amino- skupiny blokovány sukcinanhydridem v přítomnosti N-metylimidazolu (Diehl, et al., 2001), aby se zamezilo vzniku nespecifických vazeb během hybridizace. Následovalo opláchnutí roztokem čistého dichlorethanu a denaturace 2 minuty horkou vodou. Poslední opláchnutí bylo provedeno 96% ethanolem.

4.2.4 Izolace RNA

Samotné izolaci RNA z fibroblastů předcházela jejich kultivace. Kožní fibroblasty byly pěstovány v médiu D-MEM (Dulbecco`s modified Eagle`s medium), které obsahovalo 10% fetální hovězí sérum, gentamycin 2 mg/100 ml; 20 mM HEPES pH 7,5; 0,2% NaHCO₃ při teplotě 37°C a 5% CO₂ ve vzduchu. Buňky byly sklizeny roztokem 0,05% trypsinu a 0,02% EDTA v PBS a následně promývány v PBS (NaCl 140 mM; KCl 5,4 mM; Na₂HPO₄.12 H₂O 8 mM; KH₂PO₂ 1,4 mM, pH 7,2).

Při izolaci RNA byl k peletě buněk (50 – 100 mg mokré váhy buněk) přidán 1 ml ToRNAzolu a vzorek byl důkladně zhomogenizován. Homogenát byl ponechán 5 minut při laboratorní teplotě. V případě izolace z tkání byl vzorek 10 minut centrifugován při 12 000 g. Poté bylo ke vzorku přidáno 0,2 ml chloroformu (1/5 objemu ToRNAzolu), důkladně zvortexováno a ponecháno 2 – 3 minuty při laboratorní teplotě. Další centrifugace probíhala 15 minut při 12 000 g a teplotě 4 °C. Vodní fáze byla přenesena do nové zkumavky. K vodní fázi bylo přidáno 0,5 ml izopropanolu, což odpovídá polovičnímu množství ToRNAzolu a ponecháno 10 minut při laboratorní teplotě, poté 15 minut centrifugováno při 12 000 g, 4 °C. Následně byl odsát supernatant a k peletě RNA byl přidán 1 ml 75% ethanolu a po důkladném zvortexování probíhala centrifugace při 9 000 g 5 minut, 4 °C. Tyto kroky byly opakovány 3x pro omytí RNA. Po posledním omytí byl (opatrně) odsát ethanol a vzorek byl vysušen. Není vhodné RNA vysušit úplně, snižuje to její rozpustnost. Na závěr byla RNA rozpouštěna v 30 µl MilliQ. Protokol upraven podle (Chomczynski and Sacchi, 1987) Kvalita a kvantita RNA byla kontrolována spektrofotometricky a elektroforeticky na agarózovém gelu.

4.2.5 Značení cDNA

Přímé značení:

Toto značení spočívá v inkorporaci modifikovaných oligonukleotidů vázajících fluorescenční barvu v průběhu reverzní transkripce (Cy3-dCTP, Cy5-dCTP; NEN).

Reakční směs o objemu 14 μ l obsahovala 40 - 50 μ g totální RNA, 2 μ g oligo dT₁₈-deg primeru. Směs byla zahřáta na 70°C po dobu 10 minut a následně ochlazena 2 minuty na ledu. Dále bylo do reakce přidáno 14 μ l Mastermixu, který obsahoval 1x FSB (First strand buffer); 3 mM MgCl₂; 0,66 mM dATP, dGTP, dTTP a 0,33 mM dCTP; 0,066 mM dCTP-Cy5 nebo dCTP-Cy3.

Reakce byla inkubována 2 minuty při 65°C a 3 minuty při 42°C. Poté byly přidány 2 μ l reverzní transkriptázy ImProm-IITM. Po uplynutí 60 minut inkubace při 42°C byl přidán znovu 1 μ l enzymu. Reakce probíhala dalších 60 minut. Následujícím krokem byla degradace zbylé RNA, která spočívala v přidání 1 μ l 0,5 M EDTA, 4 μ l 1 M NaOH a 5 μ l MilliQ. Inkubace trvala 15 minut za teploty 65°C. Celá reakce byla ukončena přidáním 40 μ l 1 M HEPES. Přechištění cDNA bylo provedeno za použití kitu QIAGEN QIAquickTM PCR Purification Kit (Qiagen).

Čistá cDNA byla zakoncentrována na kolonkách Microcon YM-30. Získaných 60 μ l cDNA bylo důkladně promícháno pipetováním s 390 μ l MilliQ, nanášeno na kolonku a centrifugováno při 14 000 g 8 minut. Membrána byla omyta 450 μ l MilliQ a centrifugována při 14 000 g 8 minut. Pro druhé omytí byla použita prehybridizační směs 400 μ l MilliQ, 20 μ g lidské Cot-1, 20 μ g polyA a 20 μ g kvasinkové RNA. Po nanášení na kolonku byla směs centrifugována při 14 000 g 8 minut. Následně byla celá kolonka přenesena do nové zkumavky a obrácena dnem vzhůru. Takto byla 5 minut centrifugována při 3 000 g.

Nepřímé značení:

1) Neenzymatická metoda The Universal Linkage System (ULSTM) je založená na komplexu barvy s platinou vázanou na N7 guaninu (ULISIS, Molecular Probes).

Reakční směs o objemu 15 μ l obsahovala 40-50 μ g totální RNA, 2 μ g oligo dT₁₈-deg primeru. Směs byla zahřáta na 70°C po dobu 10 minut a následně ochlazena 2 minuty na ledu. Dále bylo do reakce přidáno 13 μ l Mastermixu, který obsahoval 1x FSB (First strand buffer); 3 mM MgCl₂; 0,5 mM dNTPs.

Reakce byla inkubována 2 minuty při 65°C a 3 minuty při 42°C. Pak byly přidány 2 µl reverzní transkriptázy ImProm-IITM. Po uplynutí 60 minut inkubace při 42°C byl přidán znovu 1 µl enzymu. Reakce probíhala dalších 60 minut. Následujícím krokem byla degradace zbylé RNA, která spočívala v přidání 1 µl 0,5 M EDTA, 4 µl 1 M NaOH a 5 µl MilliQ. Inkubace trvala 15 minut za teploty 65°C. Celá reakce byla ukončena přidáním 40 µl 1 M HEPES. K přečištění cDNA byl použit kit QIAquick (Qiagen).

Čistá cDNA byla koncentrována na kolonkách Microcon YM-30. Získaných 60 µl cDNA bylo důkladně promícháno jemným pipetováním s 390 µl MilliQ, nanášeno na kolonku a 8 minut centrifugováno při 14 000 g. Membrána byla omyta 450 µl MilliQ, centrifugována 5 minut při 14 000 g. Tento krok byl ještě jednou zopakován. Následně byla celá kolonka přenesena do nové zkumavky a obrácena dnem vzhůru. Takto byla 5 minut centrifugována při 3 000 g.

Připravená cDNA byla denaturována zahřátím na teplotu 95°C po dobu 5 minut. Po přidání „ULS reakční směsi“ byl vzorek inkubován při 80°C 15 minut (ULYSIS Nucleic Acid Labeling Kits, Molecular Probes). Následovalo odstranění zbytků „ULS reakční směsi“, ke kterému byl použit kit QIAquick (Qiagen).

Čistá cDNA byla zakoncentrována na kolonkách Microcon YM-30. Získaná cDNA bylo důkladně promíchána pipetováním s 400 µl MilliQ, nanášena na kolonku a centrifugována při 14 000g 8 minut. Membrána byla omyta 450 µl MilliQ a centrifugována při 14 000 g 8 minut. Pro druhé omytí byla použita prehybridizační směs 400 µl MilliQ, 20 µg lidské Cot-1, 20 µg polyA a 20 µg kvasinkové RNA. Po nanesení na kolonku byla směs centrifugována při 14 000 g 8 minut. Následně byla celá kolonka přenesena do nové zkumavky a obrácena dnem vzhůru. Takto byla 5 minut centrifugována při 3 000 g.

2) Druhou použitou metodou byla inkorporace aminoallyl-modifikovaného dUTP při RT a smíchání modifikované cDNA s rozpuštěnou barvou (Alexa dyes, Molecular Probes).

Reakční směs o objemu 15 µl obsahovala 40-50 µg totální RNA, 2 µg oligo dT₁₈-deg primeru. Směs byla zahřáta na 70°C po dobu 10 minut a následně ochlazená 2 minuty na ledu. Dále bylo do reakce přidáno 13 µl Mastermixu, který obsahoval

1x FSB (First strand buffer); 3 mM MgCl₂; 0,5 mM dATP, dCTP, dGTP; 0,15 mM dTTP a 0,3 mM aa-dUTP.

Reakce probíhala 2 minuty při 65°C a 3 minuty při 42°C a poté byly přidány 2 µl reverzní transkriptázy ImProm-IITM. Po uplynutí 60 minut inkubace při 42°C byl přidán znovu 1 µl enzymu. Reakce probíhala dalších 60 minut. Následujícím krokem byla degradace zbylé RNA, která spočívala v přidání 1 µl 0,5 M EDTA, 4 µl 1 M NaOH a 5 µl MilliQ. Inkubace trvala 15 minut za teploty 65°C. Celá reakce byla ukončena přidáním 40 µl 1 M HEPES. K přečištění cDNA byl použit kit QIAquick (Qiagen).

Čistá cDNA byla koncentrována na kolonkách Microcon YM-30. Získaných 60 µl cDNA bylo důkladně promícháno jemným pipetováním s 390 µl MilliQ, nanášeno na kolonku a centrifugováno při 14 000 g 8 minut. Membrána byla omyta 450 µl MilliQ a centrifugována při 14 000 g 5 minut. Tento krok byl ještě jednou zopakován. Následně byla celá kolonka přenesena do nové zkumavky, obrácena dnem vzhůru a centrifugována při 3 000 g 5 minut.

Přečištěná cDNA (8 µl) byla inkubována 30 minut při pokojové teplotě s 3 µl 2,5% roztoku NaHCO₃. Dále byly ke vzorku přidány 120 µg fluorescenční barvy Alexa 546 nebo Alexa 647 (Molecular Probes). Směs byla ponechána při pokojové teplotě ve tmě po dobu 90 minut a každých 30 minut byla promíchána. Reakce byla zastavena přidáním 4,5 µl 4 M hydroxylaminu, se kterým byla směs ve tmě při pokojové teplotě inkubována 15 minut.

K přečištění byly použity kolonky Microcon YM-30. Naznačená cDNA byla spojena s 400 µl MilliQ a promíchána jemným pipetováním. Směs byla nanášena na kolonku a centrifugována při 14 000 g 8 minut. Membrána byla omyta 450 µl MilliQ a centrifugována při 14 000 g 8 minut. Pro druhé omytí byla použita prehybridizační směs 400 µl MilliQ, 20 µg lidské Cot-1, 20 µg polyA a 20 µg kvasinkové RNA. Po nanášení na kolonku byla směs centrifugována při 14 000 g 8 minut. Následně byla celá kolonka přenesena do nové zkumavky a obrácena dnem vzhůru. Takto byla 5 minut centrifugována při 3 000 g. Kvalita značené cDNA byla kontrolována elektroforeticky na agarózovém gelu.

4.2.6 Hybridizace

Hybridizace vzorků byla prováděna podle standartních postupů pod krycím mikroskopickým sklem v 50% formamidu 16 hodin při 42°C (Bowtel, 2003).

Odděleně připravené a naznačené vzorky byly spojeny a smíchány s hybridizačním roztokem, který obsahoval 50% FA; 5x SSC; 0,1% SDS a 5x Denhard.

Takto připravený hybridizační roztok byl spojen se vzorky a ponechán 3 minuty na horké lázni, aby došlo k rozvolnění struktur cDNA. Poté byl vzorek nanesen na povrch skla s natištěnými sondami a přikryt klasickým krycím sklem. Připravený systém byl uložen do komůrky s roztokem 3x SSC, který zabezpečil konstantní vlhkost. Statická hybridizace probíhala 16 hodin v termostatu při teplotě 42°C.

Po 16 hodinách byla hybridizace ukončena a bylo provedeno postupné omytí skel čtyřmi různými omývacími roztoky.

První roztok (0,5x SSC + 0,01% SDS) byl vytemperován na hybridizační teplotu a skla v něm byla třepána 1 minutu.

Ve druhém roztoku (0,5x SSC) pokojové teploty byla skla třepána 3 minuty.

Třetím roztokem (0,1x SSC) pokojové teploty byla skla omývána třikrát. Jednou byla skla třepána 3 minuty a dvakrát pouze 1 minutu.

Do čtvrtého roztoku (0,01x SSC) pokojové teploty byla skla jen přenesena a následně osušena centrifugací 1,5 minuty při 100 g.

4.2.7 Získání a analýza dat – statistika

Suchá skla byla skenována na dostupném laserovém skeneru GTLS IV (Genomic Solutions), který má kapacitu 24 skel. Skenování probíhalo přes dva filtry při vlnových délkách 565 nm Cy3 a 695 nm Cy5. Přístroj je ovládán pomocí softwaru GeneTAC GT LS (Genomic Solution). Získaný obraz (scan image) byl uložen ve formě 16-bitového TIFF souboru, který je kompatibilní s volně dostupnými nebo komerčními vyhodnocovacími programy. Technologie čipů poskytuje „zdrojová data“ ve formě obrazů, které je nutné následně analyzovat.

Analýza obrazu spočívala v převedení grafického formátu do datového souboru. Tento krok byl prováděn softwarovým příložením mřížky na obraz. Zvolen byl takový typ mřížky, jejíž kroužky se tvarově přizpůsobily každé sledované tečce. Identifikace spotů a extrakce kvantitativních dat byla provedena programem „Spot: Software for Analysis of Microarray Images“ (<http://experimental.act.cmis.csiro.au/Spot/index.php>).

Program lze implementovat do statistického programu R-project (<http://www.r-project.org/>). Software přiřadí každému bodu jeho intenzitu a pomocí několika algoritmů se získají průměrné relativní intenzity fluorescence v obou kanálech.

Po získání intenzit jednotlivých fluoroforů následovala normalizace, ke které byl použit R-project. Normalizace byla prováděna pomocí LOWES funkce (Yang, et al., 2002). K filtrování dat jsme použili kritérium „signál k šumu“, neboli signal/noise (s/n). Signal/noise udává, kolikrát je získaný signál silnější oproti pozadí. Hodnotu s/n jsme vypočítali podle vzorce:

$$s/n = \frac{\text{Medián signálu} - \text{Medián pozadí}}{\text{Směrodatná odchylka pozadí}}$$

4.2.8 Uchování dat - BioArray Software Environment (BASE)

K uchování a zpracování dat byla použita databáze BASE (BioArray Software Environment) (<http://lethe.img.cas.cz>; <http://base.thep.lu.se/>) (Saal, et al., 2002), která je na pracovišti využívána i pro další čipové projekty a experimenty.

BASE poskytuje propojenou síť pro ukládání a analýzu dat získaných čipovým experimentem. Systém byl vyvinut v programu GNU/Linux a jazyce PHP (<http://www.php.net>). Data jsou uložena v relační databázi MySQL (<http://mysql.com>) a komunikaci s uživatelem zajišťuje Apache webserver (<http://httpd.apache.org>). BASE je navržena tak, aby byla snadno instalovatelná v jakékoliv laboratoři a současně byla kompatibilní s různými datovými formáty a s mnoha typy experimentů. Analýza dat je zde uspořádaná hierarchicky a poskytuje široké spektrum vizualizace dat, jako je např. Scatterplot, MA plot, histogramy nebo data ve formě 3D. Nepostradatelnou součástí analýzy čipových dat je bioinformatika. Databáze BASE splňuje všechny parametry požadované protokolem MIAME (Minimal Information About a Microarray Experiment) (Brazma, et al., 2001) http://www.mged.org/Workgroups/MIAME/miame_software.html).

5. VÝSLEDKY

Zavedení nové technologie a konstrukce mitochondriálního čipu představovalo soubor na sebe navazujících dílčích kroků, z nichž každý musel být optimalizován. Jednotlivé metody konstrukce čipu a jejich postupné úpravy jsou popsány chronologicky.

5.1 OPTIMALIZACE POUŽITÝCH METOD

5.1.1 Výběr genů

Geny byly vybírány z dostupných databází (viz kapitola 4.1.7). První výběr genů byl proveden z databází zaměřených na mitochondriální geny <http://www.mitomap.org/>. Následně jsme využili databáze obecné <http://www.ncbi.nih.gov/LocusLink/>, <http://www.ensembl.org>. Seznamy genů získané z jednotlivých databází byly porovnány, vzájemně doplněny a zkontrolovány pomocí „Gene Ontology“ <http://www.geneontology.org/>. Získali jsme tak soubor cca 1000 doposud známých proteinů s mitochondriální funkcí kódovaných ncDNA nebo mtDNA.

Pro vytvoření prvního čipu byly vybrány geny kódované mitochondriální DNA. Dále byly vybrány jaderně kódované geny, které jsou nezbytné ke správné funkci oxidačně fosforylačního systému mitochondrie, a budou tak s vysokou pravděpodobností silně exprimovány. Mezi ně patří geny pro strukturní a sestavovací proteiny a dále geny pro transkripční a regulační faktory, nezbytné ke koordinaci obou genomů. První soubor tvořilo 192 genů a 64 kontrol.

Po odzkoušení prvního čipu jsme přistoupili k jeho rozšíření nejenom o geny se známou funkcí, ale i o geny, které kódují proteiny s pravděpodobnou mitochondriální lokalizací. Nový soubor byl rozšířen o 800 „mito“ genů a celkově obsahoval 992 genů. Protože spolupracujeme i s dalšími pracovními skupinami, připojili jsme k souboru mitochondriálních genů i soubor onkogenů a apoptotických genů. Poslední podoba setu představuje 1670 genů, z toho 48 housekeeping genů.

5.1.2 Navržení sekvencí a příprava oligonukleotidů

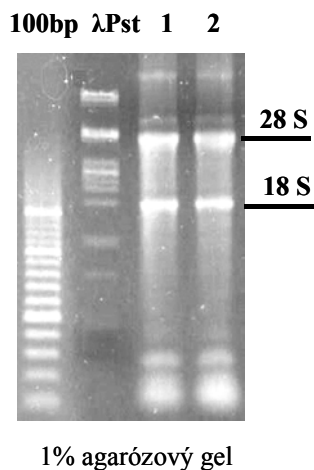
Prvním krokem pro konstrukci čipu byla volba vhodných sond, které budou na povrch skla tištěny. Nabízejí se dvě varianty. První je tisk PCR produktů, tedy celé cDNA a druhá tisk oligonukleotidů. Nejprve jsme vyzkoušeli přípravu PCR produktů.

Během práce se objevila řada problémů, jako časté kontaminace a nepřesnost klonů. Proto jsme přistoupili k druhé variantě, která spočívala ve využití námi navržených a komerčně nasyntetizovaných oligonukleotidů. První set, obsahující 192 oligonukleotidů, byl navržen ručně pomocí programu Oligo6. Tento způsob návrhu je možný jen u malého počtu genů. Proto byl druhý, rozšířený set, tvořený 1670 geny, navržen automaticky pomocí programu OligoPicker (<http://pga.mgh.harvard.edu/oligopicker/>). Po automatickém návrhu byla provedena kontrola, při níž jsme se snažili zajistit specifitu navržených sekvencí. Náročné bylo zejména návrhu unikátních sekvencí v rámci rodin genů či sestřihových variant.

5.1.3 Izolace RNA

K izolaci RNA jsme vyzkoušeli čtyři postupy. Ukázalo se, že metoda Chomczynského dává dobré výsledky, ale je časově velmi náročná. Kity Qiagen RNeasy (mini, midi) umožňují sice připravit RNA vysoké kvality, ale s velkými ztrátami.

Metoda izolace RNA využívající lyzační roztok TRIzol (Gibco BRL) poskytuje kvalitní RNA, ale roztok je vzhledem k velké spotřebě příliš drahý. Proto jsme tuto metodu vyzkoušeli s cenově dostupnějším lyzačním roztokem ToRNAzol (GeneAge Technologies) a provedli srovnávací analýzu izolace RNA s použitím obou roztoků (Obr. 5.1). Izolace lyzačním roztokem ToRNAzol je 10x levnější než izolace pomocí TRIzolu. Analýza potvrdila kvalitativní i kvantitativní shodu připravené RNA. Z 1 mg tkáně jsme získali 1 µg RNA. Pro naše účely, kdy je potřeba získat velké výtěžky vysoce kvalitní RNA, je vhodnější využití izolace pomocí lyzačního roztoku ToRNAzol.

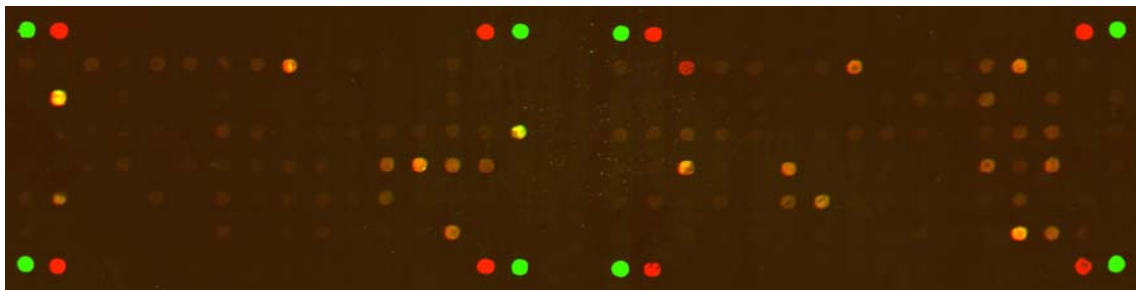


Obr. 5.1: RNA izolovaná z kontrolních fibroblastů pomocí ToRNAzolu a TRIzolu. V dráze 1 je RNA izolovaná ToRNAzolem a v dráze 2 TRIzolem. V drahách jsou vždy naneseny 2 µg totální RNA rozpuštěné v MilliQ.

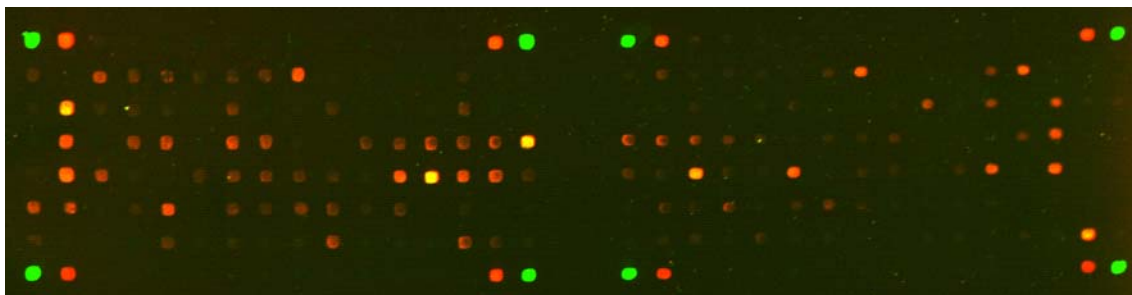
5.1.4 Značení cDNA

Vyzkoušeli jsme celkem tři způsoby značení cDNA, jeden přímý a dva nepřímé. U přímého značení dochází při RT k inkorporaci nukleotidů s navázanou fluorescenční značkou. Navázaná značka výrazně zvětšuje velikost nukleotidu. Reverzní transkriptáza proto přednostně zařazuje nukleotidy menší, tedy neznačené. Používání tohoto značení bylo drahé a nedávalo uspokojivé výsledky (Obr. 5.2), proto jsme zkoušeli další způsoby značení.

Nepřímé značení pomocí ULYSIS (viz kapitola 4.2.5) se ukázalo vysoce účinné, ale velmi drahé (Obr. 5.3). Pomocí značení Ulysis jsme získali kvalitnější signál a mohlo být detegováno více genů, které splňovaly kritérium $s/n > 3$.



Obr. 5.2: Přímé značení pomocí dCTP-Cy3, dCTP-Cy5.



Obr. 5.3: Nepřímé značení pomocí Ulysis.

K druhému nepřímému způsobu značení jsme použili fluorescenční barvy Alexa. Při reverzní transkripci jsou využívány modifikované nukleotidy, které reverzní transkriptáza zařazuje bez problémů. Následuje značení, při kterém se fluorescenční barva váže na funkční skupinu aminoallyl modifikovaného dUTP. Tento způsob se jeví jako dobrý, přestože nedosahuje takových kvalit jako „ULYSIS“. Jeho výhodou je podstatně nižší cena, a proto jsme zvolili kompromis mezi cenou a kvalitou a používáme fluorescenční barvy Alexa.

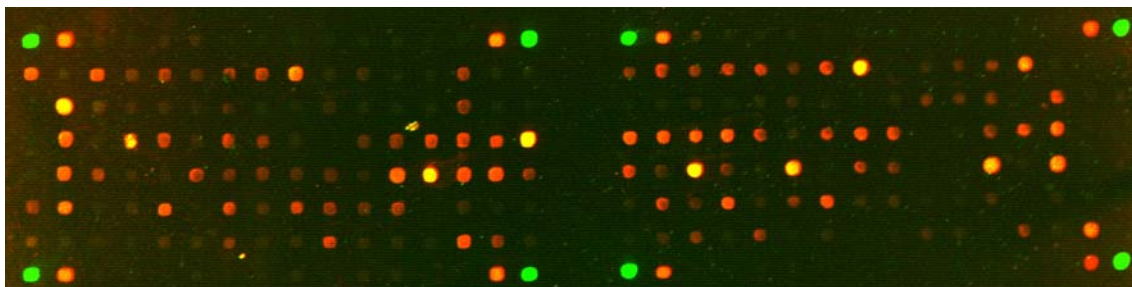
5.1.5 Hybridizace

Zkoušeli jsme dynamickou a statickou hybridizaci značené cDNA se sondami na povrchu čipu. Při dynamické hybridizaci bylo sklo upevněno k rotujícímu válci a roztok byl míchán přidávanými jemnými skleněnými kuličkami, popřípadě bublinou v roztoku. Dvě podložní skla byla spojena pomocí adhezivního materiálu tak, aby komůrka dobře těsnila. V místě spojení skel bylo výrazně zvýšené pozadí, které se nedařilo omytím odstranit. Proto jsme přistoupili ke statické hybridizaci, kdy spolu podložní a krycí sklo drželo na základě kapilárního efektu a nevznikaly potíže s lokálně zvýšeným pozadím. Aby nedocházelo k vysychání vzorku, umístili jsme skla do komůrky s 3% SSC. Jiné výrazné rozdíly mezi oběma typy hybridizace jsme nenalezli. V současné době proto používáme hybridizaci statickou.

5.2 MITO-ČIP VERZE 1

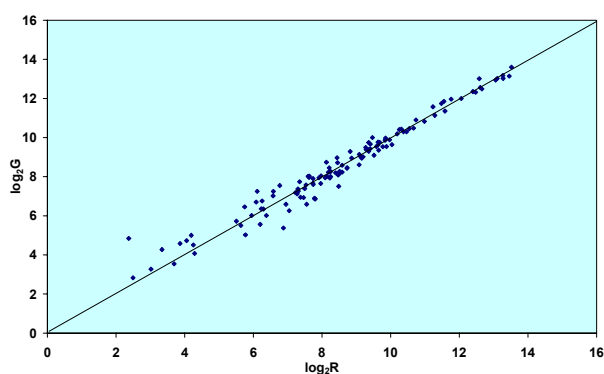
Set obsahoval 192 genů a 64 kontrol (Příloha 8.1). Oligonukleotidy jsme navrhli pomocí programu Oligo6, nasyntetizovány byly firmou Generi-Biotech. Pro první testování byla použita RNA připravená ze směsi buněčných linií, která byla zbavena DNA pomocí DNázy I. RNA byla přesrážena pomocí chloridu sodného. Později byl

tento krok vynechán, neboť byl zdrojem velkých ztrát RNA. Použito bylo přímé značení a dynamický typ hybridizace (Obr. 5.4). K analýze dat byl použit GeneTAC Integrator 4.0 (Genomic Solutions).



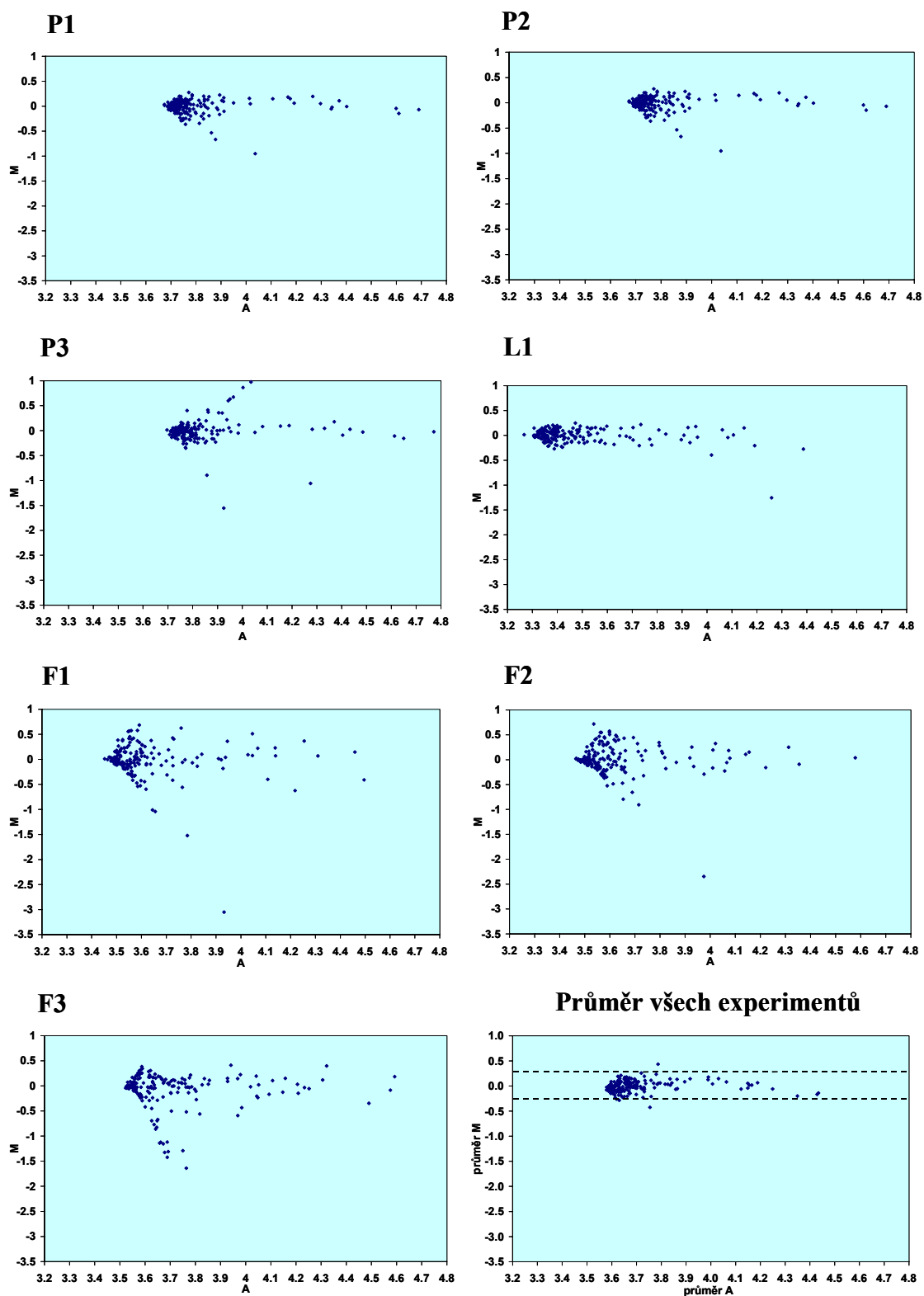
Obr. 5.4: Čip 192 genů a 64 kontrol. Experiment self-to-self hybridizace, RNA izolovaná z fibroblastů, cDNA značená přímo.

Abychom prokázali funkčnost navrženého čipu, prováděli jsme následující pilotní experimenty. Prvním byla self-to-self hybridizace, při které proti sobě hybridizuje stejný vzorek cDNA naznačený dvěma různými fluorescenčními barvami. Normalizované hodnoty signálů by měly být shodné. Nejvíce bodů by mělo ležet na diagonále nebo v její těsné blízkosti. Tento předpoklad, jak ukazuje obrázek 5.5, se potvrdil.



Obr. 5.5: Self-to-self experiment.

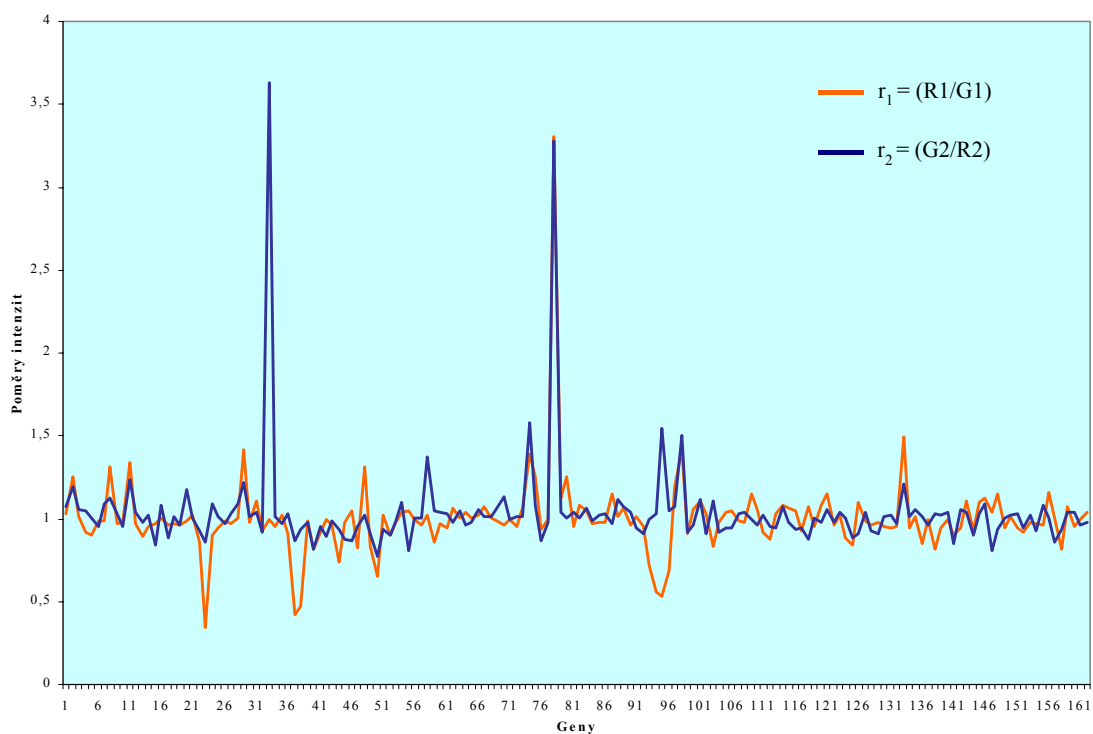
Dalším grafickým znázorněním téže informace je použití tzv. MA plotů, kde $M = \log_2 (R/G)$ a $A = \frac{1}{2} \log_2 (R.G)$. Výhodou těchto grafů je pro lidské oko snazší sledování bodů ležících nad či pod vodorovnou čarou, než sledování téhož na diagonále. Ze směrodatné odchylky jsme určili interval, ve kterém by měly body ležet. Zhodnocení experimentů self-to-self provedených na různém biologickém materiálu (placenta, linie 293, fibroblasty) a jejich průměr je vidět na Obr. 5.6.



Obr. 5.6: Grafické znázornění experimentu self-to-self pomocí MA plotů. Uvedeny jsou jednotlivé experimenty a na závěr jejich průměr (P1 – P3 placenta, L1 linie 293, F1 – F3 fibroblasty).

Dále byl proveden experiment „dye swap“, pomocí kterého jsme chtěli ověřit, zda získaná data zpracováváme správně. Experiment představuje dvě hybridizace provedené za shodných podmínek, ale v druhé hybridizaci jsou použité cDNA naznačeny fluorescenčními barvami opačně. Po normalizaci jsme předpokládali shodné poměry intenzit signálů v obou experimentech. Náš předpoklad se potvrdil s výjimkou dvou případů tvořících výrazné píky, což ukazuje obrázek 5.7.

Dosažením relativně shodných výsledků při opakování každého experimentu jsme potvrdili reprodukovatelnost vytvořeného systému.



Obr. 5.7: Experiment dye swap

| | | | |
|-----------------|-----------------|----------|----------|
| oranžová křivka | $r_1 = (R1/G1)$ | cy5 (R1) | cy3 (G1) |
| modrá křivka | $r_2 = (G2/R2)$ | cy3 (G2) | cy5 (R2) |

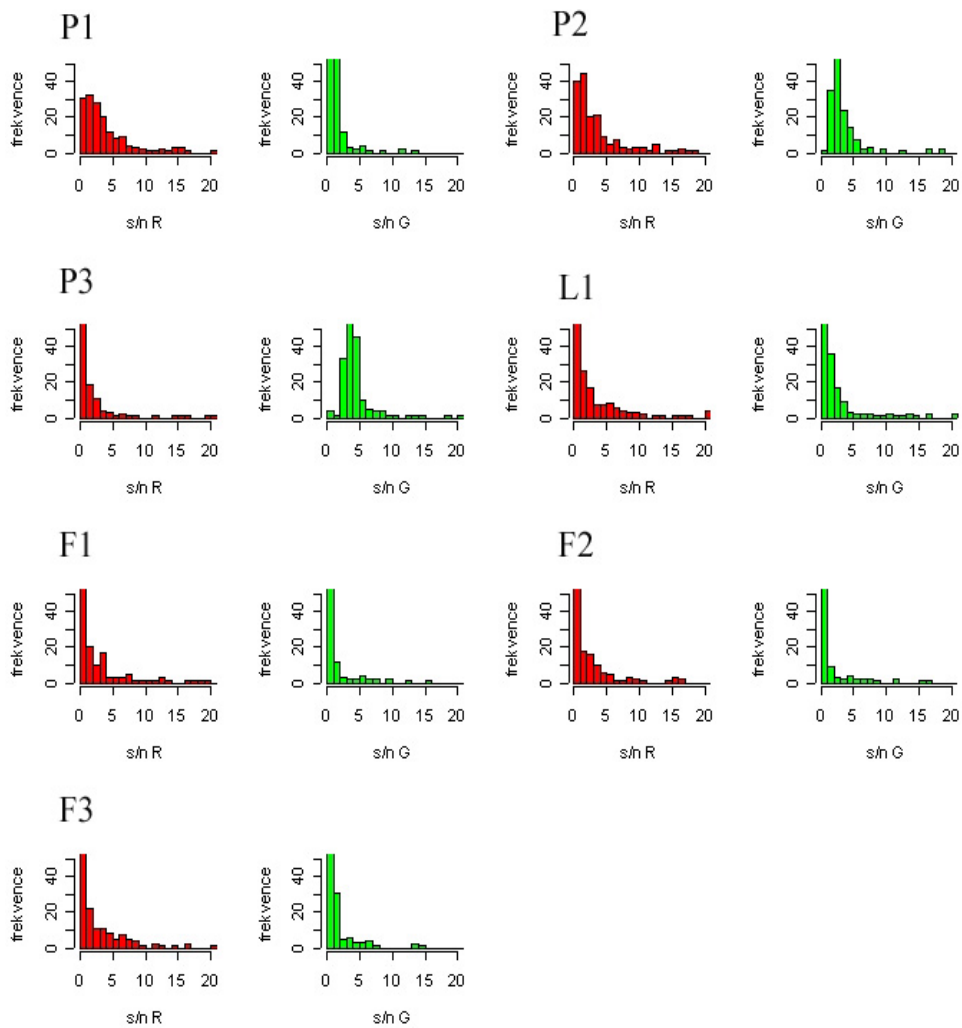
$r_1 = r_2$

5.3 HODNOCENÍ KVALITY SIGNÁLU

5.3.1 Získané úrovně signálu

Soubor vybraných genů byl rozdělen na základě kritéria „signál k šumu“ (s/n) do tří skupin. Do první byly zařazeny geny kódované mtDNA, jejichž signál dosahoval oproti zbývajícím genům o několik řádů vyšší hodnoty. Tyto hodnoty jsou důsledkem velkého množství mitochondrií v buňce a vysokého počtu transkripčních kopií mtDNA. Druhá skupina, dosahující také uspokojivé hodnoty signálu, obsahuje jaderně kódované geny, které hrají důležitou úlohu v mitochondriálním metabolismu. Poslední soubor tvoří geny, které mají nízké hodnoty signálu.

K hodnocení signálu jsme použili histogramy, které umožní snadné sledování rozložení (frekvence) hodnot s/n. Porovnávali jsme signál červeného a zeleného kanálu v sedmi experimentech self-to-self v různém biologickém materiálu, viz Obr. 5.8 a Příloha 8.3, která uvádí hodnoty s/n pro soubor 185 genů. Za kvalitní je považován signál, kde je $s/n > 3$ v obou kanálech. Signál v zeleném kanálu dosahoval nižších hodnot, což snížilo počet genů použitelných pro další analýzy. Hodnoty s/n pro komplexy OXPHOS s jejich podjednotkami kódovanými jadernou nebo mitochondriální DNA jsou uvedeny v tabulce 5.1.



Obr. 5.8: Rozložení hodnot s/n v různých biologických vzorcích znázorněné histogramem. Uvedeny jsou hodnoty s/n v červeném (R) a zeleném (G) kanálu. (P1 – P3 placenta, L1 linie buněk 293, F1 – F3 fibroblasty)

5.3.2 Detekce exprese genů v modelových buňkách a tkáních

Pomocí mito-čipu jsme srovnávali hodnoty exprese jednotlivých genů detekcí červené a zelené fluorescence u různých biologických materiálů (placenta, linie buněk 293, kontrolní fibroblasty). K porovnání byla zvolena normalizace centrováním „centering“. Od každého měření byla odečtena průměrná hodnota experimentu a vydělena směrodatnou odchylkou. Pro výpočet byly dosazeny hodnoty ve formě $\log_2 R/G$ (logaritmičtý poměr signálu obou barev). Takto bylo normalizováno 185 genů v sedmi experimentech self-to-self. Tabulka 5.2 srovnává hodnoty genové exprese na příkladu 20 genů. Pokud je hodnota poměru blízká nule, je detekce červeně i zeleně značené cDNA stejná. Hodnoty větší než nula ukazují zvýšený signál červené fluorescence, naopak záporné hodnoty znamenají zvýšený signál zelené a snížený signál červené fluorescence.

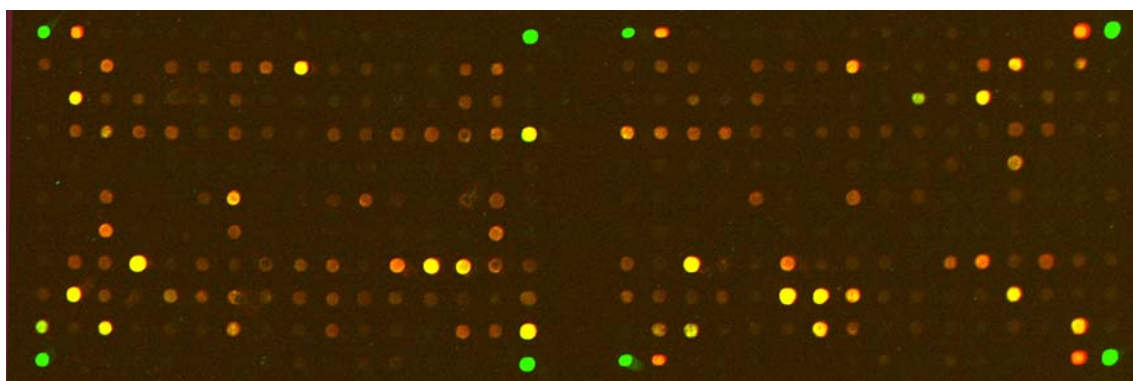
Při několikanásobném opakování experimentu by si měly hodnoty $\log_2 R/G$ odpovídat. Ze získaných dat jsou ale vidět jisté výkyvy. To jen dokazuje důležitost dlouhodobé optimalizace čipové technologie a nutnost standardizace jednotlivých kroků přípravy. Jsme si vědomi toho, že úplně totožných výsledků nelze dosáhnout nikdy, neboť pracujeme s biologickým materiálem, který představuje jistou vnitřní rozmanitost. Roli hraje také lidský faktor při přípravě čipu. Tyto a další možné vlivy, odrážející se na kvalitě dat, se snaží odstranit normalizace, která je nezbytnou součástí celé technologie.

| | | placenta | | | linie 293 | | fibroblasty | | |
|--------------|-----------|-------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | LocusLink | symbol genu | log ₂ R/G | log ₂ R/G | log ₂ R/G | log ₂ R/G | log ₂ R/G | log ₂ R/G | log ₂ R/G |
| mtDNA | 4509 | MTATP8 | -0.05 | 0.56 | -0.11 | 0.33 | -0.04 | 0.77 | 1.01 |
| | 4512 | MTCO1 | 0.24 | 0.11 | -0.05 | 0.32 | 0.83 | 0.60 | 0.50 |
| | 4514 | MTCO3 | 0.05 | 0.12 | 0.04 | 0.24 | -0.26 | -0.24 | -0.19 |
| | 4519 | MTCYB | 0.39 | 0.89 | 0.43 | -0.07 | 0.07 | -0.30 | -0.04 |
| | 4536 | MTND2 | -0.46 | -0.06 | -0.27 | 0.38 | 0.25 | 0.40 | 0.27 |
| | 4537 | MTND3 | 0.65 | 0.07 | 0.09 | 0.02 | 0.50 | 0.34 | -0.08 |
| | 4538 | MTND4 | -0.54 | -0.02 | -0.31 | -0.40 | 0.21 | -0.15 | -0.47 |
| | 4539 | MTND4L | -0.14 | 0.71 | 0.04 | 0.33 | 0.21 | 0.24 | 0.14 |
| | 4540 | MTND5 | 0.04 | 0.70 | 0.20 | 0.34 | 0.31 | 0.89 | 0.34 |
| | 4541 | MTND6 | 0.56 | 0.38 | 0.23 | 0.07 | 0.22 | -0.09 | 0.64 |
| ncDNA | 498 | ATP5A1 | -0.62 | -0.86 | -0.52 | 0.52 | -0.11 | 0.00 | 0.16 |
| | 506 | ATP5B | -0.56 | -0.61 | -0.66 | 0.39 | 0.33 | 0.90 | -0.32 |
| | 64756 | ATPAF1 | -0.82 | 0.34 | -0.30 | 0.30 | -1.02 | 0.85 | 0.59 |
| | 91647 | ATPAF2 | 0.09 | -0.40 | -0.91 | -0.05 | -0.90 | 0.01 | 0.19 |
| | 2819 | GPD1 | 0.03 | 0.50 | -0.09 | 0.21 | 0.08 | -0.01 | 0.19 |
| | 2820 | GPD2 | -0.09 | 0.20 | -0.27 | -0.02 | 0.32 | 0.06 | 0.31 |
| | 6667 | SP1 | -0.24 | -0.81 | -0.58 | 0.17 | 0.35 | 0.34 | -0.36 |
| | 6834 | SURF1 | 0.03 | -0.02 | -0.05 | 0.24 | -1.85 | 0.17 | 0.61 |
| | 7019 | TFAM | 0.25 | 0.04 | -0.25 | 0.06 | 0.09 | 0.10 | 0.71 |
| | 51106 | TFB1M | 0.93 | 0.45 | -0.60 | 0.14 | -0.68 | -0.16 | 0.32 |

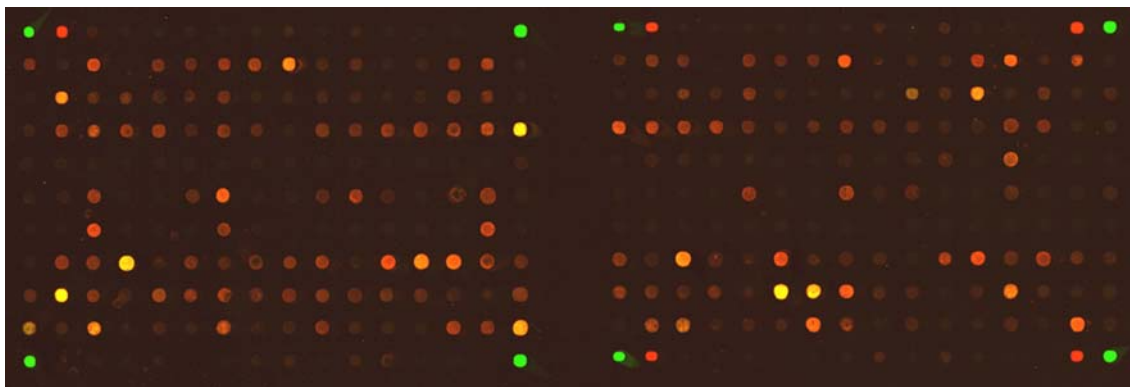
Tab. 5.2: Hodnoty exprese u vybraných genů. Tabulka srovnává genovou expresi vybraných genů v placentě, buněčné linii 293 a v kontrolních fibroblastech. Pro každý gen je uvedeno číslo LocusLink (NCBI), symbol genu a normalizované hodnoty log₂R/G ve třech různých biologických materiálech. V případě placenty a fibroblastů je uveden stejný experiment ve třech opakování.

5.3.3 Skener - vyhodnocování

Dále byla porovnána kvalita (přesnost, citlivost) dvou skenerů. Testovací čip jsme skenovali na skeneru GTSL IV (Genomic Solutions, USA) a na skeneru GenePix Personal 4100A (Axon Instruments, USA). Získali jsme tak od každého skeneru obraz (image) ve formě TIFF souboru. Kvalita obrazu byla na první pohled srovnatelná (Obr. 5.9 a 5.10), ale jejich další analýza již rozdíly vykazovala.

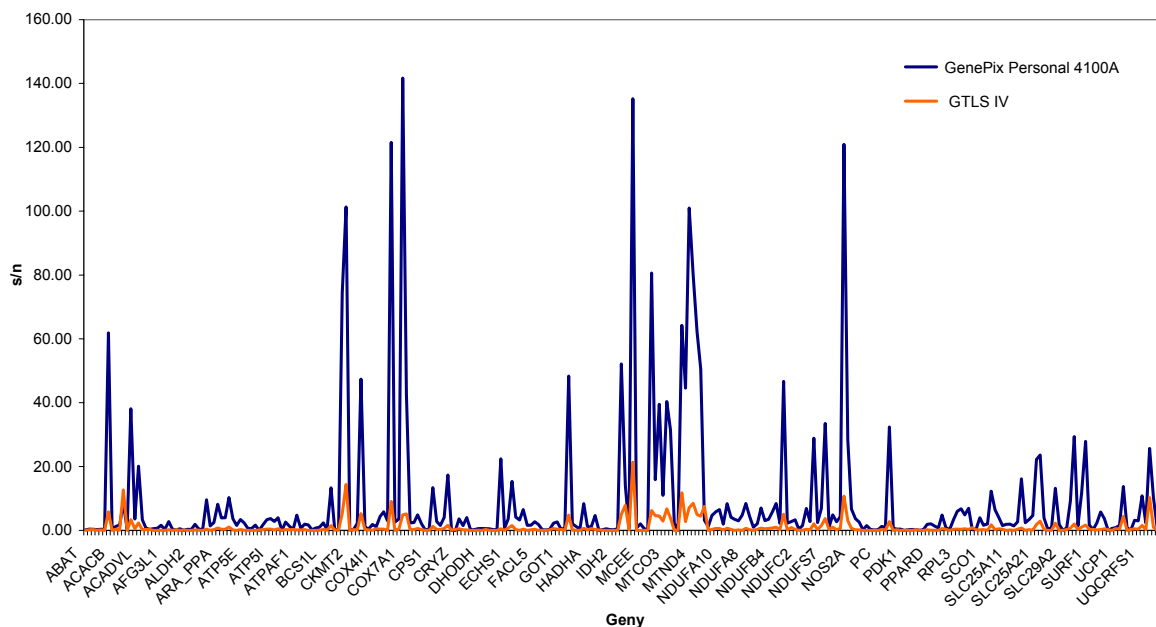


Obr. 5.9: Čip 280 genů - skenován na skeneru GTSL IV.

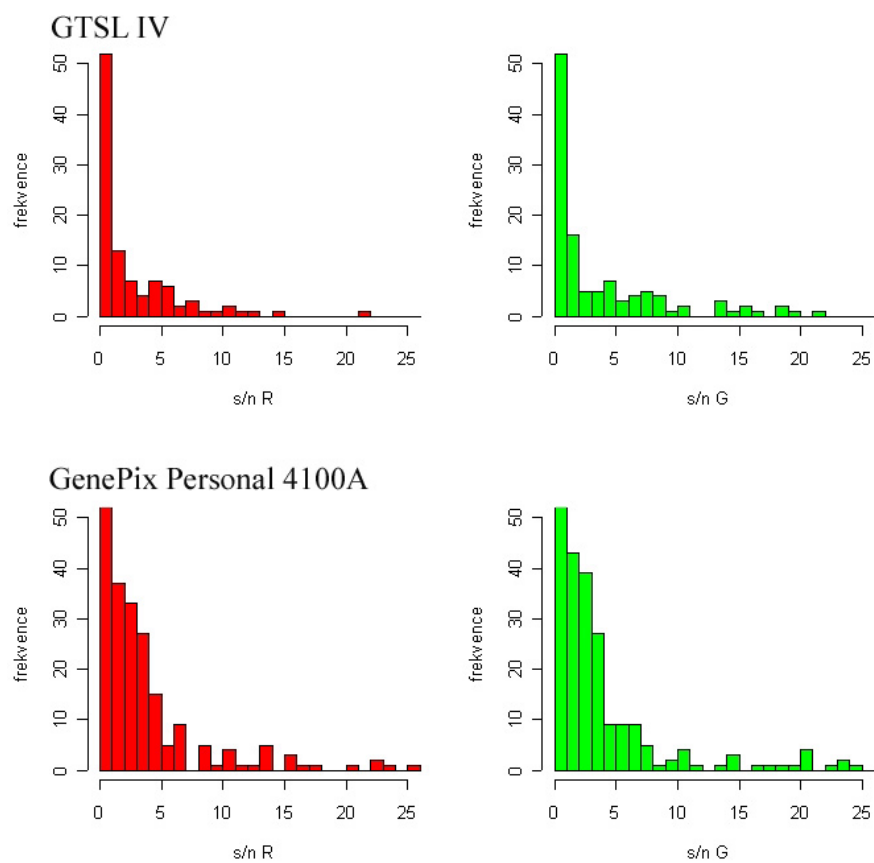


Obr. 5.10: Čip 280 genů - skenován na skeneru GenePix Personal 4100A.

Obrazy byly následně vyhodnoceny pomocí softwarového příložením dvou typů mřížek. Jedním typem byla mřížka s adaptivními kroužky a druhým mřížka, jejíž kroužky se tvarově přizpůsobí sledované tečce. K porovnání citlivosti skeneru i typu vyhodnocovací mřížky bylo použito kritérium $s/n > 3$. Srovnání ukázalo, že nejlepších výsledků bylo dosaženo použitím skeneru GenePix Personal 4100A a tvarově přizpůsobivé mřížky. Citlivost skeneru GenePix Personal 4100A je zhruba čtyřikrát vyšší, než skeneru GTSL IV, což dokumentuje Obr. 5.11 a Příloha 8.4. Obrázek 5.12 srovnává frekvence hodnot s/n v červeném a zeleném kanálu u obou skenerů.

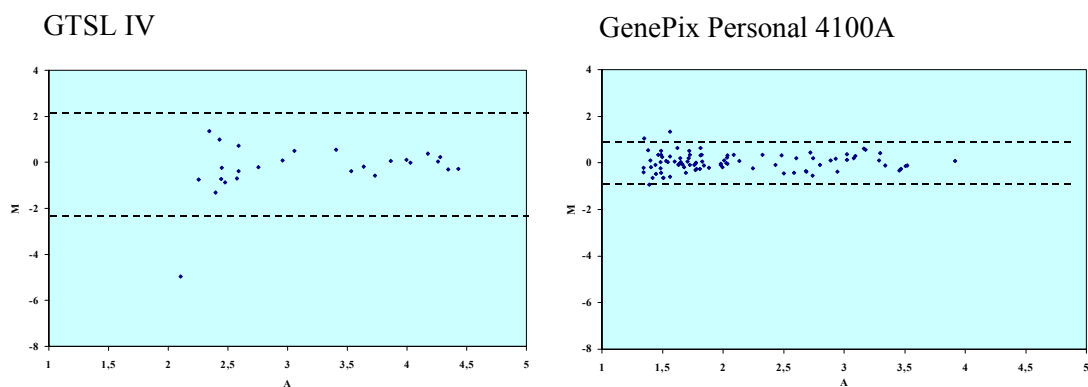


Obr. 5.11: Srovnání citlivosti různých skenerů. K porovnání kvality signálu bylo použito kritérium $s/n > 3$. Na ose x jsou uvedeny zkratky genů a na ose y jsou dosažené hodnoty s/n . Oranžová křivka představuje hodnoty získané skenerem GTSL IV (používaný v naší laboroři), modrá křivka je tvořena hodnotami, které poskytl skener GenePix Personal 4100A.



Obr. 5.12: Rozložení hodnot s/n u skenerů GTSL IV a GenePix Personal 4100A pomocí histogramů. Uvedeny jsou hodnoty s/n v červeném (R) a zeleném (G) kanálu.

Použitím kritéria s/n se soubor 185 genů v případě skeneru GTSL IV zúžil na 29, u skeneru GenePix Personal 4100A na 103 genů (viz Tab. 5.3). Počet genů splňujících tato kritéria zachycuje obrázek 5.13.



Obr. 5.13: Porovnání MA plotů skeneru GTSL IV a GenePix Personal 4100A.
 $M = \log_2 (R/G)$, $A = 1/2 \log_2 (R.G)$

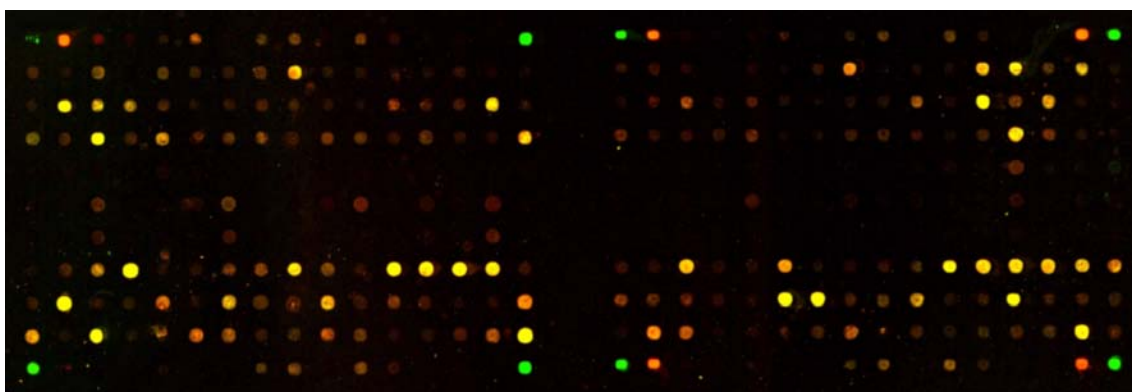
| | GTSL IV | | GenePix Personal 4100A | | Celkový počet genů |
|---------------------------|-------------|-------------|------------------------|-------------|-----------------------|
| | $s/n R > 3$ | $s/n G > 3$ | $s/n R > 3$ | $s/n G > 3$ | |
| Adaptivní kroužek | 29 genů | 42 genů | 107 genů | 103 genů | 185 |
| Přizpůsobivý tvar kroužku | 65 genů | 40 genů | 113 genů | 99 genů | 185 |

Tab. 5.3: Rozlišovací schopnost různých skenerů a přesnost vyhodnocovací mřížky.

5.4 MITO-ČIP VERZE 2

Pro druhou verzi čipu jsme k prvnímu mito-čipu (192 genů) přidali 96 zkušebních oligonukleotidů a vytvořili soubor obsahující 288 genů a 64 kontrol (Obr. 5.14). 96 oligonukleotidů (Příloha 8.2) sloužilo k ověření jak kvality automatického způsobu návržení (OligoPicker), tak i kvality jiného dodavatele (Illumina).

K testování byla použita RNA izolovaná z placenty, cDNA byly značená nepřímým způsobem barvami Alexa 546 (analog Cy3) a Alexa 647 (analog Cy5) (Molecular Probes). Byl použit statický způsob hybridizace.



Obr. 5.14: Čip 288 genů a 64 kontrol. Experiment self-to-self hybridizace, RNA izolovaná z placenty, cDNA značená nepřímo – Alexa dyes.

Kvalitu navržených a nasyntetizovaných oligonukleotidů od různých dodavatelských firem jsme sledovali pomocí experimentu „self-to-self“. Výsledky jsme shrnuli v tabulce 5.4.

| | Gen | Symbol | R | G | R/G |
|-------------|--|----------------|-------------|-------------|-------------|
| G-B | acyl-Coenzyme A dehydrogenase | ACADM | 7092 | 6635 | 1,07 |
| oligo | GCCCAACCGCCTCTTCCCGCCCGCCCATCCCGCCACG | | | | |
| Illu | acyl-Coenzyme A dehydrogenase | ACADM | 6085 | 5920 | 1,03 |
| oligo | GACTGTTGGTCTCTAGGTAGCCTTTGGTCTATTGTACACA | | | | |
| G-B | solute carrier family | SLC25A6 | 6063 | 6590 | 0,92 |
| oligo | CGGCCGCGCGACCTCCCTCTGCTTCGTGTACCCGCTGGA | | | | |
| Illu | solute carrier family | SLC25A6 | 7462 | 7467 | 1 |
| oligo | AACCATCGGCAGCCGATTCCGTGTCTTGATCACGGGGTGG | | | | |
| G-B | ATP5C1 - gama | ATP5B | 8425 | 7302 | 1,15 |
| oligo | TTGCCTCTGTACTTGTCTCTCTCCTTGCCCTAACCCAA | | | | |
| Illu | ATP5C1 - gama | ATP5B | 6648 | 7035 | 0,94 |
| oligo | TTGCCTCTGTACTTGTCTCTCTCCTTGCCCTAACCCAA | | | | |
| G-B | ATP5E - epsilon | ATP5E | 6920 | 7423 | 0,93 |
| oligo | TTGCCTCTGTACTTGTCTCTCTCCTTGCCCTAACCCAA | | | | |
| Illu | ATP5E - epsilon | ATP5E | 6181 | 6128 | 1,01 |
| oligo | TTGCCTCTGTACTTGTCTCTCTCCTTGCCCTAACCCAA | | | | |
| Illu | ATP5E - epsilon | ATP5E | 6173 | 6409 | 0,96 |
| oligo | CCGAAGAGGCCGTGACGCTGGACATGTTGGACCTGGGGGC | | | | |

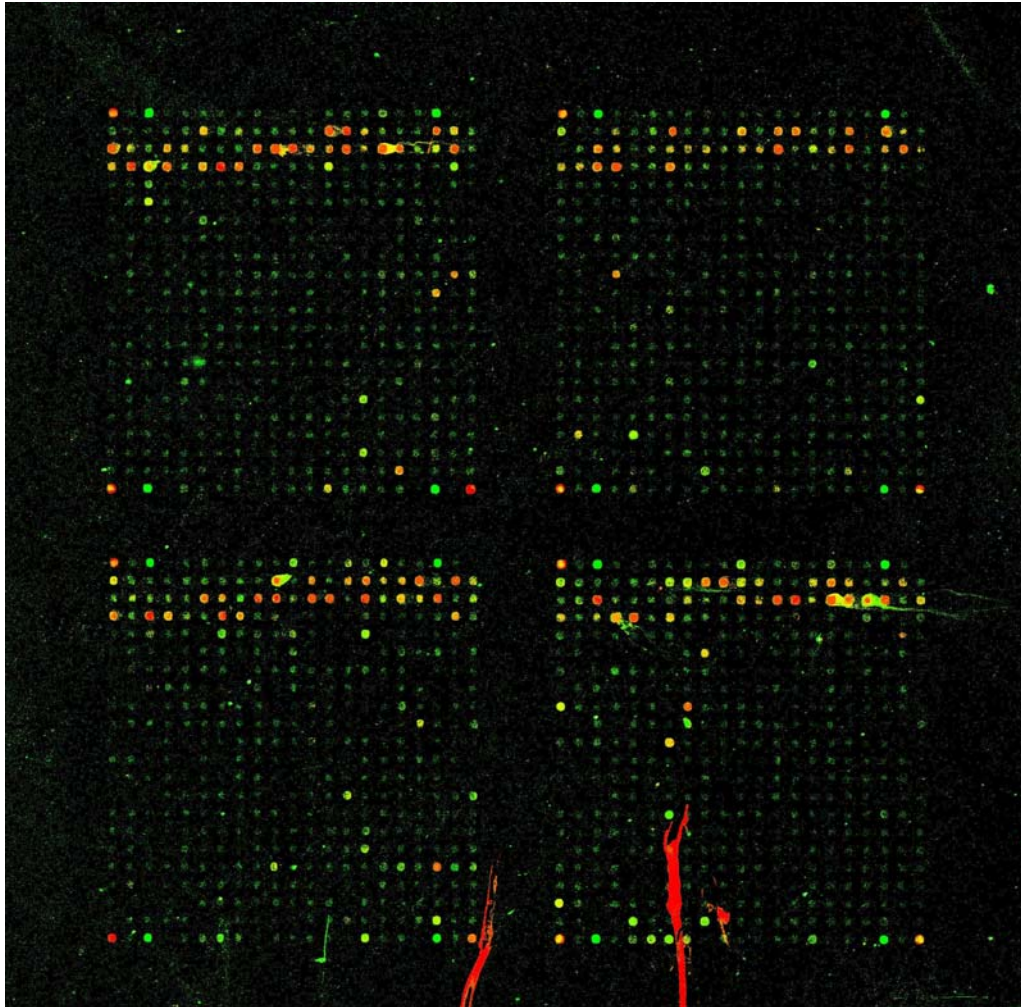
Tab. 5.4: Kvalitativní srovnání různě navržených oligonukleotidů a různých dodavatelských firem. Pro každý gen v tabulce je uvedena hodnota signálu obou barev a jejich poměr. Ke vzájemnému kvalitativnímu porovnání způsobů návržení a nasynetizování oligonukleotidů jsme použili poměr R/G. Dodavatelské firmy G-B - Generi Biotech, Illu - Illumina.

Oligonukleotidy navržené oběma způsoby (Oligo6, OligoPicker) dosahovaly stejných funkčních kvalit. Kvalita nasynetizovaných oligonukleotidů firmou Generi Biotech a Illumina byla také shodná. Na základě provedených experimentů a jejich srovnání jsme přistoupili ke konstrukci mito-čipu verze 3. Pro dodání zbývajících oligonukleotidů jsme zvolili firmu Illumina, která prokázala stejnou kvalitu jako Generi Biotech, ale byla levnější.

5.5 MITO-ČIP VERZE 3

Soubor obsahuje 1670 lidských genů, z toho je 48 housekeeping genů. Seznam genů současného oligonukleotidového mitochondriálního čipu je uveden v databázi BASE <http://lethe.img.cas.cz/>. Jako negativní kontroly jsou voleny geny od nepříbuzného organismu s organizmem sledovaným. V naše případě bylo zvoleno pět genů *Arabidopsis thaliana*, nevykazujících homologii se savčími geny.

V současné době je kompletní soubor oligonukleotidů připraven a probíhá jeho testování. K experimentům „self-to-self“ je používána RNA izolovaná z placenty, po reverzní transkripci je cDNA značená nepřímou metodou barvami Alexa dyes (Obr. 5.15).



Obr. 5.15: Čip tvoří 1848 genů a kontrol. Experiment self-to-self hybridizace, RNA izolovaná z placenty, cDNA značená nepřímo – Alexa dyes.

6. DISKUSE

6.1 TECHNOLOGIE DNA ČIPŮ

Čipová technologie je jedním z moderních genomických přístupů umožňujících paralelní detekci a kvantifikaci nukleových kyselin. Jedná se o dynamicky se rozvíjející přístup poskytující vysokou výkonnost DNA diagnostiky. Miniaturizace, automatizace a relativní rychlost přípravy čipu je jednou z výhod technologie. To potvrzuje i nárůst počtu studií využívajících tuto technologii. Zatímco v roce 1996 bylo publikováno pouze pět článků zabývajících se problematikou čipů, v roce 2003 to bylo už 3700 publikací (Koizumi, 2004). Pokud dnes v databázi PubMed zadáme klíčové slovo „microarrays“ získáme již 5945 odkazů.

Technologie DNA čipů představuje komplex metod a technik, jejichž zvládnutí, optimalizace a standardizace je pro kvalitu konečného výsledku zásadní. Technologie se celosvětově rychle vyvíjí a většina metodických postupů je předmětem patentové ochrany, nebo není otevřeně publikována. Zavádění v literatuře popsaných protokolů je podle našich zkušeností a podle zkušeností řady pracovišť obtížné. Proto bylo cílem této práce zavedení vlastní technologie DNA čipů a optimalizace používaných metod.

Předpokladem pro úspěšnou konstrukci DNA čipů je jednak dostupnost a příprava požadovaného počtu sond v dostatečné čistotě, koncentraci a množství a dále možnost jejich přesného prostorového rozmístění a efektivní imobilizace na povrchu čipu. Analytické využití čipu spočívá v jeho správném designu a správném navržení vlastních experimentů. To vyžaduje získání dostatečného množství cDNA z izolované RNA, jejího vhodného fluorescenčního označení, optimální specifickou hybridizaci, citlivou detekci hybridizačních signálů a provedení další bioinformatické analýzy. Vzhledem k finanční náročnosti všech těchto kroků je třeba redukovat optimalizaci a opakování experimentů potvrzujících reprodukovatelnost metody na minimum. Pro získání nejlepších výsledků musí být použitý biologický materiál striktně kontrolován a experimenty musí být pečlivě navrženy (Koizumi, 2004). Také naše práce směřovala k hledání levnějších postupů při zachování maximální kvality.

Čipy jsou dnes využívány především v primárním výzkumu, ale stále častěji se uplatňují i v diagnostice celé řady geneticky podmíněných onemocnění. Zatímco

primární výzkum upřednostňuje spíše celogenomové čipy, diagnostika často využívá pouze specifický soubor genů týkající se studované problematiky. Standardně jsou dnes používány komerční čipy nabízející velké soubory genů. Vzhledem k jejich vysoké ceně se ale stále častěji stává středem pozornosti, zvláště menších pracovišť, vývoj vlastní technologie čipů, umožňující připravit čip pouze s vybranými geny.

6.2 NAVRŽENÍ A KONSTRUKCE MITO-ČIPU

V našem případě byl čip primárně konstruován k diagnostickým účelům se zaměřením na problematiku sledující diferenciální genovou expresi mitochondriálně a nukleárně kódovaných genů systému oxidační fosforylace u pacientů s poruchami OXPHOS. Komerční čipy přinášejí řadu zásadních informací, ale z hlediska studia mitochondriálních genů nemohou být plně využity. Jejich informační hodnota je nadbytečná, neboť mitochondriální geny představují pouze 3 % všech genů na komerčním celogenomovém čipu. Pro dlouhodobé studie zaměřené výhradně na sledování exprese mitochondriálních genů, se zdá být výhodnější varianta čipu obsahujícího pouze soubor genů s mitochondriální funkcí, kterých je, jak uvádí Scharfe (Scharfe, et al., 2000), v současnosti známo přibližně 1000. Genetické a proteomické studie nejsou jednotné v počtu uváděných genů s mitochondriální funkcí. Některé uvádějí 600 – 700 známých mitochondriálních proteinů (Da Cruz, et al., 2003, Ozawa, et al., 2003, Westermann and Neupert, 2003), jiné např. Lopez a Rabilloud (Lopez, et al., 2000, Rabilloud, et al., 1998) uvádějí, že mitochondrie obsahuje až 1200 proteinů. Další výpočetní analýzy předpokládají dokonce 4000 lidských mitochondriálních proteinů. Celkově lze říci, že 5 – 10 % savčích genů kóduje proteiny s mitochondriální funkcí (Thorburn, 2004). Obdobné informace získáme i z veřejných databází, například (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink/>). Zde po zadání slova „mitoch*“ získáme 1077 odkazů na geny s mitochondriální funkcí nebo na geny s mitochondrií kooperující.

Protože je technologie čipů finančně velmi náročná, bylo naším cíle využívat takové metody, které budou vykazovat vysokou kvalitu, ale budou i cenově dostupné. Prvním krokem naší práce byl výběr genů s mitochondriální funkcí, které bude čip obsahovat. Zaměřili jsme se nejprve na konstrukci malého čipu, který obsahoval 192 genů nutných pro fungování mitochondrie a na něm jsme technologii zaváděli.

Dalším krokem bylo stanovení optimální délky oligonukleotidů (sond), určených pro tisk na povrch skla. Existuje více názorů na optimální délku oligonukleotidů, tedy zda volit 40, 50, 60, 70- mery. Vhodnou délku oligonukleotidů řeší ve své práci např. van Dam (van Dam and Quake, 2002) a Kane (Kane, et al., 2000), který pracoval s 50- mery. S délkou klesá citlivost, naopak roste specifita, ale i cena. Jako optimální z hlediska sezitivity a ceny byly zvoleny pro přípravu oligonukleotidových čipů 5'-aminomodifikované 40- mery, což je ve shodě s publikovanými daty Relogia (Religio, et al., 2002). Následovalo testování způsobů izolace RNA, značení cDNA a zjišťování efektivity odlišných typů hybridizace.

6.3 IZOLACE RNA A PŘÍPRAVA cDNA

K izolaci RNA jsme vyzkoušeli čtyři postupy a vzájemně je porovnali z hlediska časové náročnosti, kvality a kvantity připravené RNA. Na základě tohoto srovnání jsme zvolili izolaci RNA lyzačním roztokem ToRNAzol, který poskytl dobré výtěžky kvalitní RNA. Následná optimalizace značení cDNA představovala postupné použití a porovnání jednoho typu přímého a dvou typů nepřímého značení. Při hodnocení jednotlivých metod jsme byli nuceni přihlídnout k jejich cenové dostupnosti. Na základě tohoto hodnocení jsme zvolili cenově přijatelnou metodu nepřímého značení (Alexa dyes), která prokázala uspokojivé výsledky. Používání dynamické hybridizace sebou přineslo i problémy s lokálně zvýšeným pozadím na čipu. Proto jsme od jejího užívání ustoupili a v současné době využíváme hybridizaci statickou. Každý ze zmíněných postupů bylo nutné optimalizovat tak, aby jejich vzájemné propojení poskytlo maximální přesnost experimentu.

6.4 DETEKCE HYBRIDIZAČNÍCH SIGNÁLŮ A VYHODNOCENÍ DAT

Reprodukovatelnost systému jsme ověřovali pilotními experimenty, které ukázaly opakovaně nízké hodnoty exprese některých genů. Otázkou zůstává, zda je to jen jejich fyziologickou funkcí, která vysokou expresi nevyžaduje, nebo zda nízké hodnoty exprese nejsou způsobeny technickou chybou. Existují různé příčiny. Jednou může být chybné navržení oligonukleotidů způsobující vznik sekundárních struktur, které znemožní vazbu s hybridizující cDNA. Další vysvětlení lze hledat v citlivosti

skeneru. Skener buď měřil vysoký signál i pozadí, nebo pozadí bylo odfiltrováno spolu se signálem. V obou případech byl vzájemný poměr stejný, ale nízký. Zachycení maximálního signálu a minimalizování pozadí je důležitou vlastností skeneru. Proto byla provedena srovnávací analýza dvou skenerů, která prokázala čtyřikrát nižší citlivost námi používaného skeneru (GTSL IV) oproti skeneru GenePix Personal 4100A z jiného pracoviště. Doposud zpracovaná data mohou být proto zatížena chybou, zapříčiněnou nízkou rozlišovací schopností skeneru.

Následným krokem analýzy je převedení obrazu (grafického formátu) do formy datového souboru, k čemuž slouží softwarové příložením mřížky. Chyby odvislé od nepřesností mřížek se mohou dále prohloubit při vyhodnocování. Mřížky existují v několika formátech (fixní kroužky, adaptivní kroužky a tvarově adaptivní kroužky). Správné vyhodnocení signálu vyžaduje volbu vhodné mřížky. Pokud zvolíme formát fixních kroužků, zvyšujeme riziko, že hodnoty signálu budou zkresleny pozadím. Adaptivní kroužky, které se velikostí přesně přizpůsobí velikosti tečky, sice zvýší kvalitu získaných dat, ale stále hrozí nebezpečí falešného signálu. Jako nejvhodnější se uvádí formát mřížky s adaptivním tvarem kroužků. Kroužky se přizpůsobí přesnému tvaru tečky a nebezpečí zkreslených výsledků je tak minimální. Experimentálním srovnáním mřížek jsme dospěli k závěru, že nejpřesnější je mřížka s adaptivním tvarem kroužků, což také potvrdily údaje z literárních pramenů (Adams, 1994).

Analýza čipových dat je odvislá od cíle experimentu a tomu je nutno přizpůsobit zpracování dat. Analýza zahrnuje normalizaci, která je nutnou a nepostradatelnou součástí čipových experimentů. Cílem normalizace je minimalizovat systematické chyby v měření genové exprese dvou hybridizujících vzorků cDNA tak, aby bylo možné co nejjednodušší sledování jejich biologických rozdílů (Yang, et al., 2002). Rozdíly v signálech jsou způsobeny různými faktory. Patří sem fyzikální vlastnosti fluorescenčních barev jako je teplotní a světelná citlivost, poločas rozpadu a efektivita jejich inkorporace do cDNA. Nutné je zmínit variabilitu hybridizace a nastavení skeneru. Vztah mezi kanály fluoroforů není lineární, proto je vhodné k normalizaci čipových experimentů využít nelineární regresi.

Normalizovaná data jsou následně filtrována pomocí kritérií vhodných pro příslušný experiment. Jedním z nich je „signál k šumu“ (s/n), pomocí kterého vyřadíme z dalších analýz nekvalitní data, jež by mohla být zdrojem velkého procenta chyb. Dle

literárních zdrojů je za kvalitní považován $s/n > 3$, proto jsme i my toto kritérium použili.

Pomocí citlivějšího skeneru jsme získali 110 genů splňujících kritérium $s/n > 3$, což by mohlo potvrzovat správné navržení oligonukleotidů. Teprve další experimenty a srovnání s hodnotami exprese získanými jinými metodami mohou ukázat, do jaké míry si tyto výsledky vzájemně odpovídají. Otázkou je, zda všechny geny s vysokým s/n jsou opravdu exprimovány ve vysoké úrovni, nebo zda je v některých případech vysoké s/n důsledkem nespecifické reakce. Naopak nízké signály u dalších genů ještě nemusejí znamenat chybné navržení oligonukleotidů, ale pouze ukazují na fyziologicky malé množství transkriptu v buňce. Například množství mRNA u ATPAF1 a ATPAF2 je dle QRT PCR o 1 – 2 řády nižší než u podjednotek α a β ATP-syntázy (Pickova, 2003). Jak je vidět z měření pomocí citlivějšího skeneru v Příloze 8.4, hodnota s/n u ATPAF2 je výrazně nižší než hodnoty pro $F_1\alpha$ a $F_1\beta$, zatímco hodnoty ATPAF1 jsou shodné. Proto nemůžeme vysoké ani nízké hodnoty signálu brát za definitivní, ale teprve další studie a srovnání s literárními údaji a výsledkem northern blotu a QRT PCR umožní prokázat kvalitu a funkčnost čipu.

6.5 ROZŠÍŘENÉ FORMY MITO-ČIPU

Po úspěšném odzkoušení celé technologie na souboru 192 genů, jsme přistoupili k jeho rozšíření o dalších 800 genů s mitochondriální funkcí, neboť bychom se chtěli v budoucnu věnovat vedle diagnostiky i shlukové analýze (clustering) genů se zatím neznámou funkcí. Funkci genu lze odhadovat podle podobnosti exprese (koexprese/koregulace) s již funkčně známým genem. Tím je predikována funkce neznámého proteinu a jeho účast v příslušné metabolické dráze (Mootha, et al., 2003). Problematikou se zabývá řada prací, které lze nalézt na <http://www.nslj-genetics.org/microarray/> Bibliography on Microarray Data Analysis.

Čipové technologie vyžadují velké množství dat na vstupu (informace o sondách, způsobu přípravy jednotlivých serií a typů čipů, informace o analyzovaném biologickém materiálu a jeho uchování, způsobech izolace RNA, způsobech fluorescenčního značení, podmínkách hybridizace a parametrech skenování) i na výstupu (intenzity fluorescence v prostoru jednotlivých sond). Jedná se zhruba o 2000

dat na jeden experiment. Současně je také nutné propojit několik softwarových systémů, jako jsou databáze, aplikace pro klastrování a vizualizaci dat, veřejné databáze obsahující základní informace či odkazy na sledované geny a komerční laboratorní systém LIMS (Laboratory Information Management Systéme). Proto byl vytvořen systém BASE (BioArray Software Environmen) (Saal, et al., 2002), který všechny tyto složky propojuje. Vynikající vlastnosti BASE jsou důvodem, proč ji také využíváme k uchování a zpracování experimentálních dat.

Závěrem lze shrnout, že se podařilo zavést technologii DNA čipů a vytvořit mitochondriální oligonukleotidový čip, přestože jeho rutinní využívání k diagnostickým účelům bude vyžadovat ještě velké úsilí.

7. ZÁVĚR

- Byl vytvořen a otestován mitochondriální oligonukleotidový čip obsahující 192 genů určený pro sledování exprese mitochondriálně a jaderně kódovaných genů souvisejících s mitochondriální funkcí.
- Byla provedena optimalizace dílčích kroků (metod) přípravy čipu, jako je navrhování a příprava sond, úprava povrchu skel, izolace RNA, značení cDNA a hybridizace.
- Pilotní experimenty využívající různý biologický materiál potvrdily funkčnost a reprodukovatelnost vytvořeného systému.
- Po úspěšném odzkoušení první verze mito-čipu se podařilo čip rozšířit na současných 1670 genu.

8. POUŽITÁ LITERATURA

- Adams, R. B., L. (1994): Seeded region growing. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence* 16: 641-647.
- Agsteribbe, E., Huckriede, A., Veenhuis, M., Ruiters, M. H., Niezen-Koning, K. E., Skjeldal, O. H., Skullerud, K., Gupta, R. S., Hallberg, R., van Diggelen, O. P., and et al. (1993): A fatal, systemic mitochondrial disease with decreased mitochondrial enzyme activities, abnormal ultrastructure of the mitochondria and deficiency of heat shock protein 60. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 193: 146-154.
- Alam, T. I., Kanki, T., Muta, T., Ukaji, K., Abe, Y., Nakayama, H., Takio, K., Hamasaki, N., and Kang, D. (2003): Human mitochondrial DNA is packaged with TFAM. *Nucleic Acids. Res.* 31: 1640-1645.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990): Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., de Bruijn, M. H. L., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I. C., Nierlich, D. P., Roe, B. A., Sanger, F., Schreier, P. H., Smith, A. J. H., Staden, R., and Young, I. G. (1981): Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290: 457-465.
- Andersson, U., Antonicka, H., Houstek, J., and Cannon, B. (2000): A novel principle for conferring selectivity to poly(A)-binding proteins: interdependence of two ATP synthase beta-subunit mRNA-binding proteins. *J. Biochem.* 346: 33-39.
- Andreoli, C., Prokisch, H., Hortnagel, K., Mueller, J. C., Munsterkotter, M., Scharfe, C., and Meitinger, T. (2004): Mitop2, an integrated database on mitochondrial proteins in yeast and man. *Nucleic Acids. Res.* 32 Database issue: D459-462.
- Arnold, I., and Langer, T. (2002): Membrane protein degradation by AAA proteases in mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* 1592: 89-96.
- Artal-Sanz, M., Tsang, W. Y., Willems, E. M., Grivell, L. A., Lemire, B. D., van der Spek, H., Nijtmans, L. G., and Sanz, M. A. (2003): The mitochondrial prohibitin complex is essential for embryonic viability and germline function in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* 278: 32091-32099.
- Ashburner, M., and Lewis, S. (2002): On ontologies for biologists: the Gene Ontology--untangling the web. *Novartis Found Symp.* 247: 66-80; discussion 80-63, 84-90, 244-252.

- Ballinger, S. W., Shoffner, J. M., Hedaya, E. V., Trounce, I., Polak, M. A., Koontz, D. A., and Wallace, D. C. (1992): Maternally transmitted diabetes and deafness associated with a 10.4 kb mitochondrial DNA deletion. *Nat. Genet.* 1: 11-15.
- Ballinger-SW, Shoffner-J, Gebhart-, Koontz-D, and Wallace, D. C. (1994): Mitochondrial diabetes revisited [letter]. *Nat. Genet.* 7: 458-459.
- Bannai, H., Tamada, Y., Maruyama, O., Nakai, K., and Miyano, S. (2002): Extensive feature detection of N-terminal protein sorting signals. *Bioinformatics* 18: 298-305.
- Bourgeron, T., Parfait, B., Rustin, P., Chretien, D., Birch-Machin, M., and Munnich, A. (1995): Mitochondrial complex II deficiency caused by a mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene. *Euromit III* 72.
- Bowtel, D. S., J. (2003): *DNA Microarrays A Molecular Cloning Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Brazma, A., Hingamp, P., Quackenbush, J., Sherlock, G., Spellman, P., Stoeckert, C., Aach, J., Ansorge, W., Ball, C. A., Causton, H. C., Gaasterland, T., Glenisson, P., Holstege, F. C., Kim, I. F., Markowitz, V., Matese, J. C., Parkinson, H., Robinson, A., Sarkans, U., Schulze-Kremer, S., Stewart, J., Taylor, R., Vilo, J., and Vingron, M. (2001): Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat. Genet.* 29: 365-371.
- Briones, P., Vilaseca, M. A., Ribes, A., Vernet, A., Lluch, M., Cusi, V., Huckriede, A., and Agsteribbe, E. (1997): A new case of multiple mitochondrial enzyme deficiencies with decreased amount of heat shock protein 60. *J. Inherit. Metab. Dis.* 20: 569-577.
- Carter, R. S., Bhat, N. K., Basu, A., and Avadhani, N. G. (1992): The basal promoter elements of murine cytochrome c oxidase subunit IV gene consist of tandemly duplicated ets motifs that bind to GABP-related transcription factors. *J. Biol. Chem.* 267: 23418-23426.
- Coenen, M. J., van den Heuvel, L. P., Nijtmans, L. G., Morava, E., Marquardt, I., Girschick, H. J., Trijbels, F. J., Grivell, L. A., and Smeitink, J. A. (1999): SURFEIT-1 gene analysis and two-dimensional blue native gel electrophoresis in cytochrome c oxidase deficiency. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 265: 339-344.
- Contamine, V., and Picard, M. (2000): Maintenance and integrity of the mitochondrial genome: a plethora of nuclear genes in the budding yeast. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 281-315.
- Cotter, D., Guda, P., Fahy, E., and Subramaniam, S. (2004): MitoProteome: mitochondrial protein sequence database and annotation system. *Nucleic. Acids. Res.* 32 Database issue: D463-467.

- Da Cruz, S., Xenarios, I., Langridge, J., Vilbois, F., Parone, P. A., and Martinou, J. C. (2003): Proteomic analysis of the mouse liver mitochondrial inner membrane. *J. Biol. Chem.* 278: 41566-41571.
- Dennis, G., Jr., Sherman, B. T., Hosack, D. A., Yang, J., Gao, W., Lane, H. C., and Lempicki, R. A. (2003): DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome. Biol.* 4: P3.
- Diehl, F., Grahlmann, S., Beier, M., and Hoheisel, J. D. (2001): Manufacturing DNA microarrays of high spot homogeneity and reduced background signal. *Nucleic Acids. Res.* 29: E38.
- Eisenberg, E., and Levanon, E. Y. (2003): Human housekeeping genes are compact. *Trends. Genet.* 19: 362-365.
- Eller, P., Foger, B., Gander, R., Sauper, T., Lechleitner, M., Finkenstedt, G., and Patsch, J. R. (2001): Wolfram syndrome: a clinical and molecular genetic analysis. *J. Med. Genet.* 38: E37.
- Escriva, H., Rodriguez-Pena, A., and Vallejo, C. G. (1999): Expression of mitochondrial genes and of the transcription factors involved in the biogenesis of mitochondria Tfam, NRF-1 and NRF-2, in rat liver, testis and brain. *Biochimie* 81: 965-971.
- Falkenberg, M., Gaspari, M., Rantanen, A., Trifunovic, A., Larsson, N. G., and Gustafsson, C. M. (2002): Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA. *Nat. Genet.* 31: 289-294.
- Fernandez-Silva, P., Martinez-Azorin, F., Micol, V., and Attardi, G. (1997): The human mitochondrial transcription termination factor (mTERF) is a multizipper protein but binds to DNA as a monomer, with evidence pointing to intramolecular leucine zipper interactions. *Embo J.* 16: 1066-1079.
- Fisher, R. P., and Clayton, D. A. (1988): Purification and characterization of human mitochondrial transcription factor 1. *Mol. Cell. Biol.* 8: 3496-3509.
- Garesse, R., and Vallejo, C. G. (2001): Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes. *Gene* 263: 1-16.
- Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G. (2000): The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes. Dev.* 14: 121-141.
- Goldberg, A. L. (1992): The mechanism and functions of ATP-dependent proteases in bacterial and animal cells. *Eur. J. Biochem.* 203: 9-23.
- Grossman, L. I., and Lomax, M. I. (1997): Nuclear genes for cytochrome c oxidase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1352: 174-192.

- Hackenbrock, C. R. (1968): Chemical and physical fixation of isolated mitochondria in low-energy and high-energy states. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 61: 598-605.
- Hatefi, Y. (1985): The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annu. Rev. Biochem.* 54: 1015-1069.
- He, S., and Fox, T. D. (1997): Membrane translocation of mitochondrially coded Cox2p: distinct requirements for export of N and C termini and dependence on the conserved protein Oxa1p. *Mol. Biol. Cell* 8: 1449-1460.
- Hell, K., Neupert, W., and Stuart, R. A. (2001): Oxa1p acts as a general membrane insertion machinery for proteins encoded by mitochondrial DNA. *Embo J.* 20: 1281-1288.
- Herrmann, J. M., Neupert, W., and Stuart, R. A. (1997): Insertion into the mitochondrial inner membrane of a polytopic protein, the nuclear-encoded Oxa1p. *Embo J.* 16: 2217-2226.
- Hess, J. F., Parisi, M. A., Bennett, J. L., and Clayton, D. A. (1991): Impairment of mitochondrial transcription termination by a point mutation associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature* 351: 236-239.
- Hofmann, S., Rothbauer, U., Muhlenbein, N., Neupert, W., Gerbitz, K. D., Brunner, M., and Bauer, M. F. (2002): The C66W mutation in the deafness dystonia peptide 1 (DDP1) affects the formation of functional DDP1.TIM13 complexes in the mitochondrial intermembrane space. *J. Biol. Chem.* 277: 23287-23293.
- Holt, I. J., Harding, A. E., Petty, R. K. H., and Morgan-Hughes, J. A. (1990): A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy. *Am. J. Hum. Genet.* 46: 428-433.
- Honlinger, A., Bomer, U., Alconada, A., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Dietmeier, K., and Pfanner, N. (1996): Tom7 modulates the dynamics of the mitochondrial outer membrane translocase and plays a pathway-related role in protein import. *Embo J.* 15: 2125-2137.
- Hood, D. A., Adihetty, P. J., Colavecchia, M., Gordon, J. W., Irrcher, I., Joseph, A. M., Lowe, S. T., and Rungi, A. A. (2003): Mitochondrial biogenesis and the role of the protein import pathway. *Med. Sci. Sports Exerc.* 35: 86-94.
- Houstek, J. (2000): Genetic aspects of mitochondrial encephalomyopathies. *Biologia* 55: 209-221.
- Houstek, J., Klement, P., Floryk, D., Antonicka, H., Hermanska, J., Kalous, M., Hansikova, H., Hout'kova, H., Chowdhury, S. K., Rosipal, t., Kmoch, S., Stratilova, L., and Zeman, J. (1999): A novel deficiency of mitochondrial ATPase of nuclear origin. *Hum. Mol. Genet.* 8: 1967-1974.

- Hubbard, T., Barker, D., Birney, E., Cameron, G., Chen, Y., Clark, L., Cox, T., Cuff, J., Curwen, V., Down, T., Durbin, R., Eyraas, E., Gilbert, J., Hammond, M., Huminiecki, L., Kasprzyk, A., Lehvaslaiho, H., Lijnzaad, P., Melsopp, C., Mongin, E., Pettett, R., Pocock, M., Potter, S., Rust, A., Schmidt, E., Searle, S., Slater, G., Smith, J., Spooner, W., Stabenau, A., Stalker, J., Stupka, E., Ureta-Vidal, A., Vastrik, I., and Clamp, M. (2002): The Ensembl genome database project. *Nucleic. Acids. Res.* 30: 38-41.
- Chen, X., Prosser, R., Simonetti, S., Sadlock, J., Jagiello, G., and Schon, E. A. (1995): Rearranged mitochondrial genomes are present in human oocytes. *Am J Hum Genet.* 57: 239-247.
- Choi, Y. S., Kim, S., Kyu Lee, H., Lee, K. U., and Pak, Y. K. (2004): In vitro methylation of nuclear respiratory factor-1 binding site suppresses the promoter activity of mitochondrial transcription factor A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 314: 118-122.
- Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159.
- Chomyn, A., Martinuzzi, A., Yoneda, M., Daga, A., Hurko, O., Johns, D., Lai, S. T., Nonaka, I., Angelini, C., and Attardi, G. (1992): MELAS mutation in mtDNA binding site for transcription termination factor causes defects in protein synthesis and in respiration but no change in levels of upstream and downstream mature transcripts. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 89: 4221-4225.
- Chung, A. B., Stepien, G., Haraguchi, Y., Li, K., and Wallace, D. C. (1992): Transcriptional control of nuclear genes for the mitochondrial muscle ADP/ATP translocator and the ATP synthase beta subunit. Multiple factors interact with the OXBOX/REBOX promoter sequences. *J. Biol. Chem.* 267: 21154-21161.
- Jacobs, L. J., Jongbloed, R. J., Wijburg, F. A., De Klerk, J. B., Geraedts, J. P., Nijland, J. G., Scholte, H. R., De Coo, I. F., and Smeets, H. J. (2004): Pearson syndrome and the role of deletion dimers and duplications in the mtDNA. *J. Inherit. Metab. Dis.* 27: 47-55.
- Jiang, L., Tsubakihara, M., Heinke, M. Y., Yao, M., Dunn, M. J., Phillips, W., dos Remedios, C. G., and Nosworthy, N. J. (2001): Heart failure and apoptosis: electrophoretic methods support data from micro- and macro-arrays. A critical review of genomics and proteomics. *Proteomics* 1: 1481-1488.
- Kalous, M., and Drahota, Z. (1996): The role of mitochondria in aging. *Physiol. Res.* 45: 351-359.

- Kane, M. D., Jatkoe, T. A., Stumpf, C. R., Lu, J., Thomas, J. D., and Madore, S. J. (2000): Assessment of the sensitivity and specificity of oligonucleotide (50mer) microarrays. *Nucleic. Acids. Res.* 28: 4552-4557.
- Kogelnik, A. M., Lott, M. T., Brown, M. D., Navathe, S. B., and Wallace, D. C. (1996): MITOMAP: a human mitochondrial genome database. *Nucleic. Acids. Res.* 24: 177-179.
- Koizumi, S. (2004): Application of DNA microarrays in occupational health research. *J. Occup. Health.* 46: 20-25.
- Langer, T. (2000): AAA proteases: cellular machines for degrading membrane proteins. *Trends. Biochem. Sci.* 25: 247-251.
- Langer, T., Kaser, M., Klanner, C., and Leonhard, K. (2001): AAA proteases of mitochondria: quality control of membrane proteins and regulatory functions during mitochondrial biogenesis. *Biochem. Soc. Trans.* 29: 431-436.
- Larsson, N. G., Barsh, G. S., and Clayton, D. A. (1997): Structure and chromosomal localization of the mouse mitochondrial transcription factor A gene (Tfam). *Mamm. Genome* 8: 139-140.
- Larsson, N. G., Oldfors, A., Holme, E., and Clayton, D. A. (1994): Low levels of mitochondrial transcription factor A in mitochondrial DNA depletion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 200: 1374-1381.
- Lenka, N., Vijayasarathy, C., Mullick, J., and Avadhani, N. G. (1998): Structural organization and transcription regulation of nuclear genes encoding the mammalian cytochrome c oxidase complex. *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.* 61: 309-344.
- Li, K., Hodge, J. A., and Wallace, D. C. (1990): OXBOX, a positive transcriptional element of the heart-skeletal muscle ADP/ATP translocator gene. *J. Biol. Chem.* 265: 20585-20588.
- Lightowers, R. N., Chinnery, P. F., Turnbull, D. M., and Howell, N. (1997): Mammalian mitochondrial genetics: heredity, heteroplasmy and disease. *Trends. Genet.* 13: 450-455.
- Lodish, H. (2000): *Molecular Cell Biology* W. H. Freeman and Company, New York.
- Lopez, M. F., Kristal, B. S., Chernokalskaya, E., Lazarev, A., Shestopalov, A. I., Bogdanova, A., and Robinson, M. (2000): High-throughput profiling of the mitochondrial proteome using affinity fractionation and automation. *Electrophoresis* 21: 3427-3440.
- Maglott, D. R., Katz, K. S., Sicotte, H., and Pruitt, K. D. (2000): NCBI's LocusLink and RefSeq. *Nucleic. Acids. Res.* 28: 126-128.

- McCulloch, V., Seidel-Rogol, B. L., and Shadel, G. S. (2002): A human mitochondrial transcription factor is related to RNA adenine methyltransferases and binds S-adenosylmethionine. *Mol. Cell. Biol.* 22: 1116-1125.
- Mihara, K. (2000): Targeting and insertion of nuclear-encoded preproteins into the mitochondrial outer membrane. *Bioessays* 22: 364-371.
- Mootha, V. K., Bunkenborg, J., Olsen, J. V., Hjerrild, M., Wisniewski, J. R., Stahl, E., Bolouri, M. S., Ray, H. N., Sihag, S., Kamal, M., Patterson, N., Lander, E. S., and Mann, M. (2003): Integrated analysis of protein composition, tissue diversity, and gene regulation in mouse mitochondria. *Cell* 115: 629-640.
- Mootha, V. K., Lepage, P., Miller, K., Bunkenborg, J., Reich, M., Hjerrild, M., Delmonte, T., Villeneuve, A., Sladek, R., Xu, F., Mitchell, G. A., Morin, C., Mann, M., Hudson, T. J., Robinson, B., Rioux, J. D., and Lander, E. S. (2003): Identification of a gene causing human cytochrome c oxidase deficiency by integrative genomics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100: 605-610.
- Musatov, A. F., M.; Dadák, V. (1991): Mitochondriálna cytochrom *c* oxidázia: štruktúra a funkcia. *Biológia* 46: 1113-1125.
- Nargang, F. E., Preuss, M., Neupert, W., and Herrmann, J. M. (2002): The Oxa1 protein forms a homooligomeric complex and is an essential part of the mitochondrial export translocase in *Neurospora crassa*. *J Biol Chem* 277: 12846-12853.
- Neuwald, A. F., Aravind, L., Spouge, J. L., and Koonin, E. V. (1999): AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res.* 9: 27-43.
- Nijtmans, L. G., de Jong, L., Artal Sanz, M., Coates, P. J., Berden, J. A., Back, J. W., Muijsers, A. O., van der Spek, H., and Grivell, L. A. (2000): Prohibitins act as a membrane-bound chaperone for the stabilization of mitochondrial proteins. *Embo J.* 19: 2444-2451.
- Nisoli, E., Clementi, E., Moncada, S., and Carruba, M. O. (2004): Mitochondrial biogenesis as a cellular signaling framework. *Biochem. Pharmacol.* 67: 1-15.
- Ozawa, T., Sako, Y., Sato, M., Kitamura, T., and Umezawa, Y. (2003): A genetic approach to identifying mitochondrial proteins. *Nat. Biotechnol.* 21: 287-293.
- Papadopoulou, L. C., Sue, C. M., Davidson, M. M., Tanji, K., Nishino, I., Sadlock, J. E., Krishna, S., Walker, W., Selby, J., Glerum, D. M., Coster, R. V., Lyon, G., Scalais, E., Lebel, R., Kaplan, P., Shanske, S., De Vivo, D. C., Bonilla, E., Hirano, M., DiMauro, S., and Schon, E. A. (1999): Fatal infantile cardioencephalomyopathy with COX deficiency and mutations in SCO2, a COX assembly gene. *Nat. Genet.* 23: 333-337.

- Pickova, A., Paul, J., Petruzzella, V., and Houstek, J. (2003): Differential expression of ATPAF1 and ATPAF2 genes encoding F(1)-ATPase assembly proteins in mouse tissues. *FEBS Lett.* 551: 42-46.
- Pierce, D. J., Jordan, E. M., and Breen, G. A. (1992): Structural organization of a nuclear gene for the alpha-subunit of the bovine mitochondrial ATP synthase complex. *Biochim.Biophys.Acta* 1132: 265-275.
- Piko, L., and Taylor, K. D. (1987): Amounts of mitochondrial DNA and abundance of some mitochondrial gene transcripts in early mouse embryos. *Dev. Biol.* 123: 364-374.
- Poulton, J., Morten, K., Freeman-Emmerson, C., Potter, C., Sewry, C., Dubowitz, V., Kidd, H., Stephenson, J., Whitehouse, W., Hansen, F. J., and et al. (1994): Deficiency of the human mitochondrial transcription factor h-mtTFA in infantile mitochondrial myopathy is associated with mtDNA depletion. *Hum. Mol. Genet.* 3: 1763-1769.
- Puigserver, P., and Spiegelman, B. M. (2003): Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr. Rev.* 24: 78-90.
- Rabilloud, T., Kieffer, S., Procaccio, V., Louwagie, M., Courchesne, P. L., Patterson, S. D., Martinez, P., Garin, J., and Lunardi, J. (1998): Two-dimensional electrophoresis of human placental mitochondria and protein identification by mass spectrometry: toward a human mitochondrial proteome. *Electrophoresis* 19: 1006-1014.
- Reichert, A., and Neupert, W. (2002): Contact sites between the outer and inner membrane of mitochondria-role in protein transport. *Biochim. Biophys. Acta* 1592: 41.
- Religio, A., Schwager, C., Richter, A., Ansorge, W., and Valcarcel, J. (2002): Optimization of oligonucleotide-based DNA microarrays. *Nucleic. Acids. Res.* 30: e51.
- Robinson, N. C. (1993): Functional binding of cardiolipin to cytochrome c oxidase. *J Bioenerg. Biomembr.* 25: 153-163.
- Rosignol, R., Faustin, B., Rocher, C., Malgat, M., Mazat, J. P., and Letellier, T. (2003): Mitochondrial threshold effects. *Biochem. J.* 370: 751-762.
- Saal, L. H., Troein, C., Vallon-Christersson, J., Gruvberger, S., Borg, A., and Peterson, C. (2002): BioArray Software Environment (BASE): a platform for comprehensive management and analysis of microarray data. *Genome Biol.* 3: SOFTWARE0003.

- Saraste, M. (1999): Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. *Science* 283: 1488-1493.
- Scarpulla, R. C. (2002): Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1576: 1-14.
- Shoffner, J. M. (1996): Maternal inheritance and the evaluation of oxidative phosphorylation diseases. *Lancet* 348: 1283-1288.
- Shoffner, J. M., and Wallace, D. C. (1995): *Oxidative Phosphorylation Diseases*. McGraw-Hill, Inc. Health Profession Division, New York.
- Schagger, H., and Pfeiffer, K. (2000): Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *Embo J.* 19: 1777-1783.
- Scharfe, C., Zaccaria, P., Hoertnagel, K., Jaksch, M., Klopstock, T., Dembowski, M., Lill, R., Prokisch, H., Gerbitz, K. D., Neupert, W., Mewes, H. W., and Meitinger, T. (2000): MITOP, the mitochondrial proteome database: 2000 update. *Nucleic. Acids. Res.* 28: 155-158.
- Scheffler, I. E. (2000): A Century of Mitochondrial Research: Achievements and Perspectives. *Mitochondrion* 1: 3-31.
- Schuelke, M., Smeitink, J., Mariman, E., Loeffen, J., Plecko, B., Trijbels, F., Stockler-Ipsiroglu, S., and van den Heuvel, L. (1999): Mutant NDUFV1 subunit of mitochondrial complex I causes leukodystrophy and myoclonic epilepsy. *Nat. Genet.* 21: 260-261.
- Schwaiger, M., Herzog, V., and Neupert, W. (1987): Characterization of translocation contact sites involved in the import of mitochondrial proteins. *J. Cell. Biol.* 105: 235-246.
- Slonim, D. K. (2002): From patterns to pathways: gene expression data analysis comes of age. *Nat. Genet.* 32 Suppl: 502-508.
- Smeitink, J., van den Heuvel, L., and DiMauro, S. (2001): The genetics and pathology of oxidative phosphorylation. *Nat. Rev. Genet.* 2: 342-352.
- Suzuki, H., Hosokawa, Y., Toda, H., Nishikimi, M., and Ozawa, T. (1990): Common protein-binding sites in the 5'-flanking regions of human genes for cytochrome c1 and ubiquinone-binding protein. *J. Biol. Chem.* 265: 8159-8163.
- Szyrach, G., Ott, M., Bonnefoy, N., Neupert, W., and Herrmann, J. M. (2003): Ribosome binding to the Oxal complex facilitates co-translational protein insertion in mitochondria. *Embo J.* 22: 6448-6457.

- Teraoka, M., Yokoyama, Y., Ninomiya, S., Inoue, C., Yamashita, S., and Seino, Y. (1999): Two novel mutations of SURF1 in Leigh syndrome with cytochrome c oxidase deficiency. *Hum. Genet.* 105: 560-563.
- Thorburn, D. R. (2004): Diverse powerhouses. *Nat. Genet.* 36: 13-14.
- Tiranti, V., Hoertnagel, K., Carrozzo, R., Galimberti, C., Munaro, M., Granatiero, M., Zelante, L., Gasparini, P., Marzella, R., Rocchi, M., Bayona-Bafaluy, M. P., Enriquez, J. A., Uziel, G., Bertini, E., Dionisi-Vici, C., Franco, B., Meitinger, T., and Zeviani, M. (1998): Mutations of SURF-1 in Leigh disease associated with cytochrome c oxidase deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* 63: 1609-1621.
- Tomura, H., Endo, H., Kagawa, Y., and Ohta, S. (1990): Novel regulatory enhancer in the nuclear gene of the human mitochondrial ATP synthase beta-subunit. *J. Biol. Chem.* 265: 6525-6527.
- Tvrdik, P., Kuzela, S., and Houstek, J. (1992): Low translational efficiency of the F1-ATPase beta-subunit mRNA largely accounts for the decreased ATPase content in brown adipose tissue mitochondria. *FEBS Lett.* 313: 23-26.
- Uusimaa, J., Finnila, S., Vainionpaa, L., Karppa, M., Herva, R., Rantala, H., Hassinen, I. E., and Majamaa, K. (2003): A mutation in mitochondrial DNA-encoded cytochrome c oxidase II gene in a child with Alpers-Huttenlocher-like disease. *Pediatrics* 111: e262-268.
- Vale, R. D. (2000): AAA proteins. Lords of the ring. *J. Cell. Biol.* 150: F13-19.
- van Dam, R. M., and Quake, S. R. (2002): Gene expression analysis with universal number arrays. *Genome Res.* 12: 145-152.
- van den Heuvel, L., Ruitenbeek, W., Smeets, R., Gelman-Kohan, Z., Elpeleg, O., Loeffen, J., Trijbels, F., Mariman, E., de Bruijn, D., and Smeitink, J. (1998): Demonstration of a new pathogenic mutation in human complex I deficiency: a 5-bp duplication in the nuclear gene encoding the 18-kD (AQDQ) subunit. *Am. J. Hum. Genet.* 62: 262-268.
- Velculescu, V. E., Zhang, L., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. (1995): Serial analysis of gene expression. *Science* 270: 484-487.
- Virbasius, J. V., and Scarpulla, R. C. (1991): Transcriptional activation through ETS domain binding sites in the cytochrome c oxidase subunit IV gene. *Mol. Cell Biol.* 11: 5631-5638.
- Virbasius, J. V., and Scarpulla, R. C. (1994): Activation of the human mitochondrial transcription factor A gene by nuclear respiratory factors: A potential regulatory link between nuclear and mitochondrial gene expression in organelle biogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 1309-1313.

- Virbasius, J. V., Virbasius, C. A., and Scarpulla, R. C. (1993): Identity of GABP with NRF-2, a multisubunit activator of cytochrome oxidase expression, reveals a cellular role for an ETS domain activator of viral promoters. *Genes Dev.* 7: 380-392.
- Voet, D., and Voet, J. G. (1995): *Biochemistry*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- von Heijne, G., Steppuhn, J., and Herrmann, R. G. (1989): Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides. *Eur. J. Biochem.* 180: 535-545.
- Wallace, D. C. (1992): Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative diseases? *Science* 256: 628-632.
- Wallace, D. C., Zheng, X., Lott, M. T., Shoffner IV, J. M., Hodge, J. A., Kelley, R. I., Epstein, C. M., and Hopkins, L. C. (1988): Familial mitochondrial encephalomyopathy (MERRF): Genetic, pathophysiological, and biochemical characterization of a mitochondrial DNA disease. *Cell* 55: 601-610.
- Wallace, D. C., Singh, G., Lott, M. T., Hodge, J. A., Schurr, T. G., Lezza, A. M., Elsas, L. J., and Nikoskelainen, E. K. (1988): Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* 242: 1427-1430.
- Westermann, B., and Neupert, W. (2003): 'Omics' of the mitochondrion. *Nat. Biotechnol.* 21: 239-240.
- Woodsmall, R. M., and Benson, D. A. (1993): Information resources at the National Center for Biotechnology Information. *Bull. Med. Libr. Assoc.* 81: 282-284.
- Yaffe, M. P. (1999): The machinery of mitochondrial inheritance and behavior. *Science* 283: 1493-1497.
- Yang, Y. H., Dudoit, S., Luu, P., Lin, D. M., Peng, V., Ngai, J., and Speed, T. P. (2002): Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic. Acids. Res.* 30: e15.
- Zaid, A., Li, R., Luciakova, K., Barath, P., Nery, S., and Nelson, B. D. (1999): On the role of the general transcription factor Sp1 in the activation and repression of diverse mammalian oxidative phosphorylation genes. *J. Bioenerg. Biomembr.* 31: 129-135.
- Zhu, Z., Yao, J., Johns, T., Fu, K., De Bie, I., Macmillan, C., Cuthbert, A. P., Newbold, R. F., Wang, J., Chevrette, M., Brown, G. K., Brown, R. M., and Shoubridge, E. A. (1998): SURF1, encoding a factor involved in the biogenesis of cytochrome c oxidase, is mutated in Leigh syndrome. *Nat. Genet.* 20: 337-343.

9. PŘÍLOHY