

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie



Bc. Eliška Holzerová

Molekulární mechanismus produkce reaktivních forem kyslíku u flavinových dehydrogenáz
mitochondriálního respiračního řetězce

Molecular mechanism of reactive oxygen species production by flavin dehydrogenases
of mitochondrial respiratory chain

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Tomáš Mráček, Ph.D.

Praha, 2013

Prohlášení

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

V Praze, 15. 8. 2013

Podpis

Poděkování

Především bych ráda poděkovala svému školiteli panu RNDr. Tomáši Mráčkovi, Ph.D. za neunavné vedení při práci v laboratoři a veškerou psychickou pomoc při zpracování diplomové práce. Také bych ráda poděkovala všem členům laboratoře oddělení Bionergetiky Fyziologického ústavu AV ČR za přátelské a nápomocné prostředí, ve kterém byla radost pracovat. Nakonec bych chtěla také poděkovat všem svým přátelům, díky kterým jsem se dostala až sem, svému příteli za nekonečnou trpělivost a ochotu a své rodině za lásku a péči.

ABSTRAKT

Cílem této práce je odhalit molekulární mechanismus produkce reaktivních forem kyslíku flavinovými dehydrogenázami mitochondriální glycerol-3-fosfát dehydrogenázou (mGPDH) a sukcinát dehydrogenázou (SDH). Obě tyto dehydrogenázy představují důležité zdroje reaktivních forem kyslíku v savčích mitochondriích, ale mechanismus úniku elektronů není zatím dostatečně popsán. Jelikož mechanismy produkce reaktivních forem kyslíku ostatními komplexy dýchacího řetězce jsou charakterizovány lépe, mohou posloužit jako případové studie pro lepší pochopení produkce reaktivních forem kyslíku flavinovými dehydrogenázami, a proto jsou důležité poznatky shrnuty v první části této práce.

Ke studiu produkce reaktivních forem kyslíku izolovanými flavinovými dehydrogenázami jsme jako model používali digitoninem solubilizované mitochondrie z hnědé tukové tkáně potkana. Měření enzymových aktivit, produkce peroxidu vodíku pomocí fluorescence Amplex UltraRed a luminiscence luminolu odhalila flavin, jakožto nejpravděpodobnější místo úniku elektronů u SDH za *in vivo* podmínek, zatímco místo vázající koenzym Q navrhujeme jako místo produkce reaktivních forem kyslíku v případě mGPDH. Odlišný mechanismus této produkce oběma dehydrogenázami je patrný také z indukce reaktivních forem kyslíku vyvolané ferrikyanidem, která je specifická pro mGPDH. Dále jsme pomocí nativních elektroforetických systémů demonstrovali, že mGPDH vytváří homooligomery i vysokomolekulární komplexy, které reprezentují nativní formy mGPDH v membráně. Tímto přístupem je také přímo ukázáno, že izolovaná mGPDH je schopná nejen samostatně, ale i v supramolekulárních komplexech produkovat reaktivní formy kyslíku.

Klíčová slova: detekce reaktivních forem kyslíku v gelu, koenzym Q, mitochondriální glycerol-3-fosfát dehydrogenáza, reaktivní formy kyslíku, sukcinát dehydrogenáza, superkomplexy

ABSTRACT

The aim of this thesis is to investigate molecular mechanism of reactive oxygen species production by flavin dehydrogenases mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase (mGPDH) and succinate dehydrogenase (SDH). Together, they represent important source of reactive oxygen species in mammalian mitochondria, but the mechanism of electron leak is still poorly understood. Because mechanisms of reactive oxygen species production by other complexes of respiratory chain are better characterized, they can serve as case studies to get insight into mechanisms of reactive oxygen species by flavin dehydrogenases. Relevant knowledge is therefore summarized in the first part of the thesis.

To study the production of reactive oxygen species by the isolated flavin dehydrogenases, we used brown adipose tissue mitochondria solubilized by digitonin as a model. Enzyme activity measurements, hydrogen peroxide production studies by Amplex UltraRed fluorescence and luminol luminescence revealed flavin as the most likely source of electron leak in SDH under *in vivo* conditions, while we propose coenzyme Q binding site as the site of reactive oxygen species production in the case of mGPDH. Distinct mechanism of this production by the two dehydrogenases is also apparent from induction of reactive oxygen species generation by ferricyanide which is unique for mGPDH. Furthermore, using native electrophoretic systems, we demonstrated that mGPDH associates into homooligomers as well as high molecular weight complexes, which represent native forms of mGPDH in the membrane. By this approach, we also directly demonstrated that isolated mGPDH itself, as well as its supramolecular assemblies, are all capable of reactive oxygen species production.

Keywords: coenzyme Q, in-gel detection of reactive oxygen species, mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase, reactive oxygen species production, succinate dehydrogenase, supercomplexes

OBSAH

ABSTRAKT	4
ABSTRACT	5
Seznam zkratk.....	9
1 ÚVOD	12
2 LITERÁRNÍ PŘEHLED	14
2.1 Mitochondriální dýchací řetězec a ATP syntáza	14
2.1.1 NADH dehydrogenáza	15
2.1.2 Sukcinát dehydrogenáza	15
2.1.3 Mitochondriální glycerol-3-fosfát dehydrogenáza	16
2.1.4 Další mitochondriální dehydrogenázy.....	17
2.1.5 Koenzym Q.....	17
2.1.6 Ubichinon:cytochrom <i>c</i> oxidoreduktáza.....	18
2.1.7 Cytochrom <i>c</i>	19
2.1.8 Cytochrom <i>c</i> oxidáza	19
2.1.9 ATP syntáza.....	20
2.1.10 Superkomplexy enzymů dýchacího řetězce	20
2.2 Produkce reaktivních forem kyslíku	22
2.2.1 Produkce radikálů komplexem I.....	24
2.2.2 Produkce reaktivních forem kyslíku komplexem III.....	26
2.2.3 Komplex II jako nový producent reaktivních forem kyslíku	27
2.2.4 Mitochondriální glycerol-3-fosfát dehydrogenáza a produkce kyslíkových radikálů	28
2.2.5 Vliv koenzymu Q a superkomplexů	30
2.3 Inhibitory enzymů respiračního řetězce.....	32
2.4 Akceptory elektronů	34

3	MATERIÁL A METODY	36
3.1	Materiál	36
3.1.1	Seznam chemikálií.....	36
3.1.2	Seznam protilátek	37
3.2	Metody	38
3.2.1	Izolace mitochondrií z hnědé tukové tkáně potkana	38
3.2.2	Solubilizace mitochondrií.....	38
3.2.3	Stanovení koncentrace proteinu.....	39
3.2.4	Spektrofotometrické měření enzymových aktivit	39
3.2.5	Fluorimetrické stanovení produkce peroxidu vodíku	39
3.2.6	Detekce peroxidu vodíku pomocí luminiscence.....	40
3.2.7	Separační elektroforetické metody – hrCNE3 elektroforéza.....	40
3.2.8	Separační elektroforetické metody – 10% SDS elektroforéza	41
3.2.9	Elektrotransfer na PVDF membránu – Western blot	42
3.2.10	Specifická imunodetekce proteinů na PVDF membráně.....	42
3.2.11	Produkce reaktivních forem kyslíku v prouzcích gelu	43
3.2.12	Aktivita enzymů v prouzcích gelu.....	43
3.2.13	Měření respirace	43
4	CÍLE	45
5	VÝSLEDKY.....	46
5.1	Charakteristika vlivu jemného detergentu digitoninu na enzymovou aktivitu a integrity dýchacího řetězce	46
5.1.1	Solubilizace mitochondriálních membrán digitoninem vede ke snížení enzymové aktivity u enzymů mGPDH a SDH.....	46
5.2	Produkce reaktivních forem kyslíku u flavinových dehydrogenáz mGPDH a SDH v digitoninem solubilizovaných mitochondriích	51

5.2.1	Produkce reaktivních forem kyslíku digitoninem solubilizovanými proteiny mGPDH a SDH a jejich odlišná odpověď na přidání koenzymu Q.....	51
5.2.2	Produkce reaktivních forem kyslíku vyvolaná jedoelektronovými akceptory .	56
5.2.3	Místem produkce reaktivních forem kyslíku u mGPDH je vazebné místo koenzymu Q	58
5.3	Charakterizace funkčních forem mGPDH	59
5.3.1	Různé funkční formy mGPDH	59
5.3.2	Superkomplexy proteinu mGPDH	60
5.3.3	Produkce reaktivních forem kyslíku izolovaným enzymem	62
6	DISKUSE	64
7	ZÁVĚRY	68
8	SEZNAM LITERATURY	69

Seznam zkratek

I – V	enzymy dýchacího řetězce – komplexy I až V
a, a ₃	cytochromy a ve struktuře komplexu IV
AA	antimycin A
ADP	adenosindifosfát
ATP	adenosintrifosfát
APS	peroxodisíran amonný (<i>ammonium peroxodisulphate</i>)
b _L , b _H	cytochromy b s nízkým (<i>low</i>), respektive vysokým (<i>high</i>) redoxním potenciálem
BSA	hovězí sérový albumin
c ₁	cytochrom c ₁ ve struktuře komplexu IV
cGPDH	cytosolická glycerol-3-fosfát dehydrogenáza
COX	cytochrom c oxidáza
Cu _A , Cu _B	ionty mědi ve struktuře komplexu IV
Cu/ZnSOD	superoxid dismutáza obsahující měď a zinek
cyt	cytochrom
D	dimer
DCPIP	2,6-dichlorfenolindofenol
DH	dehydrogenáza
DHAP	dihydroxyacetonfosfát
Dig	digitonin
e ⁻	elektron
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EGTA	ethylenglycoltetraoctová kyselina
ETF	elektrony přenášející flavoprotein (<i>electron-transferring flavoprotein</i>)
FAD, FADH ₂	flavin adenin dinukleotid oxidovaný, redukovaný
FeCN	ferrikyanid, hexakynoželezitan draselný, K ₃ [Fe(CN) ₆]
FeS	železosírné centrum
FAD/FADH ₂	flavin adenin dinukleotid oxidovaný, redukovaný
FMN	flavin mononukleotid
FUM	fumarát

GP	glycerol-3-fosfát
GK	glycerol kináza
GMP	guanosin monofosfát
H ⁺	proton
HAR	chlorid hexaamminruthenitý, [Ru(NH ₃) ₆]Cl ₃
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethanosulfonová kyselina
hm.	hmotnostní procento
hrCNE3	čistá nativní elektroforéza o vysokém rozlišení (<i>high-resolution Clear Native Electrophoresis, type 3</i>).
HRP	křenová peroxidáza (<i>horseradish peroxidase</i>)
HQNO	2- <i>n</i> -heptyl-4-hydroxychinolin N-oxid
mGPDH	mitochondriální glycerol-3-fosfát dehydrogenáza
MLN	malonát
MnSOD	superoxid dismutáza obsahující mangan
mtDNA	mitochondriální deoxyribonukleová kyselina
MXT	myxothiazol
NAD ⁺ , NADH	nikotinamid dinukleotid oxidovaný, redukovaný
NBT	Nitro Blue tetrazolium
NOS	syntáza oxidu dusného
obj.	objemové procento
P _i	fosfát
PMS	fenazin methosulfát
PVDF	polyvinylidenfluoridová membrána
Q	koenzym Q
Q _D , Q _P	místa vázající koenzym Q v komplexu II
Q _L , Q _O	místa vázající koenzym Q v komplexu III
Q _{OX} , Q [•] , Q _{RED}	stavy koenzymu Q: oxidovaný, semichononový radikál, redukovaný
Rot	rotenon
SDH	sukcinát dehydrogenáza
SDS	sodiumdodecylsulfát
SK	superkomplex
STE	izolační médium – sacharóza, Tris-HCl, EDTA

SUC	sukcinát
T	trimer
TBS	fyziologické medium – Tris-HCl, NaCl
TBST	TBS medium s Tweenem-20
Te	tetramer
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
TTFA	thenoyltrifluoroaceton
UCP1	rozpřahující protein 1 (<i>uncoupling protein 1</i>)

1 ÚVOD

Mitochondrie jsou semiautonomní organely, které lze nalézt téměř v každé buňce eukaryotického organismu. Podle endosymbiotické teorie (Margulis, 1975) vznikly pohlcením prokaryotické buňky buňkou eukaryotickou před 1,5 až 2 miliardami let a mají evoluční původ v α -proteobakteriích (příbuzní rodu *Rickettsia*). Za důkazy této teorie jsou považovány existence dvou membrán, vlastní genetická informace a ribozomy bakteriálního typu. Jedná se tedy o prokaryota, která ztratila schopnost samostatně žít a stala se součástí eukaryotické buňky, kde získala snadný zdroj potravy a zároveň pomohla eukaryotické buňce vyrovnat se s okysličujícím se prostředím. Studie porovnávající mitochondriální a bakteriální genom navíc odhalila neočekávané množství společných primitivních znaků (Gray, 1999), což poskytlo jednoznačný důkaz o původu mitochondriální DNA (mtDNA) z jednoho společného předka.

Mitochondrie jsou považovány za buněčné elektrárny, neboť v buňce představují místo produkce téměř veškeré energie potřebné pro funkci celého organismu. Hrají nezastupitelnou úlohu v energetickém metabolismu, jelikož jsou sídlem procesů jako je aerobní oxidace sacharidů, lipidů a proteinů v Krebsově cyklu, následné využití redukčních ekvivalentů v oxidační fosforylaci, při níž vzniká makroergní sloučenina ATP, oxidace aminokyselin, biosyntéza hemu, některých fosfolipidů a koenzymu Q, molekuly zodpovědné za přenos elektronů v rámci dýchacího řetězce. Mitochondrie se však podílí i na komplexnějších procesech jako je regulace vápníkové homeostázy, buněčná diferenciace, apoptóza, ale i kontrola buněčného cyklu a proliferace (McBride *et al.*, 2006). Ve specializovaných tkáních mohou plnit i velmi specifické úkoly. Například mitochondrie hnědé tukové tkáně jsou schopny produkce tepla tzv. netřesovou termogenezi díky rozpráhujícímu proteinu UCP1 (*uncoupling protein 1*), který dokáže energii uloženou v elektrochemickém gradientu protonů uvolnit ve formě tepla.

Tradičně jsou mitochondrie zobrazovány jako oválné útvary s udávanou velikostí 0,5 – 1 μm , avšak ve skutečnosti v buňce vytvářejí velmi dynamickou síť schopnou fúze a opětovného rozdělení (Hoppins *et al.*, 2007) a zabírají přibližně pětinu celého jejího objemu (McBride *et al.*, 2006). Mají dvě membrány – vnější a vnitřní, které mezi sebou uzavírají mezimembránový prostor o podobném složení jako cytosol, jelikož vnější membrána propouští i relativně velké molekuly do 10 kDa. Vnitřní membrána pak ohraničuje prostor zvaný matrix, který se ještě dále dělí na část v kristách vnitřní membrány a mimo ně. Kristy

jsou tvořeny záhyby vnitřní mitochondriální membrány, na jejíchž okrajích se nacházejí dimery ATP syntázy (Davies *et al.*, 2011). Struktura krist je velmi dynamická, podle potřeby mohou zanikat a zase vznikat (Perkins, 2001). Obecně plocha krist závisí na metabolické aktivitě konkrétní buňky, jelikož zvětšuje prostor pro umístění enzymů oxidační fosforylace.

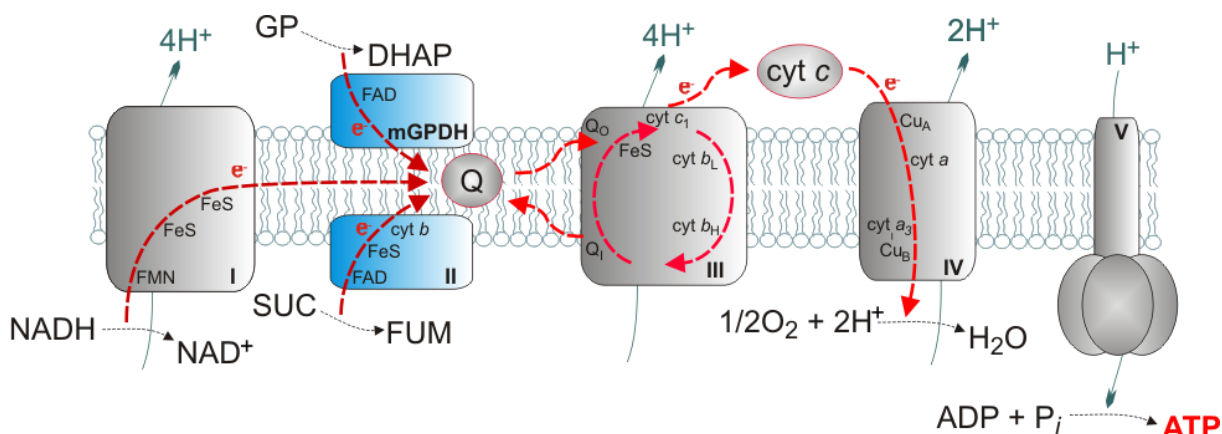
V matrix lidských mitochondrií se nachází mitochondriální DNA o 16 569 párech bazí kódující 13 podjednotek proteinů dýchacího řetězce, 22 transferových RNA a dvě ribozomální RNA. Relativně nízký obsah kódující DNA svědčí o přesunu genů z mitochondriální do jaderné DNA. Jelikož mtDNA téměř neobsahuje nekódující oblasti, prakticky každá mutace v mtDNA se projevuje na fenotypu jedince, často jako onemocnění. Konkrétní fenotyp a intenzitu projevu je však těžké odhadnout, jelikož mtDNA se v buňce vyskytuje ve více kopiích a ty se dělí do dceřinných buněk náhodně. Pro manifestaci defektu musí množství poškozené mtDNA překročit určitý limit („*threshold*“) a navíc vždy záleží na energetických nárocích dané tkáně (Dogan a Trifunovic, 2011). Kromě toho se mtDNA dědí maternálně. Veškeré mitochondriální poruchy zahrnující jak mutace v mtDNA, tak mutace v jaderně kódovaných genech pro mitochondriální proteiny, představují jedny z nejčastějších vrozených vad s četností asi 1 ku 5000 (Schon *et al.*, 2012). Nejčastěji zasaženými tkáněmi jsou mozek a kosterní svaly, proto hovoříme o „mitochondriálních encefalomyopatiích“ (Shapira *et al.*, 1977). Závažnými onemocněními spojenými s mutací v mtDNA jsou např. LHON – Leberova dědičná optická neuropatie; MERRF – progresivní vrozená mitochondriální encefalomyopatie; MELAS – mitochondriální encefalomyopatie, laktátová acidóza a příhody podobné záchvatům mrtvice; NARP – neurogení svalová ochablost s ataxií a pigmentací sítnice.

V důsledku některých poruch, ale i za fyziologického stavu je mitochondriální dýchací řetězec považován za hlavního producenta reaktivních forem kyslíku v eukaryotických buňkách. Kromě dvou tradičních zdrojů těchto molekul – komplexu I a III – existuje i celá řada dalších enzymů zodpovědných za tvorbu kyslíkových radikálů. V poslední době se ukázalo, že výrazný podíl mohou mít i flavinové dehydrogenázy, které přispívají elektrony do dýchacího řetězce, a to mitochondriální glycerol-3-fosfát dehydrogenáza, sukcinát dehydrogenáza nebo ETF:ubichinon oxidoreduktáza.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Mitochondriální dýchací řetězec a ATP syntáza

Dýchací řetězec se nachází ve vnitřní mitochondriální membráně a skládá se ze čtyř velkých proteinových komplexů a několika dalších proteinů. Elektrony pocházející ze substrátů jsou do řetězce dodávány pomocí redukovaných přenašečů NADH a FADH₂ skrz komplex I, II, mitochondriální glycerol-3-fosfát dehydrogenázu, či jiné dehydrogenázy v závislosti na typu buňky. Elektrony jsou pak přeneseny na komplex III pomocí koenzymu Q v membráně a následně na komplex IV pomocí cytochromu *c*, který se nachází v mezimembránovém prostoru. Uvnitř komplexu IV jsou 2 elektrony spojeny s dvěma protony a molekulou kyslíku za vzniku molekuly vody. V průběhu celého tohoto přenosu navíc dochází k transferu protonů z matrix mitochondrií do mezimembránového prostoru přes komplexy I, III a IV a energie takto vzniklého protonového gradientu je pak využita pro syntézu ATP z ADP a fosfátu ATP syntázou.



Obrázek 1: Mitochondriální dýchací řetězec

Schematické zobrazení enzymů dýchacího řetězce a ATP syntázy ve vnitřní mitochondriální membráně s mobilními přenašeči, typickými katalyzovanými reakcemi a místy v enzymech podílejících se na transportu elektronů. V horní části obrázku je mezimembránový prostor, ve spodní matrix mitochondrií.

I – V – komplexy I až V; ADP – adenosindifosfát; ATP – adenosintrifosfát; cyt *b*, *b_L*, *b_H*, *c₁*, *a*, *a₃* – jednotlivé cytochromy v komplexech; cyt *c* – cytochrom *c*; Cu_A, Cu_B – ionty mědi; DHAP – dihydroxyacetonfosfát; e⁻ - elektron; FeS – železosírné centrum; FAD – flavin adenin dinukleotid; FMN – flavin mononukleotid; FUM – fumarát; GP – glycerol-3-fosfát; H⁺ - proton; mGPDH – mitochondriální glycerol-3-fosfát dehydrogenáza; NAD⁺/NADH – nikotinamindinukleotid; P_i – anorganický fosfát; Q – koenzym Q; Q₀, Q_I – místa vázající koenzym Q; SUC – sukcinát

2.1.1 NADH dehydrogenáza

Komplex I (EC 1.6.5.3) je největším proteinovým komplexem dýchacího řetězce. Skládá se z více než 45 podjednotek a dosahuje velikosti 1000 kDa. Strukturní složitost je jedním z důvodů, proč byla jeho krystalová struktura odhalena teprve nedávno (Baradaran *et al.*, 2013). Sedm podjednotek je kódováno přímo mtDNA, zbylé pak pocházejí z jaderného genomu. Obsahuje železosírná centra (FeS) (Nelson a Cox, 2005) a molekulu flavin mononukleotidu (FMN), takže jej můžeme řadit mezi metaloproteiny a flavoproteiny. Elektrony procházejí po spádu zvyšujícího se redoxního potenciálu.

Reakce katalyzovaná komplexem I umožňuje odebrání elektronů z NADH, který pochází z různých míst metabolismu a do matrix mitochondrií se dostává buď pomocí malát-aspartátového člunku, nebo je v nich přímo vytvářen. Elektrony z NADH redukují FMN, z něž jsou následně předány na první FeS centrum. Skrz další FeS centra jsou přeneseny až na místo, které váže koenzym Q, a zde jej také redukují.

Energie vytvořená transportem 2 elektronů umožňuje mechanické pumpování čtyř protonů komplexem I do mezimembránového prostoru změnou konformace jednoho z helixů transmembránové části (Hunte *et al.*, 2010).

2.1.2 Sukcinát dehydrogenáza

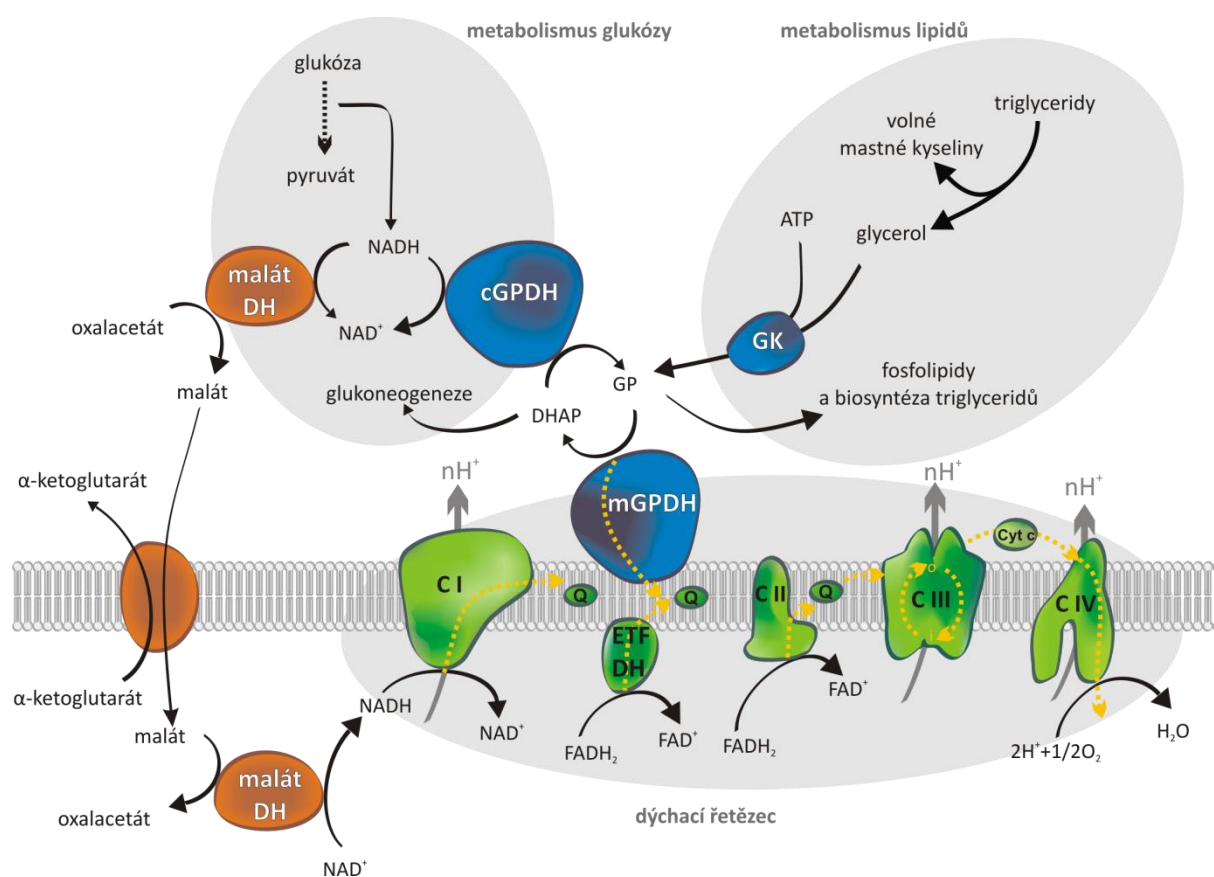
Komplex II (EC 1.3.99.1) je první flavinovou dehydrogenázou studovanou v této práci. Tento enzym propojuje dýchací řetězec s Krebsovým cyklem. Je to zároveň jediný enzym Krebsova cyklu vázaný na membránu. Sukcinát dehydrogenáza (SDH) sestává ze 4 podjednotek, z nichž jsou všechny kódovány jadernou DNA. Jako kofaktor obsahuje flavin adenin dinukleotid (FAD), který přímo přenáší redukční ekvivalenty pocházející právě z Krebsova cyklu do dýchacího řetězce.

Sukcinát dehydrogenáza obsahuje dva hydrofilní proteiny – flavoprotein (podjednotka A) a železosírný protein (B), dva transmembránové proteiny (C a D) a celkem čtyři prostetické skupiny (Sun *et al.*, 2005), které přenášejí elektrony ze sukcinátu, jenž mění na fumarát, na koenzym Q v membráně. Ukázalo se, že komplex II obsahuje dvě místa vázající koenzym Q – tzv. proximální (Q_P) na matrixové straně a distální (Q_D) v blízkosti mezimembránového prostoru (Oyedotun, 2001). Mezi těmito místy se nachází hem *b*, který může zachytávat elektrony, pokud nejsou dostatečně rychle odčerpávány na koenzym Q,

a bránit tak jejich úniku (Yankovskaya, 2003). I přesto, že SDH prochází skrz membránu, nedochází zde k transportu protonů, jelikož přenos elektronů komplexem II negeneruje dostatečný rozdíl v redoxním potenciálu. Komplex II tedy nepřispívá ke vzniku protonového gradientu.

2.1.3 Mitochondriální glycerol-3-fosfát dehydrogenáza

mGPDH (EC 1.1.5.3) jako druhá zde zkoumaná flavinová dehydrogenáza je specializovaná dehydrogenáza nacházející se ve zvýšeném množství v hnědé tukové tkáni (Housteck *et al.*, 1975) a v létacím svalu hmyzu (Sacktor a Cochran, 1958). V menší míře pak také v dalších tkáních: β -buňkách slinivky břišní (Ishihara *et al.*, 1996, Meglasson *et al.*, 1989), mozku



Obrázek 2: Role mGPDH v metabolismu; upraveno dle Mráček *et al.* (2013)

mGPDH je místem, kde se setkává dýchací řetězec s metabolismem glukózy skrz glycerolfosfátový člunek a s metabolismem lipidů skrz glycerol kinázu, která fosforyluje glycerol pocházející z lipolýzy. DH – dehydrogenáza; cGPDH – cytosolická GPDH; GK – glycerol kináza

(Cottingham a Ragan, 1980), srdečním svalu (Scholz *et al.*, 1997), placentě (Swierczynski *et al.*, 1976), buňkách varlat (MacDonald a Brown, 1996) a ve fibroblastech (Chretien *et al.*, 1994). Exprese genu pro tento protein může být také uměle vyvolána pomocí hormonů štítné žlázy a glukokortikoidů (Wilson a McMurray, 1981). Jedná se o malý protein o velikosti 74 kDa, který se vyskytuje jako dimer, trimer, tetramer a tvoří také vysokomolekulární komplex, nejspíše homooligomer.

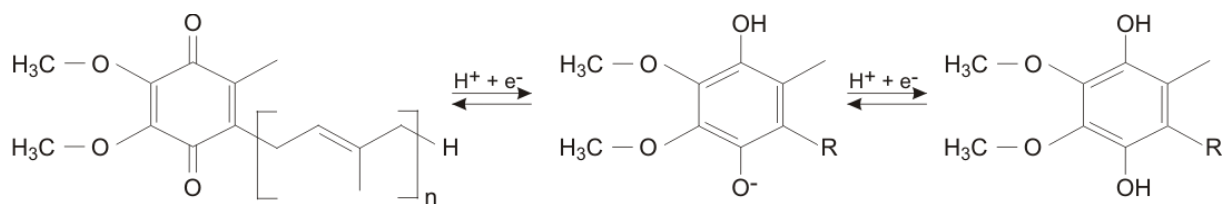
mGPDH je zodpovědná za přenos redukčních ekvivalentů z metabolismu glukózy pomocí tzv. glycerolfosfátového člunku, v němž má mGPDH cytosolického partnera – cytosolickou glycerol-3-fosfát dehydrogenázu. Tento systém dokáže využít energii uloženou do NADH při poruše komplexu I a zároveň propojuje dýchací řetězec s metabolismem lipidů (viz obrázek 2Obrázek 2). Substrátem mGPDH je glycerol-3-fosfát, jehož elektrony jsou předávány na FAD místo enzymu, které pak odebírá koenzym Q za současné produkce dihydroxyaceton fosfátu. Cytosolická GPDH katalyzuje opačnou reakci, což vede k cyklování a funkci člunku. Ani u mGPDH nedochází k přenosu protonů, navíc tento enzym nejspíše neprochází skrz vnitřní mitochondriální membránu (Yeh *et al.*, 2008).

2.1.4 Další mitochondriální dehydrogenázy

V závislosti na typu a stavu buňky lze nalézt i další dehydrogenázy, které jsou schopné přenosu energie pocházející z různých drah metabolismu do dýchacího řetězce a umožňují tak její využití v podobě výsledné molekuly ATP. Jednou z nejvýznamnějších dehydrogenáz je například membránová ETF:ubichinon oxidoreduktáza, která dokáže přijímat elektrony pocházející z β -oxidace mastných kyselin (Nelson a Cox, 2005).

2.1.5 Koenzym Q

Koenzym Q je malá hydrofobní molekula nacházející se především ve vnitřní mitochondriální membráně, ale i jiných buněčných membránách. Strukturně se jedná o benzochinonové jádro s dvěma navázanými methoxy skupinami, jedním methylem a příslušným počtem izoprenových podjednotek, které udělají koenzymu jeho hydrofobicitu. U člověka má koenzym Q 10 isoprenových podjednotek, u hlodavců 9. Může nabývat tří redoxních stavů redukcí kyslíků benzochinonu, který se tím mění na benzochinol. Hovoříme pak o oxidovaném ubichinonu, semichinonu a redukovaném ubichinolu.



Obrázek 3: Oxidační stavy koenzymu Q

Koenzym Q může nabývat tří redoxních stavů v závislosti na množství přijatých elektronů a protonů. n představuje počet 6 až 10 izoprenových jednotek.

Koenzym Q působí také jako významný antioxidant, jelikož snadno váže volné elektrony a chrání tak buňku před vznikem volných radikálů. Právě takto se může uplatňovat především v jiných buněčných membránách, ale i mitochondriích.

2.1.6 Ubichinon:cytochrom *c* oxidoreduktáza

Komplex III (EC 1.10.2.2) je místem, které odebírá elektrony z koenzymu Q a všechny je přenáší na cytochrom *c*, další mobilní přenašeč. Komplex III se skládá z 11 podjednotek, přičemž pouze jedna je mitochondriálně kódovaná a obvykle funguje jako dimer nezávislých monomerů. Tento dimer dosahuje velikosti asi 480 kDa (Capaldi, 1982) a obsahuje cytochrom *c*₁, železosírné centrum zvané Rieskeho protein a dva cytochromy *b* – s nízkým (*b*_L) a vysokým (*b*_H) redoxním potenciálem.

Elektrony z koenzymu Q procházejí tzv. Q cyklem, při kterém navíc dochází současně i k přenosu protonů skrz membránu a vzniku protonového gradientu. Koenzym Q přináší 2 elektrony, avšak cytochrom *c* je umí odebírat pouze po jednom, proto jsou komplexem III rozděleny. Po oxidaci molekuly koenzymu QH₂ na Q v tzv. Q_I místě komplexu jsou protony uvolněny do mezimembránového prostoru a jeden elektron prochází Rieskeho proteinem a cytochromem *c*₁, než je odebrán volným cytochromem *c*. Druhý se pak přes cytochromy *b*_L a *b*_H vrací v tzv. Q_O místě na molekulu koenzymu Q a vytváří z ní semichinononový radikál Q^{•-} (Nelson a Cox, 2005), který čeká na další procházející elektron a přijímá 2 protony z matrix mitochondrií za vzniku QH₂. Na posun 2 elektronů řetězcem jsou tedy čerpány celkově čtyři protony přes membránu.

2.1.7 Cytochrom *c*

Cytochrom *c* je druhý mobilní přenašeč elektronů v dýchacím řetězci. Na rozdíl od koenzymu Q se nachází v mezimembránovém prostoru a dokáže přenášet pouze jeden elektron, který transportuje z komplexu III na komplex IV. V blízkosti vnitřní membrány je udržován pomocí elektrostatických sil díky speciálnímu uspořádání fosfolipidů membrány. Strukturně se jedná o malý solubilní protein s molekulovou hmotností kolem 12,5 kDa a stejně jako ostatní cytochromy obsahuje prostetickou skupinu hemu s porfyrinovým kruhem, který ve svém středu váže ion železa.

Cytochrom *c* hraje významnou roli v programované buněčné smrti. Jeho uvolnění do cytoplasmy z mezimembránového prostoru vede ke spouštění signalizace vedoucí k apoptóze buňky.

2.1.8 Cytochrom *c* oxidáza

Komplex IV (EC 1.9.3.1) je místem konečného zužitkování elektronů, jsou zde přeneseny na molekulu kyslíku za vzniku molekuly vody. Cytochrom *c* oxidáza (COX) se skládá ze 13 podjednotek, 3 největší a nejhydrofobnější (COX1, 2, 3) jsou kódovány mtDNA. Přibližná velikost enzymu COX je 200 kDa.

Souhrnná reakce katalyzovaná enzymem je:



Na celý proces je tedy potřeba 4 molekul cytochromu *c*, jež každá přenese 1 elektron od komplexu III. Z matrix mitochondrií je odebráno 8 protonů, přičemž 4 jsou využity pro syntézu vody (tzv. chemické protony) a zbylé 4 jsou pak pumpovány skrz membránu za vzniku protonového gradientu (Nelson a Cox, 2005).

COX obsahuje 2 hemy, tzv. hem a_3 a hem a a dva ionty mědi: Cu_A a Cu_B (Froncisz *et al.*, 1979, Van Gelder a Beinert, 1969). Konkrétně pak jsou elektrony odebírány na vnější straně membrány, putují přes ion Cu_A a hem a až do reakčního centra obsahujícího hem a_3 a ion Cu_B . Po redukci tohoto centra prvními 2 elektrony je zde navázána molekula kyslíku O_2 , která je dále redukována dalšími dvěma přicházejícími elektrony, a vznik vody je dokončen vstupem 4 chemických protonů z matrix. Čtyři „pumpované“ protony procházejí hydrofobními kanály v blízkosti aktivního centra enzymu. Dvě vzniklé molekuly vody jsou pak z reakčního centra uvolněny.

2.1.9 ATP syntáza

Komplex V (EC 3.6.3.14) je konečným enzymem, který využívá energii protonového gradientu vzniklou v dýchacím řetězci k syntéze ATP z ADP a fosfátu. ATP syntáza pak společně s komplexy elektron transportního řetězce vytváří systém oxidační fosforylace.

Komplex V se skládá ze dvou velkých subkomplexů: relativně konzervované hydrofilní F_1 části a transmembránové F_0 části. Celkem je tvořena 17 různými podjednotkami, z nichž 6 tvoří katalytickou F_1 část (α , β , γ , δ , ϵ a IF_1) a zbylých 10 se nachází v membránově vázané F_0 části (a, b, c, d, e, f, g, A6L, F6, OSCP a DAPIT). Obě části jsou pak spojeny dvěma stonky: centrálním (podjednotka γ , δ , ϵ) a periferním (OSCP, b, d a F6). Savčí enzym dosahuje velikosti 670 kDa a pouze 2 podjednotky jsou kódovány přímo v mitochondriích (a a A6L) (Collinson *et al.*, 1994, Stock *et al.*, 1999).

ATP syntáza funguje jako mechanický molekulární motor. Protony vstupují do polokanálu v podjednotce a, následně jsou navázány na aminokyselinový zbytek podjednotky c, která se tak stává lipofilní, což způsobuje otáčení prstence c podjednotek. Počet c podjednotek v prstenci závisí na typu organismu. Protony jsou pak po protočení cyklu uvolněny druhým polokanálem v a podjednotce v důsledku spádu koncentračního gradientu protonů. Otáčení c podjednotek v membráně je mechanicky přenášeno γ podjednotkou na heterohexamer $\alpha_3\beta_3$, který je naopak proti protáčení chráněn periferním stonkem. Každý $\alpha\beta$ dimer obsahuje na styku podjednotek katalytické centrum pro syntézu ATP, které je součástí β podjednotky. V závislosti na konkrétním vztahu γ podjednotky a $\alpha\beta$ dimeru rozeznáváme 3 konformační stavy. Nejprve jsou navázány substráty ADP a fosfát, po změně konformace dojde k jejich syntéze a po další změně konformace je molekula ATP uvolněna. Třetí změna konformace tak vede k obnově původního stavu.

2.1.10 Superkomplexy enzymů dýchacího řetězce

V posledních letech se objevuje stále více důkazů o existenci superkomplexů, tedy uspořádání jednotlivých enzymů dýchacího řetězce do vyšších makromolekulárních celků (Acin-Perez *et al.*, 2008, Schagger, 2002). Složení superkomplexů je v současné době intenzivně zkoumáno. Obvykle se studie shodují na spojení komplexu I, III a IV, konkrétní složení se ale v rámci studií liší ve stechiometrických poměrech mezi komplexy i v jejich stabilitě (Wittig *et al.*, 2006, Dudkina *et al.*, 2008, Heide *et al.*, 2012). Obsah superkomplexů závisí na konkrétních

energetických potřebách buňky a na zdroji uhlíku pro reakce. V membráně také dochází k jejich dynamické přestavbě, jelikož v buňce koexistují s enzymy izolovanými (Lapiente-Brun *et al.*, 2013). Významem superkomplexů je především rychlé a přímé předávání substrátů, v tomto případě koenzymu Q a cytochromu *c*. Avšak superkomplexy hrají roli i v regulaci produkce reaktivních forem kyslíku, jelikož mohou bránit interakci s kyslíkem ať už stericky, nebo rychlým vysokoafinitním přenosem elektronů z komplexu I a dále pak z koenzymu Q na komplex III.

Do složení superkomplexů se obvykle nezahrnuje komplex II ani mGPDH, jsou považovány za alternativní vstupy elektronů do dýchacího řetězce (Dudkina *et al.*, 2008). Důkazy účasti flavinových dehydrogenáz v určitých typech vysokomolekulárních komplexů však existují, jako například možnost vyizolování superkomplexů schopných respirace po použití pouze sukcinátu jako substrátu (Acin-Perez *et al.*, 2008). Nebo také pozorovaná asociace enzymů oxidace mastných kyselin a dýchacího řetězce (Wang *et al.*, 2010). A v neposlední řadě kvasinkový model tzv. dehydrogenasomu, kterého se účastní i analog mGPDH (Grandier-Vazeille *et al.*, 2001), přičemž tento kvasinkový enzym tvoří dimery a analog SDH trimerní struktury v bakteriálních membránách (Sousa *et al.*, 2011)

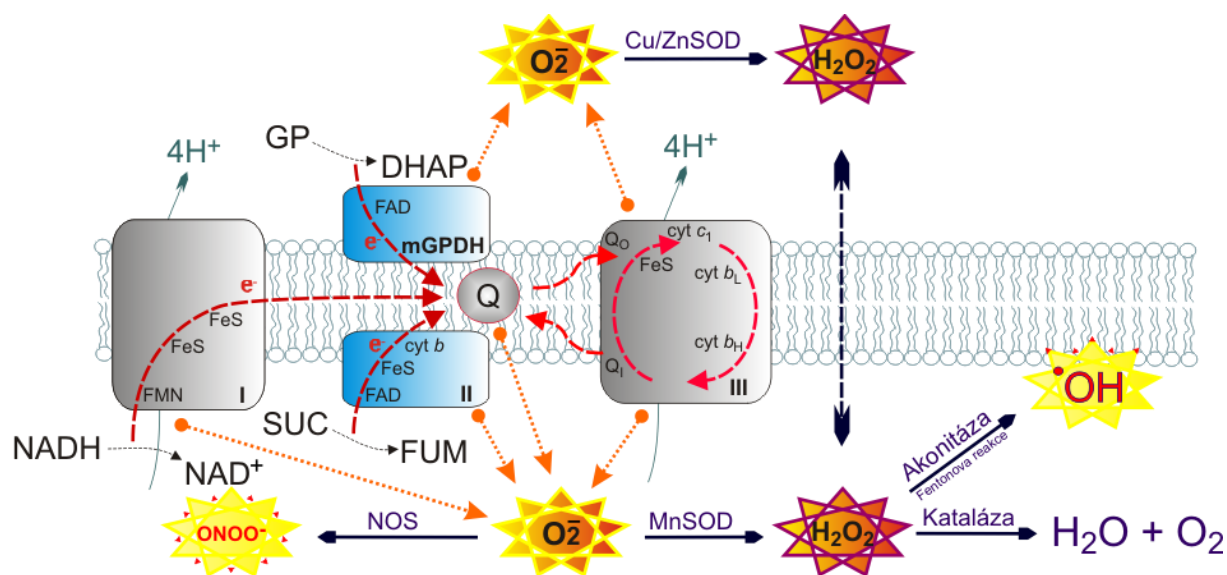
Konkrétní složení superkomplexů enzymů dýchacího řetězce je otázkou dalších pokusů. Velmi kritickým bodem v jejich charakterizaci je především solubilizace, tedy izolace z membrány za dostatečně jemných podmínek. Navíc pozornost byla prozatím věnována především superkomplexům tvořených enzymy dýchacího řetězce, avšak v mitochondriích existuje celá řada dalších proteinů a mohlo by docházet i k asociaci například s proteiny Krebsova cyklu.

2.2 Produkce reaktivních forem kyslíku

O reaktivních formách kyslíku se začalo hovořit už před téměř 60 lety (Harman, 1956), v souvislosti s objevem, že až 2 % kyslíku procházejícího dýchacím řetězcem mohou být přeměněna v superoxidový radikálový anion ($O_2^{\bullet-}$) přijetím volného nepárového elektronu, který se uvolnil z některého místa dýchacího řetězce. Za takovéto místo byl tradičně považován komplex I a komplex III, postupně se zjistilo, že v mitochondriích existuje asi desítky proteinů schopných přispívat k tvorbě kyslíkových radikálů.

Přes všechna tato pozorování se objevují i tvrzení, že za fyziologických podmínek k tvorbě kyslíkových radikálů téměř nedochází (Staniek a Nohl, 2000), jelikož dle jiných měření pouze 0,15 % z celkového elektronového toku vedlo ke vzniku peroxidu vodíku při oxidaci palmitoyl karnitinu – substrátu produkujícího NADH pro komplex I (St-Pierre, 2002). Otázkou tedy zůstává, co je artefaktem měření a jak vysoká je skutečná fyziologická produkce superoxidu.

Buňka se přirozeně reaktivním molekulám brání. Superoxid je reaktivní kyslíkový radikál, má krátkou životnost a je odstraňován abundantními proteiny superoxid dismutázami, obsahujícími ion manganu nebo ionty mědi a zinku (MnSOD a Cu/ZnSOD);



Obrázek 4: Proteiny dýchacího řetězce zodpovědné za produkci reaktivních molekul a jejich vzájemné vztahy

Na produkci reaktivních forem kyslíku se podílejí enzymy dýchacího řetězce komplex I, II, III a mGPDH. K produkci dochází na obě strany membrány. Vzniká superoxidový radikál ($O_2^{\bullet-}$), který je dále přeměňován v následných reakcích (více viz text).

(McCord a Fridovic, 1969), přeměnou v nereaktivní peroxid vodíku. Ten však může být rozštěpen na nebezpečný hydroxylový radikál ($\cdot\text{OH}$), pokud není rychle přeměněn na molekulu vody a kyslíku katalázou (Radi *et al.*, 1991). Vznik $\cdot\text{OH}$ radikálu je buď samovolný, nebo katalyzovaný přítomností měďnatého nebo železnatého kationtu v tzv. Fentonově reakci. Na rychlém odstranění H_2O_2 se podílí i thioredoxinové a peroxiredoxinové systémy za pomoci molekuly glutathionu. Kromě zmíněných enzymů přispívají k odstraňování volných kyslíkových radikálů též látky zvané antioxidanty, mezi které patří například N-acetyl cystein, α -tokoferol nebo vitamín C a E.

Superoxid může také být syntázou oxidu dusnatého (NOS) sloučen s radikálem oxidu dusnatého $\cdot\text{NO}$ za vzniku reaktivního peroxynitritu ($\text{ONOO}\cdot$) a následně dalších reaktivních druhů dusíku.

Důvod zájmu o produkci reaktivních forem kyslíku je jejich možná úloha ve stárnutí organismu. Je nezpochybnitelné, že vysoce reaktivní molekuly mohou narušovat integritu buňky, a tak i homeostázu celého organismu. Stále více se však mluví i o jejich signalizační funkci, jelikož zvýšený výskyt těchto molekul poukazuje v buňce na problém. Mohlo by se jednat o adaptaci buňky na jejich výskyt a jejich účinné využití. Harmanova teorie volných radikálů poukazovala na spojení těchto radikálů se zvýšeným množstvím mutací v mtDNA, a tím způsobené stárnutí. Konkrétní pokusy na myším modelu tuto spojitost potvrdily (Kokoszka *et al.*, 2001, Kujoth *et al.*, 2005), ale i vyvrátily (Trifunovic *et al.*, 2004, Vermulst *et al.*, 2007). Jelikož mitochondriální genom nemá histony zajišťující ochranu, ani dostatečně účinné opravné mechanismy (Larsen *et al.*, 2005, Yakes a VanHouten, 1997), mutace se v genomu hromadí. To vede ke zvyšujícímu se počtu mutací v genech pro podjednotky dýchacího řetězce, které jsou pak v důsledku těchto chyb náchylnější k uvolňování elektronů, tedy produkci superoxidu (Hiona a Leeuwenburgh, 2008). Jednotlivé experimentální přístupy pak často simulují patofyziologický stav buňky vyskytující se u mitochondriálních chorob, což může napomoci k pochopení problému vzniku a významu kyslíkových radikálů.

V oblasti signalizačního využití radikálů byl prvním velkým objevem důkaz, že $\cdot\text{OH}$ radikál dokáže stimulovat guanylát cyklázu, a tím ovlivňovat signalizaci pomocí druhých posílů, konkrétně cyklického GMP (Mittal a Murad, 1977). Také bylo ukázáno, že oxidativní stres může cíleně ovlivňovat konkrétní tryptofan v podjednotce α ATP syntázy. Protože je tento enzym klíčový pro funkci organismu, je hlídán i jeho redoxní stav. Oxidace tryptofanu je nevratná, tudíž funguje jako „marker“ pro mitochondriální proteiny kontrolující kvalitu

systému, což vyvolá zvýšenou obměnu proteinu dříve, než dojde k zasažení citlivějších komponent (Rexroth *et al.*, 2012).

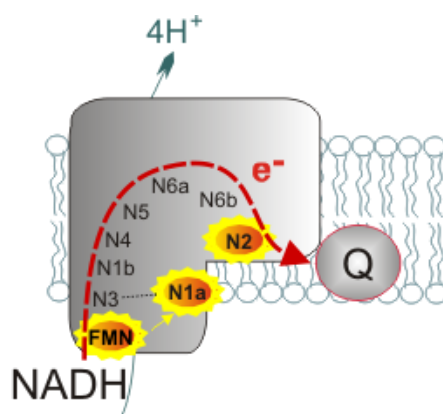
Otázka významu kyslíkových radikálů tedy zůstává otevřena dalšímu zkoumání. V této práci bude ukázáno, jak k jejich vzniku mohou přispívat dvě flavinové dehydrogenázy dýchacího řetězce – SDH a mGPDH. Avšak nejdříve bude teoreticky shrnuto, jak probíhá tato produkce u všech komponent elektrontransportního řetězce, protože existují různé možnosti. Principiálně se ale opakují a ze znalosti produkce u ostatních enzymů lze vyvozovat analogické závěry mechanismu produkce u flavinových dehydrogenáz, na něž se tato práce zaměřuje.

2.2.1 Produkce radikálů komplexem I

NADH dehydrogenáza je největším a nejsložitějším enzymem dýchacího řetězce. Stále existuje několik navrhovaných míst produkce kyslíkových radikálů, protože elektrony vstupují přes flavin mononukleotid a poté pokračují přes sedm železosírných center až do místa vázajícího koenzym Q (viz obrázek 5). Na tomto přenosu se přímo podílí 14 podjednotek komplexu (Hirst, 2010). I kvůli složitosti enzymu bylo navrženo, že intenzita produkce superoxidu je ovlivněna velikostí protonového gradientu, poměry NADH/NAD⁺ a QH₂/Q, aktuální lokální koncentrací kyslíku a rozdílem pH na obou stranách membrány (Murphy, 2009, Lambert a Brand, 2004).

Superoxid produkovaný pouze směrem do matrix mitochondrií (Muller, 2004) se může uvolňovat z místa vázajícího koenzym Q, a to přímo z nejbližšího FeS centra (N2 centrum), které je poslední v řetězci těchto center a jehož redoxní potenciál je závislý na pH. Toto FeS centrum se nachází blízko rozhraní enzymu mezi membránovou a periferní částí a má nejmenší sterickou ochranu okolím enzymu (Ohnishi, 1998). Možnost tvorby superoxidu v Q vazebném místě byla potvrzena měřeními využívajícími analogy koenzymu Q (Genova *et al.*, 2001) a inhibitory komplexu I (Fato *et al.*, 2009). Avšak produkce superoxidu byla pozorována i u kvasinkového mutanta, který neobsahuje toto konkrétní železosírné centrum (Galkin, 2005). Proto bylo i dalšími skupinami navrženo, že místo produkce reaktivních forem kyslíku u komplexu I je jiné FeS centrum (N1a), které leží mimo řetězec železosírných center vedoucí od substrátu elektronů až po akceptor, tudíž může elektrony odebírat, pokud je komplex přesycen (Kushnareva *et al.*, 2002). Dále byl navržen také flavin, tedy místo vstupu

elektronů do komplexu (Esterhazy *et al.*, 2008, Kussmaul a Hirst, 2006). Teorie poukazující na flavin nebo N2 místo se ovšem nevylučují, nejspíše záleží na konkrétních experimentálních podmínkách (Ohnishi *et al.*, 2010). Bylo totiž zjištěno, že FMN je zodpovědný za tvorbu kyslíkových radikálů při izolaci komplexu I, a především po narušení možnosti jeho interakce s komplexem III, zatímco N2 FeS centrum bylo označeno jako producent superoxidu v neporušených membránových partikulích (Maranzana *et al.*, 2013). Jiná práce ukazuje, že redukovaný flavin produkuje především peroxid vodíku, protože je schopný přenést až 2 elektrony na kyslík, zatímco FeS centrum u vazebného místa koenzymu Q je náchylnější spíše k jednoelektronovým přenosům na kyslík a produkci superoxidu (Grivennikova a Vinogradov, 2013). Kromě toho je flavinová produkce ovlivněna redoxním stavem NAD, zatímco produkce v Q vazebném místě spíše protonmotivní silou a redoxní stavem koenzymu Q (Treberg *et al.*, 2011).



Obrázek 5: Schematické znázornění jednotlivých míst přenášejících elektrony u NADH dehydrogenázy

Na transportu elektronů komplexem I se podílí flavin mononukleotid (FMN) a jednotlivá železosírná centra (N1a, N1b, N3, N4, N5, N6a, N6b a N2). Místa FMN, N1a a N2 byla označena za možné producenty kyslíkových radikálů tímto enzymem.

V neposlední řadě lze produkci superoxidu komplexem I experimentálně zvýšit zablokováním dýchacího řetězce, například odstraněním cytochromu *c* (Kushnareva *et al.*, 2002). Dalším často pozorovaným jevem je tzv. zpětný tok elektronů, kdy při nadbytku sukcinátu a výskytu nadměrného množství NAD^+ dochází k přenosu elektronů zpět z komplexu II na komplex I, avšak pouze pokud je dýchací řetězec přesycen nebo zablokován. Bylo prokázáno, že k takovéto tvorbě superoxidu komplexem I dochází i za velmi nízkých koncentrací substrátů, i substrátu samotného komplexu I, zásadní je

především výskyt NAD^+ . Tyto podmínky jsou blízké normálnímu stavu buňky a produkce pomocí zpětného toku elektronů je považována za největší příspěvek k produkci superoxidu mitochondriemi (Muller *et al.*, 2008).

2.2.2 Produkce reaktivních forem kyslíku komplexem III

V komplexu III dochází ke složité cirkulaci elektronů, jelikož je potřeba rozdělit dvouelektronový přenos na jedoelektronový. Tento tzv. Q cyklus (popsán v kapitole 2.1.6) je tím pádem velmi náchylný k uvolňování elektronů. Na vstupu elektronů do komplexu III v tzv. Q_O místě vzniká při prvotní jedoelektronové oxidaci přechodný semichinonový radikál $\cdot\text{QH}$, který je považován za hlavní zdroj superoxidu (Turrens *et al.*, 1985, Boveris *et al.*, 1976). Jeho vznik byl pozorován při zablokování Q_I místa antimycinem A, protože poté nedochází k odčerpávání elektronů a následuje hromadění semichinonu na vstupu (St-Pierre, 2002, Raha *et al.*, 2000), a při narušení funkce Q_O místa (Muller *et al.*, 2002) nebo při narušení vstupu koenzymu Q v Q_O místě, jelikož zde hraje roli jejich oxidačně redukční vztah a též složení fosfolipidů membrány (Gille a Nohl, 2001). Jako místo úniku elektronů ze semichinonu bylo navrženo konkrétně buď okolí cytochromu b_L , nebo přímo místo Q_O (Zhang *et al.*, 1998), a to i bez přítomnosti semichinonového radikálu (Starkov a Fiskum, 2001). Mutace v konzervovaném tyrosinu cytochromu b_L zvyšuje produkci kyslíkových radikálů komplexem III (Lee *et al.*, 2011), přičemž je však tato produkce výrazně ovlivňována redoxními stavy cytochromů b v komplexu (Quinlan *et al.*, 2011) a membránovým potenciálem (Rottenberg *et al.*, 2009), jelikož obojí má vliv na rychlost „protáčení“ Q cyklu. V neposlední řadě hraje roli i přítomnost komplexu III v superkomplexech (Lanciano *et al.*, 2013). Ostatní komponenty dýchacího řetězce mají totiž protektivní vliv a zabraňují produkci superoxidu. To vše může hrát roli i *in vivo*. Pozorován byl také vliv redoxního stavu koenzymu Q v membráně za přítomnosti antimycinu A a inhibitorů komplexu II na zvýšení produkce reaktivních forem kyslíku (Drose a Brandt, 2008). Všechny tyto práce vyvolávají otázku, zda se jedná o dopřednou nebo zpětnou produkci, tedy zda daný „náchylný“ semichinon vzniká spíše ztrátou nebo přijetím elektronu. Prozatím se zdá pravděpodobnější tzv. reverzní tvorba semichinonu (Bleier a Drose, 2012).

Přidání inhibitorů působících v Q_O místě, jako je myxothiazol a stigmatelin, nevedlo k výraznému zvýšení produkce superoxidu, naopak v kombinaci s antimycinem A došlo spíše

ke snížení produkce, jelikož bylo zabráněno vzniku dalšího semichinonu v důsledku zpomalení Q cyklu. Po odstranění matrixové superoxid dismutázy (MnSOD) z tohoto systému však ke zvýšení detekované produkce superoxidu došlo, jelikož se začal tvořit semichinon naopak v Q_i místě komplexu III. Tato produkce není fyziologicky relevantní, jelikož v živém systému je MnSOD přítomna vždy (Raha *et al.*, 2000).

Přestože místo produkce superoxidu – semichinon v Q_o místě komplexu III – se nachází velmi blízko mezimembránovému prostoru, bylo změřeno, že se superoxid pocházející pouze z komplexu III dostává na obě strany vnitřní mitochondriální membrány (Muller, 2004), konkrétně se pak při inhibici antimycinem A jednalo o 70 % na matrixové straně a 30 % mezi membránami (Miwa a Brand, 2005). Superoxid jakožto nabitá molekula membránou procházet nemůže, toho je schopen pouze peroxid vodíku (Han *et al.*, 2001), s čímž souvisí, že peroxid vodíku hromadí se v krstách mezimembránového prostoru by v důsledku prosté difúze unikl do matrix nebo do cytosolu, kde by mohl plnit signální funkci (Bleier a Drose, 2012). Bylo také navrženo, že by se na obě strany membrány mohl dostávat protonovaný superoxid HO₂[•], který by přímo v membráně vznikl a po opuštění lipidového prostoru by ihned reagoval (Muller, 2004). Jiným mechanismem vedoucím k výskytu superoxidu na obou stranách membrány je únik semichinonu z Q_o místa tzv. hydrofobním tunelem, jenž uvolňuje semichinon do lipidického prostředí v membráně, a ten pak může opět směřovat k oběma stranám membrány a až poté reagovat s kyslíkem (Han *et al.*, 2003).

2.2.3 Komplex II jako nový producent reaktivních forem kyslíku

Sukcinát dehydrogenáza nikdy nebyla považována za významného producenta reaktivních forem kyslíku s výjimkou některých pozorovaných případů patofyziologických mutací v podjednotkách B, C a D tohoto enzymu (Slane, 2006). Oxidativní stres vzniklý mutací komplexu II například prokazatelně zkracuje život *Caenorhabditis elegans* (Ishii *et al.*, 1998). Místem produkce bylo navrženo proximální vazebné místo koenzymu Q, a to především za přítomnosti semichinonu (Guo, 2003). Předpokládalo se, že většina superoxidu produkovaná za fyziologických podmínek mitochondriemi využívajícími jako substrát sukcinát, pochází pouze ze zpětného toku elektronů, a producentem je tedy komplex I (viz 2.2.1).

Měření na izolovaném enzymu ale ukázala, že i redukované centrum FAD může být zodpovědné za vznik superoxidu, pokud nejsou elektrony ihned odebrány (Zhang *et al.*, 1998). Nedávná studie navíc prokázala, že při použití velmi nízké koncentrace substrátu, která je blízká fyziologické koncentraci, je produkce superoxidu komplexem II velmi významná a má vliv i na produkci ostatními enzymy dýchacího řetězce (Quinlan *et al.*, 2012). Tato práce sice znovu potvrzuje tvorbu peroxidu vodíku komplexem I v důsledku reverzního toku elektronů, ale po přidání jak inhibitoru komplexu I rotenonu, tak inhibitoru komplexu III myxothiazolu stále existuje detekovatelné množství reaktivních forem kyslíku, jejichž zdrojem je komplex II. Relativně velké množství produkovaného superoxidu nebo peroxidu vodíku je zde naměřeno v důsledku dopředné reakce, kdy elektrony pocházejí od substrátu, ale i ze zpětné reakce, kdy elektrony pocházejí z redukovaných molekul koenzymu Q, což může být dle autorů relevantní *in vivo* při přesycení řetězce a nedostatečném odčerpávání redukovaného koenzymu Q. Měření využívající různé kombinace inhibitorů komplexu II pak označila za konkrétní zdroj kyslíkových radikálů flavin v komplexu II, avšak pouze pokud je místo vázající substrát prázdné, což je pozorovatelné při použití nízké koncentrace substrátu a ne saturační koncentrace, která se pro pokusy běžně využívá. Flavin, ale i Q vazebné místo byly navrženy jako místa produkce kyslíkových radikálů i u škrkavky *Ascaris suum* (Paranagama *et al.*, 2010).

V návaznosti bylo ukázáno, že ani reverzní tok elektronů z komplexu II na komplex I nemá takový význam, jako se předpokládalo (Moreno-Sanchez *et al.*, 2013). Naopak při přidání inhibitoru komplexu I rotenonu nebyl u mitochondrií využívajících sukcinát jako substrát pozorován žádný pokles produkce kyslíkových radikálů, naopak u některých vzorků dokonce došlo k jejich nárůstu. Rozdíl oproti jiným měřením je v absenci inhibitorů komplexů III a IV, za takových podmínek jsou pak redoxní centra komplexu II producenty reaktivních forem kyslíku. Při inhibici místa vázajícího koenzym Q je flavin komplexu II schopen produkovat reaktivní formy kyslíku tak, že přibližně v 75 % se jedná o peroxid vodíku, zbývajících 25 % připadá na superoxidový radikál (Siebels a Drose, 2013).

2.2.4 Mitochondriální glycerol-3-fosfát dehydrogenáza a produkce kyslíkových radikálů

Mitochondriální glycerol-3-fosfát dehydrogenáza vykazuje značnou tkáňově specifickou expresi (viz 2.1.3), což také může vést i ke tkáňově specifickému výskytu kyslíkových

radikálů, na jejichž produkci se mGPDH podílí. To bylo změřeno jak u potkana v hnědé tukové tkáni (Drahota *et al.*, 2002), tak u trijodtyroninem stimulovaných jater potkana (Jesina *et al.*, 2004) a i u tkáni s relativně nízkým obsahem mGPDH (Mráček *et al.*, 2009), ale i u *Drosophila melanogaster* (Miwa a Brand, 2005). Glycerol-3-fosfát dehydrogenáza byla označena jako velmi náchylná k takovéto produkci (Vrbacky *et al.*, 2007), což může být v důsledku výskytu malé sterické ochrany, jelikož mGPDH ani její kvasinkový analog (Grandier-Vazeille *et al.*, 2001) nebyly zatím detekovány v interakci s dalšími enzymy dýchacího řetězce za vzniku superkomplexů, které mohou mít protektivní účinky (viz 2.2.5). Významné hodnoty produkce byly naměřeny především při zablokování transportu elektronů dýchacím řetězcem inhibitory komplexu III, k čemuž může dojít i u různých patologií při defektech ostatních enzymů nebo přesycení dýchacího řetězce (Vrbacky *et al.*, 2007, Mráček *et al.*, 2009).

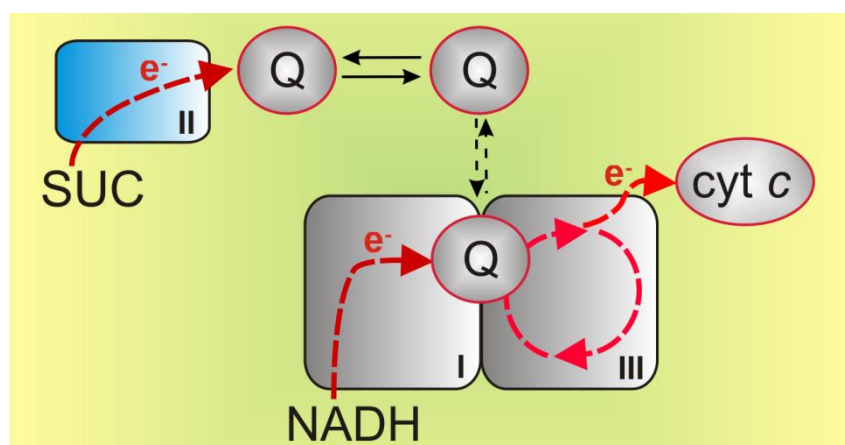
Produkce reaktivních forem kyslíku u mGPDH vykazuje několik specifických aspektů. Ačkoli se enzym nachází především na vnější straně a nejspíš neprochází skrz membránu (Yeh *et al.*, 2008), byla pozorována produkce superoxidu na obě strany membrány, a to téměř srovnatelně (Miwa a Brand, 2005). Dochází zde také ke stimulaci produkce kyslíkových radikálů jedoelektronovým akceptorem ferrikyanidem, která nebyla pozorovaná u komplexu I ani II (Drahota *et al.*, 2002). Navíc se zdá, že mGPDH neobsahuje žádná železosírná centra podílející se na transportu elektronů. Proto nejspíše jediným místem schopným přijímat a odevzdávat elektrony je flavin v N koncové části proteinu, přičemž dle navrženého mechanismu by zde mělo docházet ke střídání substrátu glycerol-3-fosfátu a akceptoru koenzymu Q (Yeh *et al.*, 2008, Mracek *et al.*, 2013).

Dle nejnovější studie (Orr *et al.*, 2012) závisí produkce superoxidu mGPDH na koncentraci substrátu, vápenatých iontů a redoxním stavu koenzymu Q. Jako místo produkce je zde místo vázající koenzym Q, což je v souladu s navrženým flavinem, ale také částečně i samotný koenzym Q ve formě semichinonu. Avšak dle této práce část produkce superoxidu pocházejícího z mitochondrií využívajících glycerol-3-fosfát jako jediný substrát pochází z komplexu II, jelikož došlo k jeho částečnému poklesu po použití inhibitorů komplexu II. Bylo zde ukázáno, že i u savčích mitochondrií dochází k produkci superoxidu na obě strany membrány a navrženo, že by zde mohlo docházet k některému z mechanismů, které se předpokládají u komplexu III (viz 2.2.2).

2.2.5 Vliv koenzymu Q a superkomplexů

Předchozí poznatky se zaměřují na roli enzymů dýchacího řetězce v produkci reaktivních forem kyslíku. Pozornost je však zaměřena především na jednotlivé izolované proteiny. Několika příklady však bylo naznačeno, že produkce radikálů je ovlivněna přítomným koenzymem Q, ale také interakcí s ostatními proteiny řetězce.

Bylo navrženo, že by veškerá zásoba koenzymu Q v membráně mohla být rozdělena do dvou oddělených částí (Lenaz *et al.*, 2007). Jedna část by se nacházela v prostředí superkomplexu a druhá část molekul koenzymu Q by se volně pohybovala ve zbytku membrány. Jednotlivé molekuly by se pak mohly vzájemně vyměňovat za stálého udržování rovnováhy. Komplex II by interagoval s volně dostupnou částí molekul koenzymu Q. Podobně by mohl fungovat i přenos elektronů z mGPDH. Navíc se zdá, že stupeň asociace koenzymu Q s membránovými proteiny, ať už v superkomplexech, nebo ne, má také vliv na množství produkovaného superoxidu (Lass a Sohal, 1999).



Obrázek 6: Navržený výskyt molekul koenzymu Q v membráně

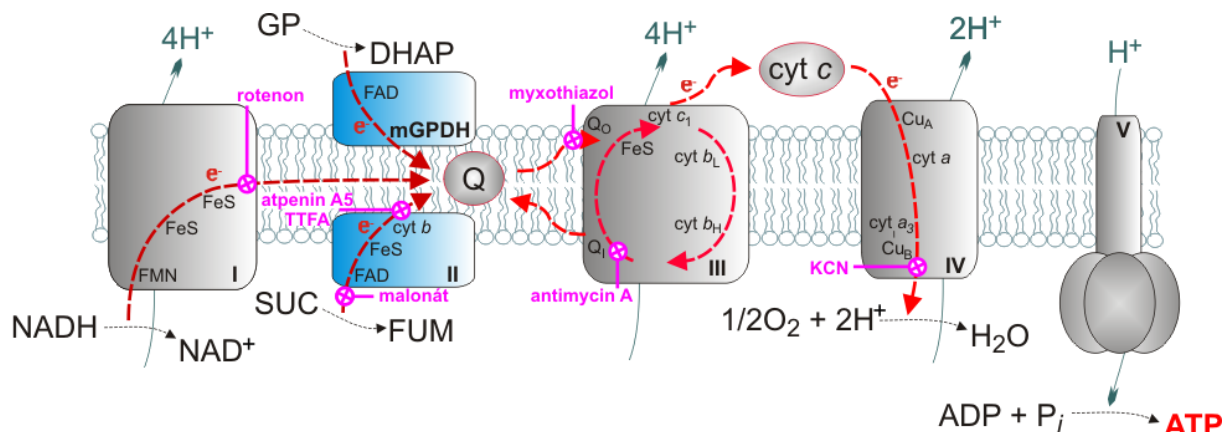
V superkomplexech (zde zobrazeno jako těsná vazba komplexů I a III) se nachází část molekul koenzymu Q, které jsou s okolním prostředím membrány vyměňovány za udržování rovnováhy. K této „volné“ skupině molekul pak má přístup sukcinát dehydrogenáza, případně i ostatní enzymy nenacházející se v superkomplexech.

Koenzym Q v každém případě hraje roli v produkci reaktivních forem kyslíku. To ukazuje dále i tato práce. Jak přesně se tohoto mechanismu účastní není zcela jasné, jelikož může být vázán na rozdílné molekuly, přesto je schopen přijímat elektrony a dál je přenášet. Proč se tedy nenacházejí v superkomplexech všechny proteiny? Problémem není jen

různorodost enzymů, ale také zvolených modelů, experimentálních přístupů, především pak zachování dostatečně nativních podmínek zároveň vhodných pro měření.

2.3 Inhibitory enzymů respiračního řetězce

Jelikož je v této práci využíváno hned několik inhibitorů, které působí na různých místech komplexů dýchacího řetězce, následující odstavce se pokouší jejich funkci přiblížit a stručně vysvětlit.



Obrázek 7: Schematické znázornění míst působení inhibitorů dýchacího řetězce

Na enzymy dýchacího řetězce působí celá řada inhibitorů. Zde jsou znázorněny inhibitory, které jsou dále v práci zmiňovány. Konkrétně na komplex I působí rotenon, na komplex II atpenin A5, TTFA a malonát, na komplex III myxothiazol a antimycin A a na komplex IV KCN (více viz text).

Rotenon je přírodní inhibitor, používá se jako insekticid a pesticid, jelikož velmi specificky dokáže inhibovat funkci komplexu I, a tím způsobovat otravu organismu. Konkrétně dochází k inhibici přenosu elektronů z FeS centra enzymu na koenzym Q, tudíž redukční ekvivalenty pocházející z metabolismu nemohou být využity k tvorbě ATP. Jelikož působí až na samotném konci cesty elektronů skrz komplex I, dokáže také inhibovat zpětný tok elektronů a tedy možnost produkce kyslíkových radikálů tímto enzymem.

Inhibitorů komplexu II bylo v této práci využito hned několik, a to **atpenin A5**, **malonát** a thenoyltrifluoroaceton neboli **TTFA**. Atpenin A5 i TTFA mimikují tvar molekuly koenzymu Q, váží se do Q vazebného místa, čímž brání vazbě koenzymu Q a přenosu elektronů dál do dýchacího řetězce (Miyadera *et al.*, 2003). Naopak malonát je učebnicovým příkladem kompetitivního inhibitoru, který je analogem substrátu daného enzymu. Malonát obsahuje pouze o jednu CH₂ skupinu méně než sukcinát.

Na komplex III může také působit několik různých inhibitorů. V této práci jsou využity dva z nich. Zatímco **myxothiazol** působí na vstupu elektronů, v tzv. Q₀ místě,

antimycin A působí naopak v místě, kde elektrony komplex III opouštějí při návratu na koenzym Q, v tzv. Q_I místě.

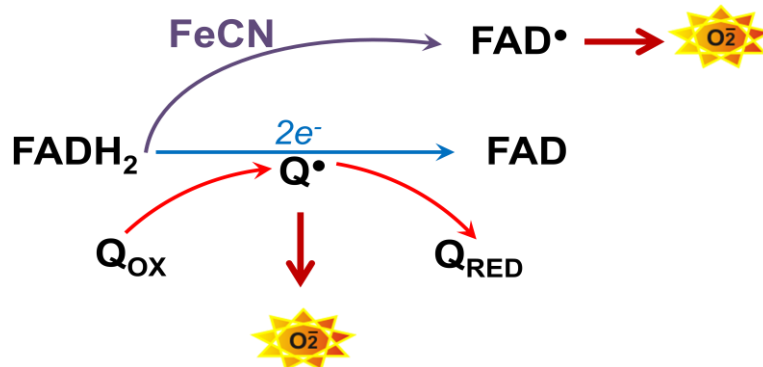
Komplex IV je inhibován kyanidem draselným (**KCN**). Jedná se o velmi prudký jed vonící po mandlích. V těle se rozpadá a CN⁻ ionty působí na trojmocné železo Fe³⁺, což ihned blokuje dýchací řetězec a vede k otravě organismu v důsledku tkáňové hypoxie.

V neposlední řadě byl v této práci použit také obecný kompetitivní inhibitor 2-*n*-heptyl-4-hydroxychinolin N-oxid (**HQNO**), který se váže do míst vázající koenzym Q u enzymů dýchacího řetězce, jelikož strukturně mimikuje tvar molekuly koenzymu Q (Kogut a Lightbown, 1962).

2.4 Akceptory elektronů

Kromě koenzymu Q a cytochromu *c* existuje i řada dalších, často arteficiálních akceptorů elektronů využívaných při studiu enzymové kinetiky. V této práci byly použity ferrikyanid (hexakynoželezitan draselný; $K_3[Fe(CN)_6]$; zkr. FeCN), chlorid hexaamminruthenitý ($[Ru(NH_3)_6]Cl_3$; HAR), 2,6-dichlorfenolindofenol (DCPIP), fenazin methosulfát (PMS) a také hydrofilní koenzym Q_1 .

Ferrikyanid je komplexní sloučenina železa, obvykle se používá k výrobě barviv. Po přidání ke vzorku mitochondrií funguje jako nízkoafinitní jedoelektronový akceptor (Vinogradov *et al.*, 1975). V případě mGPDH indukuje tvorbu reaktivních forem kyslíku (Drahota *et al.*, 2002). Od komplexů I a II sice FeCN elektrony odebírá, ale na tvorbu radikálů u těchto enzymů nemá jeho přidání do roztoku vliv. Otázkou však zůstává, jak přesně dochází k indukci produkce kyslíkových radikálů u mGPDH. Na schématu (obrázek 8) jsou znázorněny dvě možnosti: FeCN může interagovat buď přímo s flavinem enzymu, odebírat jeden z elektronů pocházející od substrátu a umožňovat uvolnění druhého za přímého vzniku radikálu; nebo může docházet k částečné redukci koenzymu Q na semichinon, jenž následně elektron uvolní.



Obrázek 8: Produkce reaktivních forem kyslíku enzymem mGPDH v důsledku působení FeCN

K produkci superoxidu v důsledku přidání FeCN může docházet buď pomocí flavinového radikálu nebo v důsledku vzniku semichinonu.

Tři stavy koenzymu Q: Q_{OX} – oxidovaný; $Q \cdot$ – semichinonový radikál; Q_{RED} – redukovaný

Jedoelektronový akceptor **HAR** je jednoduchá molekula obsahující centrální atom ruthenia s šesti navázanými aminoskupinami. HAR se stejně jako FeCN využívá ke studiu aktivity enzymů, konkrétně komplexu I (Sled a Vinogradov, 1993). Je tedy možné, že dokáže

s vysokou afinitou vyvazovat veškeré volné elektrony nebo je dokonce odebírat ze všech ostatních míst, nejen na enzimech, ale i přímo od FeCN.

DCPIP je další, ve vodě rozpustný jednoelektronový akceptor. Výhodou této molekuly je, že při redukci elektronem mění barvu z modré až po bezbarvý roztok. Jeho redukce tak může být detekována spektrofotometricky, což se využívá při měření enzymových aktivit (Hatefi a Stiggall, 1978). Strukturně se jedná o dvě propojená benzenová jádra se zbytky, takže má jistou podobnost s přírodním koenzymem Q, přijímá však elektrony nejen z enzymů, ale spíše přímo z koenzymu Q.

PMS je elektronový akceptor, jehož oxidovaná forma má žlutou barvu, redukovaný je bezbarvý. Využívá se pro studium enzymové aktivity sukcinát dehydrogenázy (Nachlas *et al.*, 1960). Je snadno oxidován kyslíkem, tudíž může působit jako přenašeč elektronů od enzymu na kyslík. Také se používá pro redukci cytochromu *c* pro další experimenty.

Koenzym Q₁ jakožto komerčně dostupná forma koenzymu Q má tu výhodu, že se díky krátkému hydrofobnímu zbytku snadno rozpouští ve vodných roztocích, přičemž simuluje funkci přírodního koenzymu Q v solubilizovaných vzorcích.

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Materiál

3.1.1 Seznam chemikálií

Obvyklé laboratorní chemikálie jako anorganické soli, kyseliny či zásady nejsou zahrnuty v seznamu a byly zakoupeny u výrobců Sigma (USA) nebo Lachema (ČR). Všechny použité chemikálie byly alespoň čistoty *p. a.*

6-aminohexanová kyselina (Sigma, USA)	HRP (křenová peroxidáza; Sigma, USA)
Amplex UltraRed (Life Technologies, USA)	Imidazol (Sigma, USA)
Antimycin A (Sigma, USA)	Koenzym Q ₁ (Sigma, USA)
Bradfordové činidlo (Bio-Rad, USA)	Laktino sušené mléko (Promil, Slovensko)
BSA (hovězí sérový albumin; Sigma, USA)	Luminol (Sigma, USA)
Coomassie Brilliant Blue R-250 (SERVA, Německo)	Manitol (Sigma, USA)
Cytochrom <i>c</i> z hovězího srdce (Sigma, USA)	Methanol (Penta, ČR)
DCPIP (Sigma, USA)	Myxothiazol (Sigma, USA)
Digitonin (Sigma, USA)	NBT (Nitro Blue tetrazolium; SERVA, Německo)
EDTA (ethylendiamintetraoctová kyselina; Sigma, USA)	Peroxodisíran amonný (Bio-Rad, USA)
EGTA (ethylenglycoltetraoctová kyselina; Sigma, USA)	PMS (Sigma, USA)
FeCN (Sigma, USA)	Ponceau S (Sigma, USA)
Glycerol-3-fosfát (Sigma, USA)	Rotenon (Sigma, USA)
H ₂ O ₂ (Sigma, USA)	Sacharóza (Sigma, USA)
HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethanosulfonová kyselina; Sigma, USA)	SDS (sodiumdodecylsulfát; SERVA, Německo)
	Standard molekulové hmotnosti (<i>HMW Calibration Kit for Native Electrophoresis</i> , Amersham, UK)
	Sukcinát sodný (Sigma, USA)

TEMED (N,N,N',N'-
tetramethylethyldiamin SERVA,
Německo)

Tris-HCl (Sigma, USA)
Tween-20 (Sigma, USA)

3.1.2 Seznam protilátek

Primární protilátky

Proti antigenu (enzym)	Katalogové číslo	Výrobce	Ředění	Typ protilátky
SDHA (komplex II)	ab14715	Abcam, UK	1:2000	myší monoklonální
mGPDH	(Mracek <i>et al.</i> , 2005)		1:2000	králičí polyklonální
Blue Native OXPHOS Complexes Detection Kit (komplexy I až V)	ab110412	Abcam, UK	1:250	myší monoklonální

Sekundární protilátky konjugované s fluorescenční značkou:

Alexa Fluor 680, *goat anti-mouse* IgG A21058, Life Technologies, USA

IR Dye 800, *goat anti-rabbit* IgG Rockland, USA

Ředění 1:3000 v TBST

3.2 Metody

3.2.1 Izolace mitochondrií z hnědé tukové tkáně potkana

Ke všem pokusům byly používáni potkani kmene Wistar (chov Fyziologického Ústavu AV ČR) staří jeden až tři týdny. Zvířata byla chována při pokojové teplotě za režimu 12 hodin světlo, 12 hodin tma se stálým přístupem ke standardní laboratorní potravě a vodě. Zvířata byla usmrcena v CO₂ narkóze. Práce byla vedena ve shodě se Směrnicí Evropské unie 2010/63/EU pro pokusy na zvířatech.

Mitochondrie byly izolovány v STE mediu (250 mM sacharóza, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 7,4) s přidaným albuminem z hovězího séra (10 mg/ml BSA). Očištěná a nastříhaná tkáň byla homogenizována (teflon-sklo, 300 rpm, 10 tahů), centrifugována (10 minut 13 000 g) pro separaci lipidů přítomných ve vzorku. Sediment byl rehomogenizován a mitochondrie byly následně získány ze supernatantu po stočení 10 minut při otáčkách 800 g a 10 minut 13 000 g dle postupu diferenciální centrifugace (Cannon a Lindberg, 1979). Následně byly ještě přečištěny opakovaným točením při 13 000 g 10 minut a zamrazeny v -80 °C. Vše probíhalo na ledu, k centrifugaci byla využita chlazená (4 °C) centrifuga Sigma 3K18 s rotory Sigma 19 776, 11 133 a 12 131 (Sartorius, Německo).

3.2.2 Solubilizace mitochondrií

Ve všech experimentech byly využívány rozmražené mitochondrie. Membránové proteiny byly solubilizovány v Pufri A (50 mM NaCl, 50 mM imidazol, 2 mM 6-aminohexanová kyselina, 1 mM EDTA; pH 7,0) pro elektroforézy nebo v H mediu (210 mM manitol, 70 mM sacharóza, 5 mM HEPES, 1 mM EGTA; pH 7,2) pro měření produkce kyslíkových radikálů, enzymových aktivit a spotřeby kyslíku. 1 mg alikvoty byly zbaveny původního media (10 minut 20 000 g), které bylo nahrazeno 100 µl příslušného nového media a k resuspendované peletě byl přidán detergent – 20% (hm.) digitonin (1 až 8 g detergentu/g proteinu). Solubilizace probíhala 10 minut na ledu a byla zastavena centrifugací 20 minut při otáčkách 20 000 g, při které došlo k oddělení frakcí supernatantu a sedimentu. Následně byla stanovena koncentrace proteinu. Ke vzorkům pro nativní elektroforézu bylo poté přidáno 2,5 µl 0,1% (hm.) Ponceau S s 50% (obj.) glycerolem a 5 µl 50% (obj.) glycerolu. Barva neinteraguje se vzorkem, pouze umožňuje sledování postupu čela vzorků gelem. Použita centrifuga a rotor Sigma stejně jako v kapitole 3.2.1.

3.2.3 Stanovení koncentrace proteinu

Koncentrace proteinu byla měřena spektrofotometricky metodou Bradfordové (Bradford, 1976) v polystyrenových kyvetách (1 cm). Spektrofotometr BioPhotometer (Eppendorf, Německo) byl před každým měřením kalibrován pomocí BSA o koncentraci 0,2 mg/ml tak, že bylo v 1 ml vody 0 až 100 μ l tohoto zásobního roztoku. Vzorky byly měřeny též v 1 ml vody. Vzorky mitochondrií bez detergentu byly navíc před měřením sonikovány se 20% amplitudou 20 vteřin (Bandelin, SONOPLUS, Francie). Ke každému standardu i vzorku bylo přidáno 250 μ l činidla Bradfordové (Bio-Rad, USA) a roztok byl promíchán. Po 2 minutách byla změřena absorbance při 595 nm. Koncentrace proteinu ve vzorku pak byla odečtena z kalibrační přímky standardu.

3.2.4 Spektrofotometrické měření enzymových aktivit

Enzymové aktivity byly měřeny v polystyrenových kyvetách (1 cm) na spektrofotometru SHIMADZU UV-2450 (Shimadzu, Japonsko). Všechna měření byla provedena v mediu obsahujícím 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1 mg/ml BSA, 1 mM KCN při pH 7,4 za konstantní teploty 30 °C.

Do media byl přidán sledovaný fluorofor: 50 μ M cytochrom *c*, 100 μ M 2,6-dichlorofenolindofenol nebo 25 μ M koenzym Q₁. Aktivity pak byly spočítány jako relativní změna absorbance fluoroforu za minutu na gram proteinu ($\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$): cytochrom *c* měřen při 550 nm ($\epsilon_{550} = 19,6 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), DCPIP při 610 nm ($\epsilon_{610} = 20,1 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) a koenzym Q₁ při 275 nm ($\epsilon_{275} = 13,6 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Do roztoku bylo přidáno 100 μ g vzorku, případně zvyšující se koncentrace koenzymu Q a reakce byla spuštěna přidáním 10 mM substrátu – glycerol-3-fosfátu (GP) nebo sukcinátu (SUC).

3.2.5 Fluorimetrické stanovení produkce peroxidu vodíku

Produkce peroxidu vodíku (H₂O₂) byla stanovena fluorometricky jako změna fluorescence Amplex UltraRed. Oxidace této molekuly je spojena s redukcí H₂O₂ pomocí křenové peroxidázy (HRP, *horseradish peroxidase*). Měření probíhá v 96-jamkové destičce, kde je připraveno 50 μ l draselného media (120 mM KCl, 3 mM HEPES, 5 mM KH₂PO₄, 3 mM MgSO₄, 1 mM EGTA; pH 7,2) se substráty (10 mM GP a SUC nebo 0,4 mM SUC)

a inhibitory (1 μM myxothiazol (MXT), 1 μM atpenin A5 nebo 10 μM HQNO) nebo 12 μM koenzym Q₁. Následně je přidáno 25 μl roztoku Amplex UltraRed (50 μM) s HRP (1 U/ml) v draselném mediu a reakce je spuštěna 25 μl roztoku obsahujícího 15 μg proteinu. Od každé reakce bylo odečteno pozadí stejného složení, kdy 25 μl mitochondrií bylo nahrazeno 25 μl draselného media. Každé měření bylo kalibrováno na standard obsahující H₂O₂ o finální koncentraci 0–5 μM (roztok H₂O₂ byl pravidelně kontrolován měřením absorbance při 240 nm).

Produkce H₂O₂ byla po hodinové inkubaci za tmy fluorimetricky měřena jako množství oxidované Amplex UltraRed (pomocí HRP) při 37 °C na přístroji Tecan Infinite M200 (Tecan, Švýcarsko). Excitace/emise byla nastavena na 544 nm (\pm 15 nm) / 590 nm (\pm 30 nm).

3.2.6 Detekce peroxidu vodíku pomocí luminiscence

Při měření produkce reaktivních forem kyslíku pomocí luminiscence bylo postupováno podle článku Wilhelma a Vilíma (1986). Do draselného media (viz 3.2.5) byl přidán 1 mM luminol (5-amino-2,3-dihydroftalazin-1,4-dion), 1 μM myxothiazol a 2,5 U/ml HRP. Do jamky na 96-jamkové destičce bylo přidáno 10 μg vzorků (intaktní mitochondrie nebo solubilizáty s digitoninem 2 a 6 g/g). Reakce byla spuštěna přidáním 10 mM GP a po 1 minutě byl přidán 500 μM ferrikyanid nebo 500 μM HAR. Volitelně byl 10 mM GP přidán přímo do media společně s 1 μM rotenonem (Rot), 1 μM myxothiazolem, 1 $\mu\text{g/ml}$ antimycinem A (AA), 1 μM atpeninem A5 (AtpA5) a 10 mM malonátem (MLN). Koncentrace β -glycerolfosfátu byla také 10 mM.

Luminiscence pak byla integrována v sekundových intervalech po následující minutu při 37 °C na přístroji Tecan Infinite M200.

3.2.7 Separační elektroforetické metody – hrCNE3 elektroforéza

Nativní elektroforézy umožňují separovat hydrofobní i solubilní proteiny, aniž by rozrušily slabé protein-proteinové interakce spojující proteiny do vyšších strukturních celků a superkomplexů, zároveň zůstává zachována enzymová aktivita separovaných proteinů. Lze využít a kombinovat několik typů nativních elektroforéz (Wittig a Schagger, 2009). Pro tuto práci byla využita čistá nativní elektroforéza o vysokém rozlišení hrCNE3 (*high-resolution*

Clear Native Electrophoresis, type 3). Výhodou této metody je snížení možných interakcí s chemikáliemi přidávanými do vzorku a pufrů na minimum a kompatibilita s následnými metodami pro detekci enzymových aktivit v gelu. Pro separaci pak byly využity gely s kontinuálně se snižující velikostí pórů (gradientové gely), které jsou vhodné pro současnou separaci relativně malých i velkých proteinových komplexů.

Solubilizované vzorky mitochondrií byly separovány na gradientovém polyakrylamidovém gelu 4–13 % (Mini-Protean III; Bio-Rad, USA), který byl připraven pomocí rotační pumpy za současného směšování 5 ml 2 gelů 4%: 0,42 ml AB (48% (hm.) akrylamid, 1,5% (hm.) N,N'-dimethylen bisakrylamid), 1,67 ml gelového pufru 3x (75 mM imidazol, 1,5 mM 6-aminohexanová kyselina, pH 7,0), 27 μ l 10% (hm.) APS (peroxodisíran amonný) a 2,7 μ l TEMEDu (N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin); a 13% 1,3 ml AB, 1,67 ml gelového pufru 3x, 1 ml 99% glycerolu, 25 μ l 10% APS a 2,5 μ l TEMEDu. 5 ml zaostřovacího gelu bylo využito pro vytvoření jamek pro nanášení vzorků: 0,37 ml AB, 1,67 ml gelového pufru 3x, 41,7 μ l 10% APS a 4,17 μ l TEMEDu.

Elektroforéza následně běžela v chladové místnosti o konstantní teplotě 4 °C nejprve při 45 V, po doputování vzorků do separačního gelu při 120 V. V tomto systému byly použity katodový pufr (50 mM Tricin, 7,5 mM imidazol, 0,05% (hm.) deoxycholát, 0,01% (hm.) dodecyl maltosid), anodový pufr (25 mM imidazol, pH 7,0) a standard molekulové hmotnosti pro nativní elektroforézy (*HMW Calibration Kit for Native Electrophoresis*, Amersham, UK).

3.2.8 Separační elektroforetické metody – 10% SDS elektroforéza

10% SDS elektroforéza byla využita pro druhý rozměr separace proteinů v gelu jakožto denaturující systém. Vzorky z prvního rozměru z hrCNE3 elektroforézy byly nejprve inkubovány v roztoku 1% (hm.) SDS a 1% (hm.) merkaptoethanolu po 1 hodinu.

10% gel byl do 10 ml připraven z následujících roztoků: 2 ml AB (48% (hm.) akrylamid, 1,5% (hm.) N,N'-dimethylen bisakrylamid), 3,3 ml gelového pufru 3x (3 M Tris-HCl, 0,3% (hm.) SDS, pH 8,45), 1 ml glycerolu, 50 μ l 10% APS a 6 μ l TEMEDu.

Nad 10% denaturující gel byl horizontálně umístěn proužek gelu z prvního rozměru nativní elektroforézy, jenž byl následně převrstven zaostřovacím 4% SDS gelem (do 5 ml: 0,4 ml AB, 1,2 ml gelového pufru 3x, 40 μ l APS a 4 μ l TEMEDu). Elektroforéza běžela v tricinovém systému s katodovým (100 mM Tris-HCl, 100 mM 0,1% SDS, pH 8,25)

a anodovým (100 mM Tris-HCl, pH 8,9) pufrům při pokojové teplotě při 120 V přibližně 2 hodiny dokud barva označující čelo vzorků nedosáhla spodního konce gelu.

3.2.9 Elektrotransfer na PVDF membránu – Western blot

Gel se separovanými proteiny byl před transferem ekvilibrován 15 minut v blotovacím pufru III (38 mM Tris-HCl, 10% (obj.) methanol, pH 8,5). Polyvinylidenfluoridová membrána (PVDF; Immobilon-P 0,45 μm , Millipore, USA) vhodné velikosti byla aktivována 100% methanolem (cca 15 vteřin) a poté inkubována v blotovacím pufru II (25 mM Tris-HCl, 10% (obj.) methanol, pH 9,0) 5 minut. Na anodu bylo naskládáno 6 filtračních papírů (3MM, Whatman, UK) o rozměrech membrány navlhčených v blotovacím pufru I (0,3 M Tris-HCl, 10% (obj.) methanol, pH 10,4), 3 papíry z pufru II, PVDF membrána, gel a 6 papírů z pufru III. Filtrační papíry byly v pufrách ponechány minimálně 30 vteřin. Vše bylo uzavřeno katodou. Proteiny separované pomocí elektroforézy byly takto přeneseny z gelu na PVDF membránu pomocí stejnosměrného elektrického pole dvou grafitových elektrod za konstantního proudu 0,8 mA/cm² po dobu 1 hodiny – polosuchý přenos (Omni Bio, ČR). Po transferu byla membrána promyta v TBS (150 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl; pH 7,5) a následně blokována v 5% (hm.) mléce (v TBS) 1 hodinu a pak promyta v TBST (0,1% (obj.) Tween-20 v TBS). Následně byla membrána inkubována s protilátkami nebo zamražena v -20 °C.

3.2.10 Specifická imunodetekce proteinů na PVDF membráně

PVDF membrána byla ponechána v roztoku primárních protilátek při pokojové teplotě minimálně 2 hodiny. Konkrétně se jednalo o monoklonální protilátky proti *SDHA* a *Blue Native OXPHOS Complexes Detection Kit* (obsahující monoklonální protilátky proti reprezentativním podjednotkám enzymových komplexů dýchacího řetězce NDUFA9 – komplex I, SDHA – komplex II, Core2 – komplex III, Cox4 – komplex IV a α -podjednotka komplexu V) od společnosti Abcam a králičí polyklonální protilátku proti mGPDH vlastní výroby (Mracek *et al.*, 2005). Poté byla membrána opláchnuta v TBST a následně inkubována s odpovídající sekundární protilátkou konjugovanou s fluorescenční značkou po 1 hodinu – konkrétně s *Alexa Fluor 680 goat anti-mouse* nebo *anti-rabbit IgG* (Life Technologies, USA) nebo s *IR Dye 800, goat anti-mouse* nebo *anti-rabbit IgG* (Rockland, USA). Poté byla

membrána znovu několikrát promyta v TBST a těsně před analýzou pouze v TBS. Detekce proteinů byla provedena na fluorescenčním scanneru Odyssey (LI-COR, USA). Naměřené signály byly kvantifikovány pomocí programu Aida Image Analyzer verze 3.21 (Raytest, Německo).

3.2.11 Produkce reaktivních forem kyslíku v proužcích gelu

Vzorky solubilizovaných mitochondrií byly separovány v polyakrylamidovém gelu pomocí nativní elektroforézy hrCNE3 na gradientu 4–13 %. Proužky gelu byly následně promyty 3x 10 minut v draselném mediu pro odstranění solí z elektroforetických pufrů. Každý proužek gelu obsahující proteiny byl nakrájen na kousky o velikosti přibližně 1x1x6 mm. Produkce reaktivních forem kyslíku pak byla měřena fluorescenčně jako oxidace Amplex UltraRed (viz 3.2.5) s tím rozdílem, že 25 μ l mitochondrií bylo nahrazeno právě těmito kousky gelu. V každé jamce byla fluorescence změřena na čtyřech různých místech pro eliminaci nehomogenity vzorku, avšak směrodatná odchylka se nelišila o více než 10 %, pro další výpočty byl použit průměr z těchto čísel. Protože nevíme přesnou koncentraci proteinu, je množství produkce H_2O_2 uváděno pouze jako pmol H_2O_2 /min.

3.2.12 Aktivita enzymů v proužcích gelu

Proužky z nativní elektroforézy hrCNE3 byly omyty v TBST cca 15 minut a poté byly inkubovány v příslušných roztocích až 2 hodiny. Histochemické barvení pro aktivitu SDH: 200 mM Tris-HCl (pH 7,4), 10 mM EDTA, 2 mM KCN, 80 μ M PMS, 1mg/ml Nitro Blue tetrazolium (NBT), 18 mM SUC. Histochemické barvení mGPDH: 5 mM Tris-HCl (pH 7,4), 0,88 mM menadion (v ethanolu), 1,5 μ M rotenon (v ethanolu), 3 mM $MgCl_2$, 1,2 mM NBT; 10 mM GP. Poté byla reakce zastavena denaturací proteinu v 50% methanolu s 10% CH_3COOH , gel byl zafixován v 10% CH_3COOH , následně omyt a naskenován.

3.2.13 Měření respirace

K měření respirace – spotřeby kyslíku u mitochondrií je používán respirometr s vysokým rozlišením neboli oxygraf (Oxygraph-2k, Oroboros Instruments, Rakousko) (Gnaiger, 2001). Měření spotřeby kyslíku probíhá za stálého míchání (750 rpm) při 30 °C současně ve dvou

uzavřených komůrkách o objemu 2 ml. Data jsou analyzována pomocí softwaru *DatLab4* (Oroboros Instruments, Rakousko). Rychlost respirace, tj. spotřeba kyslíku, je vypočítána jako negativní derivace koncentrace kyslíku v čase a vyjádřena v pmol O₂/s.mg proteinu.

Měření na izolovaných mitochondriích (0,15 mg/ml) probíhalo ve speciálním inkubačním KCl médiu, jehož iontové složení a pH napodobují intracelulární prostředí (80 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 5 mM KH₂PO₄, pH 7,3) za využití substrátu 10 mM GP. 10% digitonin byl využit pro titraci detergentem, výsledná koncentrace je zobrazena na grafu. Pokus byl ukončen přidáním 1 μM antimycinu A.

4 CÍLE

Cílem diplomové práce bylo detailněji prozkoumat molekulární mechanismus produkce reaktivních forem kyslíku u flavinových dehydrogenáz dýchacího řetězce. Pro studium produkce radikálů izolovanými dehydrogenázami bez příspěvku dalších enzymových komponent jsme zvolili metodu solubilizace mitochondriálních membránových proteinů jemným detergentem digitoninem. Konkrétními úkoly, které jsme na daném systému studovali, bylo:

- Charakterizovat vliv digitoninu na enzymovou aktivitu a integritu dýchacího řetězce
- Popsat produkci reaktivních forem kyslíku u flavinových dehydrogenáz mGPDH a SDH v digitoninem solubilizovaných mitochondriích
- Charakterizovat nativní formy mGPDH a SDH v mitochondriální membráně a jejich schopnost produkovat radikály

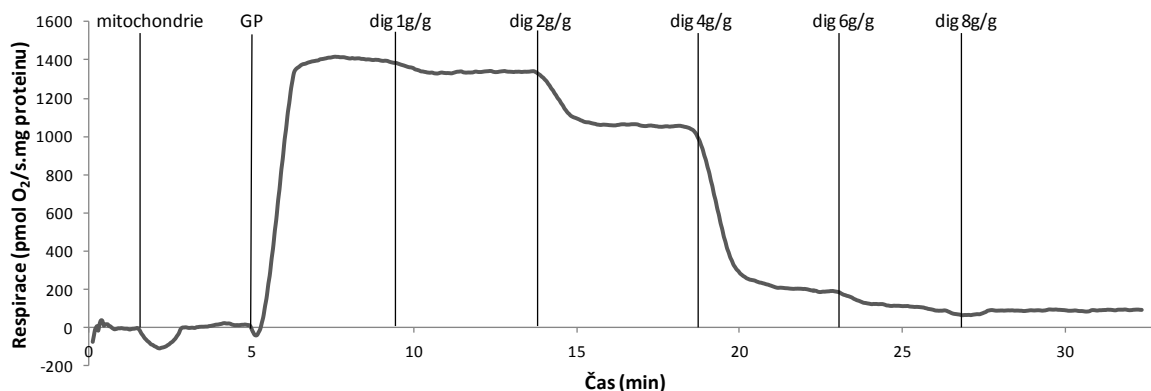
5 VÝSLEDKY

5.1 Charakteristika vlivu jemného detergentu digitoninu na enzymovou aktivitu a integritu dýchacího řetězce

5.1.1 Solubilizace mitochondriálních membrán digitoninem vede ke snížení enzymové aktivity u enzymů mGPDH a SDH

Solubilizace mitochondriálních membrán jemnými detergenty je osvědčená metoda v enzymologii pro studium membránových proteinů. Při analýze produkce reaktivních forem kyslíku se potýkáme s problémem odlišení příspěvku samotného studovaného proteinu od příspěvku ostatních enzymů mitochondriálního dýchacího řetězce. Studium izolovaných enzymů je však rovněž problematické, neboť v průběhu izolace dochází k velké ztrátě materiálu a navíc je mnoho enzymů inaktivováno. Využití solubilizátů pro studium mitochondriální produkce reaktivních forem kyslíku by však mohlo představovat perspektivní model, omezující nevýhody intaktních mitochondrií i izolovaných enzymů. Nejprve však bylo potřeba optimalizovat metodu solubilizace na mitochondriích hnědé tukové tkáně s důrazem na flavinové dehydrogenázy.

Je známo, že solubilizace tyto dehydrogenázy inaktivuje (Cottingham a Ragan, 1980), proto bylo nejprve nutné podívat se, co se stane s mitochondriemi po solubilizaci, jelikož takto byly využívány i pro všechny další experimenty. Na příkladu polarografického měření spotřeby kyslíku zmraženými a následně rozmraženými mitochondriemi hnědé tukové tkáně je vidět, že přidávání zvyšující se koncentrace detergentu k mitochondriím vede k postupnému narušení intaktnosti dýchacího řetězce (obrázek 9). Při koncentraci detergentu 4 g/g proteinu je již řetězec tak disociován, že jen malá porce elektronů prochází z mGPDH až na komplex IV, kde je spotřebováván kyslík za vzniku vody.

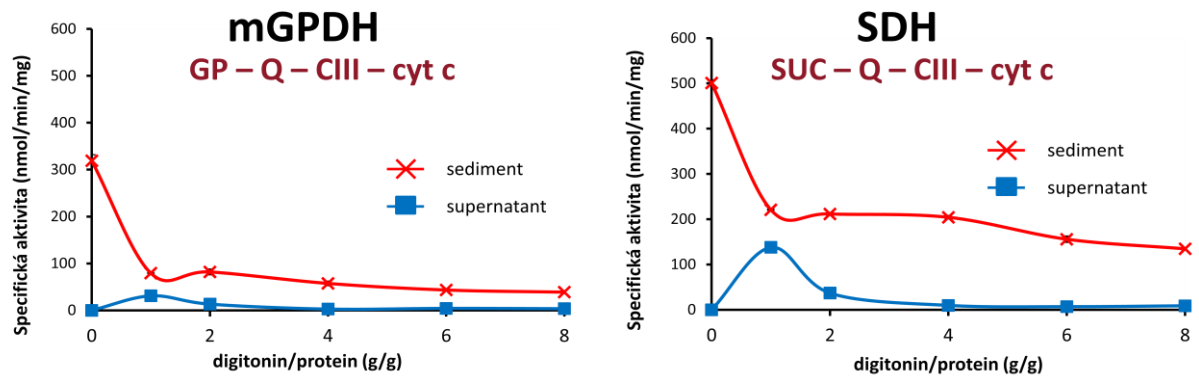


Obrázek 9: Spotřeba kyslíku mitochondriemi jako funkce titrace detergentem

U vzorku mitochondrií z hnědé tukové tkáně potkana byla měřena spotřeba kyslíku pomocí kyslíkové elektrody. Po přidání substrátu (10 mM GP) byla přidávána zvyšující se koncentrace detergentu digitoninu (dig; uváděno ve finální koncentraci). Rozmražené mitochondrie již nevyžadují přísadu rozpřahovače pro maximální aktivaci respirace.

Jelikož metoda solubilizace dokáže izolovat membránové proteiny, byly k dalším experimentům využity vzorky mitochondrií získané diferencíální centrifugací, kdy dojde k oddělení dvou složek – sedimentu a supernatantu, přičemž solubilizované izolované proteiny by se měly nacházet především v supernatantu (Wittig a Schagger, 2009). Pro zjištění vlivu působení jemného neiontového detergentu digitoninu na enzymovou aktivitu zkoumaných flavinových dehydrogenáz byl však použit supernatant i sediment pro identifikaci poměru aktivit v obou složkách. Byly opět využity zvyšující se koncentrace detergentu, které ukazují na postupné rozbíjení celistvosti dýchacího řetězce při spektrofotometrickém měření enzymových aktivit.

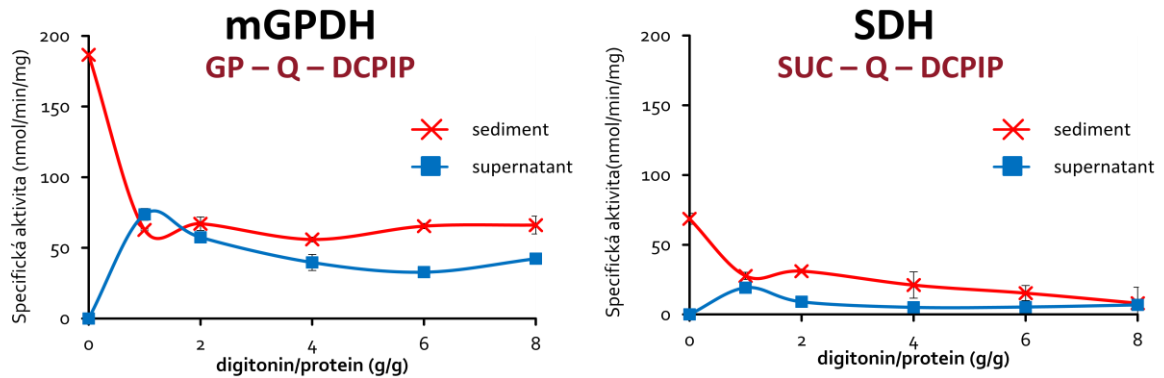
Enzymové aktivity byly nejdříve zjišťovány jako množství redukováného cytochromu *c* (obrázek 10). Stupeň rozbití dýchacího řetězce od dehydrogenázy po komplex III se zvyšující se koncentrací detergentu lze tedy pozorovat jako snižující se intenzita redukce cytochromu *c*. Předpokládáme-li, že zkoumané enzymy jsou stále aktivní, pak za snížení enzymové aktivity může především přerušeni přenosu elektronů někde v jejich cestě od substrátů glycerol-3-fosfátu nebo sukcinátu přes mGPDH či SDH, přes koenzym Q a přes komplex III až na cytochrom *c*. Na skutečnost, že dýchací řetězec je zachován jako celek, poukazuje částečné zachování jejich enzymové aktivity u vzorků s nejnižší koncentrací detergentu, tj. digitonin 1 g/g proteinu, konkrétně pak zůstává 10 % aktivity mGPDH a 27 % aktivity SDH.



Obrázek 10: Enzymové aktivity v solubilizovaných mitochondriích měřené jako redukce cytochromu c

Mitochondrie z hnědé tukové tkáně potkana byly solubilizovány se zvyšující se koncentrací digitoninu (1, 2, 4, 6, 8 g/g proteinu). Aktivity byly měřeny spektrofotometricky v mitochondriích bez detergentu a v supernatantu a sedimentu po solubilizaci jako stupeň redukce cytochromu c. Jedná se tedy o kombinaci aktivit mGPDH nebo SDH s aktivitou komplexu III. $n = 3 \pm$ směrodatná odchylka

Zatímco cytochrom c reduktázová aktivita nám poskytla údaj o míře solubilizace, bylo potřeba detekovat i izolovanou enzymovou aktivitu jednotlivých dehydrogenáz, aby bylo možné posoudit, zda v důsledku působení detergentu dochází k jejich inaktivaci. Proto byl použit umělý akceptor elektronů DCPIP (obrázek 11). Tato modrá látka přijímá elektrony od molekul koenzymu Q v membráně, čímž se sama redukuje a stává se bezbarvou. Enzymová aktivita v tomto systému se ztrácela v průběhu solubilizace více u SDH, což by nasvědčovalo její vyšší inaktivaci při solubilizaci.

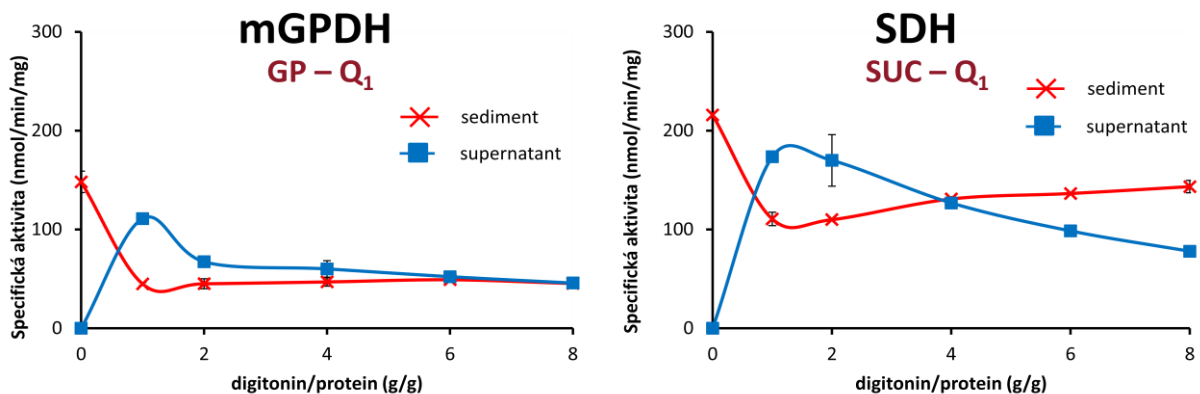


Obrázek 11: Enzymové aktivity v solubilizovaných mitochondriích měřené jako redukce dichlorfenolindofenolu

Mitochondrie z hnědé tukové tkáně potkana byly solubilizovány se zvyšující se koncentrací detergentu digitoninu (1, 2, 4, 6, 8 g/g proteinu). Aktivity byly měřeny spektrofotometricky v mitochondriích bez detergentu a v supernatantu a sedimentu po solubilizaci jako stupeň redukce dichlorfenolindofenolu. Jedná se tedy pouze o aktivity mGPDH nebo SDH.

$n = 3 \pm$ směrodatná odchylka

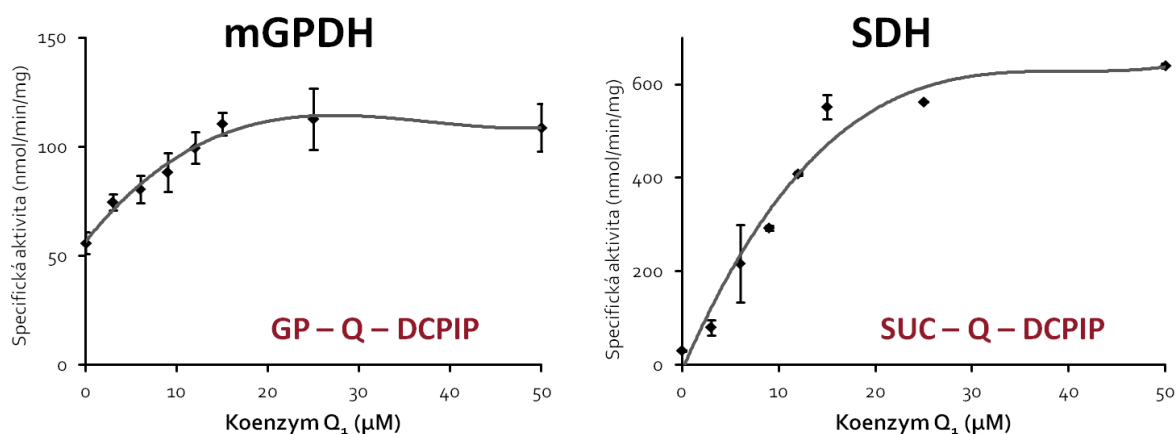
Pokles enzymové aktivity byl však mnohem méně výrazný, když byl jako umělý akceptor elektronů použit koenzym Q_1 (obrázek 12). To ukazuje, že v případě DCPIP nebyla příčinou poklesu měřené aktivity inaktivace enzymů, ale spíše vyplavení koenzymu Q z membrány.



Obrázek 12: Enzymové aktivity v solubilizovaných mitochondriích měřené jako redukce koenzymu Q_1

Mitochondrie z hnědé tukové tkáně potkana byly solubilizovány se zvyšující se koncentrací detergentu digitoninu (1, 2, 4, 6, 8 g/g proteinu). Aktivity byly měřeny spektrofotometricky v mitochondriích bez detergentu a v supernatantu a sedimentu po solubilizaci jako stupeň redukce koenzymu Q_1 . Jedná se tedy pouze o aktivity mGPDH nebo SDH. $n = 3 \pm$ směrodatná odchylka

Předchozí výsledky poukazují na ztrátu molekul koenzymu Q, tedy ztrátu mobilního přenašeče, který propojuje elektron transportní řetězec. Proto jsme se rozhodli studovat, co se stane po přidání koenzymu Q (zde solubilního koenzymu Q₁) k mitochondriím solubilizovaným digitoninem 2g/g proteinu v systému s akceptorem DCPIP. Zatímco u mGPDH přidání externího koenzymu Q vedlo ke zvýšení aktivity pouze dvojnásobně, u SDH byla naměřena „reaktivace“ enzymu přibližně dvacetinásobná. Jednak můžeme pozorovat, že takto vyvolaná maximální aktivita je asi pětkrát větší u SDH, což může svědčit o inaktivaci mGPDH během solubilizace, ale také zde vidíme, že koenzym Q se snadněji ztrácí z kontaktu s SDH. mGPDH by tedy zřejmě mohla mít vyšší afinitu k molekulám koenzymu Q.



Obrázek 13: Enzymové aktivity v solubilizovaných mitochondriích měřené jako redukce dichlorfenolindofenolu titrovaná koenzymem Q

Mitochondrie z hnědé tukové tkáně potkana byly solubilizovány digitoninem (2 g/g proteinu). Aktivity byly měřeny spektrofotometricky v supernatantu po solubilizaci jako stupeň redukce dichlorfenolindofenolu za současného přidávání zvyšující se koncentrace koenzymu Q₁ (0 až 50 μM). n = 3 až 5 ± střední chyba průměru

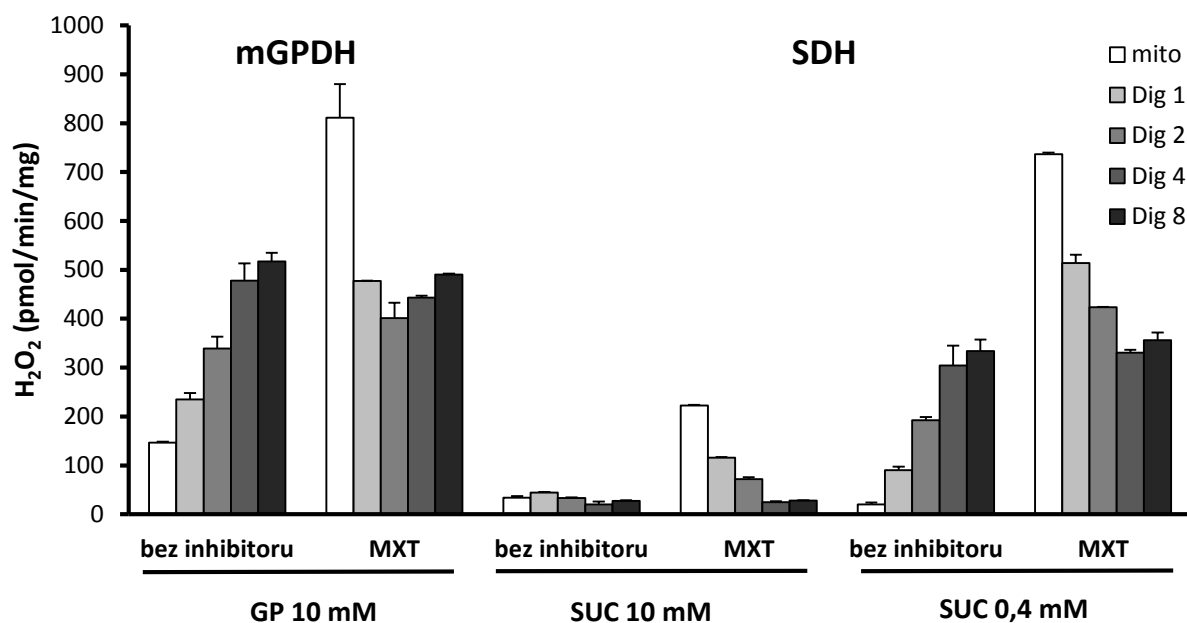
Enzymy zůstávají i po solubilizaci nadále aktivní, měřitelnost jejich aktivit je inhibována rozpadem dýchacího řetězce, a to především ztrátou koenzymu Q. Jak bylo popsáno výše, dosavadní výzkumy nenasvědčují přítomnosti SDH a mGPDH v superkomplexech. Nedá se tedy ani předpokládat existence oddělené skupiny molekul koenzymu Q asociované s dehydrogenázami, a tedy ani že by si ve větší míře udržovaly molekuly koenzymu Q. Přesto se ukázalo, že mGPDH je dokáže zadržet s větší afinitou, i když přidání molekul koenzymu Q stále dokázalo tento enzym aktivovat, tedy spojit dýchací řetězec.

5.2 Produkce reaktivních forem kyslíku u flavinových dehydrogenáz mGPDH a SDH v digitoninem solubilizovaných mitochondriích

5.2.1 Produkce reaktivních forem kyslíku digitoninem solubilizovanými proteiny mGPDH a SDH a jejich odlišná odpověď na přidání koenzymu Q

Pro mitochondrie a pro vzorky se zvyšující se koncentrací detergentu digitoninu byla měřena produkce reaktivních forem kyslíku reakcí s Amplex UltraRed za přítomnosti křenové peroxidázy. Tato měření pak probíhala za využití tří substrátů: glycerol-3-fosfátu o koncentraci 10 mM a dvou různých koncentrací sukcinátu, a to 10 mM a 0,4 mM. Výše bylo vysvětleno (viz 2.2.3), že při nízké koncentraci sukcinátu dochází k produkci kyslíkových radikálů také flavinem sukcinát dehydrogenázy, zatímco tato produkce není pozorovatelná při běžně využívané koncentraci 10 mM, která je saturující. Stejný efekt koncentrace nebyl pozorován u mGPDH (Tretter a Adam-Vizi, 2004), naopak snížení koncentrace glycerol-3-fosfátu vedlo k prostému snížení pozorované produkce reaktivních forem kyslíku.

Na grafu (obrázek 14) je vidět, že zvyšující se koncentrace detergentu vede ke zvyšující se naměřené produkci reaktivních forem kyslíku u mGPDH a u SDH s nízkou koncentrací substrátu. Téměř žádná produkce pak nebyla pozorována při využití vysoké koncentrace sukcinátu v systému, což odpovídá i starším publikovaným předpokladům, že SDH není za standardních podmínek této produkce schopna. Jak bylo pozorováno i u měření enzymových aktivit u mitochondrií a také vzorků s nízkou koncentrací digitoninu 1 g/g proteinu a částečně i 2 g/g proteinu, dýchací řetězec zůstává zachován, což se odráží v měření produkce kyslíkových radikálů s přidaným myxothiazolem. Ten zvedá měřenou produkci kyslíkových radikálů, jelikož dochází k jejich tvorbě dále po směru toku elektronů, a to především přímo redukovánými molekulami koenzymu Q (Vrbacky *et al.*, 2007) nebo v Q_o místě komplexu III (Raha *et al.*, 2000). Toto zvýšení produkce lze pozorovat u všech tří typů substrátů.

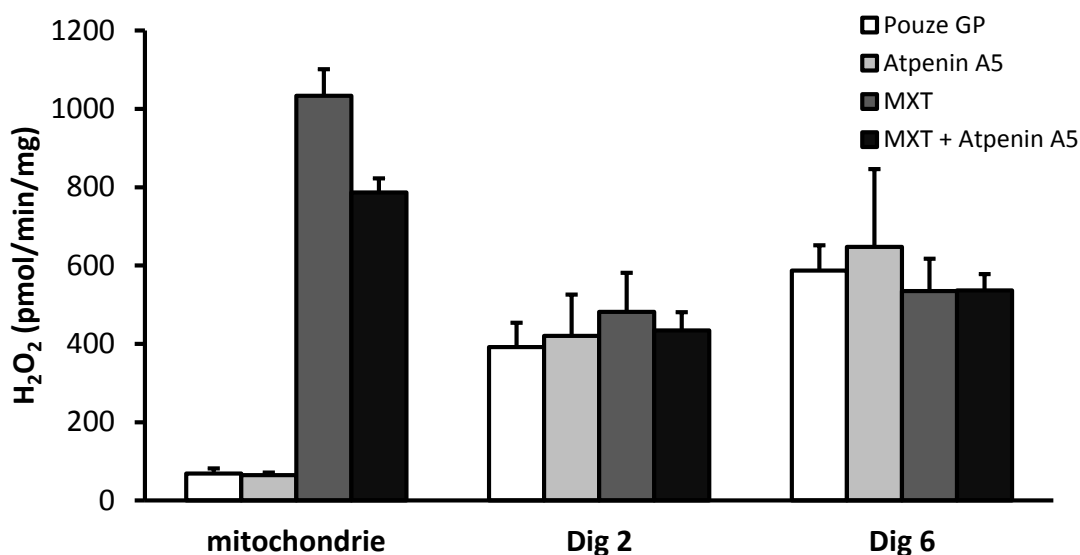


Obrázek 14: Produkce reaktivních forem kyslíku v solubilizovaných mitochondriích

Mitochondrie z hnědé tukové tkáně potkana byly solubilizovány zvyšující se koncentrací digitoninu (1, 2, 4, 8 g/g proteinu). Produkce reaktivních forem kyslíku byla detekována v mitochondriích a v supernatantech po solubilizaci jako produkce peroxidu vodíku měřená fluorometricky dle stupně oxidace Amplex UltraRed (50 μ M) za přítomnosti křenové peroxidázy (1 U/ml).

MXT – myxothiazol; n = 3 až 5 \pm směrodatná odchylka

Vzhledem k tomu, že stejná práce (Quinlan *et al.*, 2012), která poukázala na tvorbu kyslíkových radikálů komplexem II, říká také, že sukcinát dehydrogenáza je zodpovědná i za produkci radikálů naměřenou u ostatních enzymů dýchacího řetězce, byl sledován efekt inhibitoru komplexu II atpeninu A5 na produkci radikálů s glycerol-3-fosfátem jako substrátem (obrázek 15). U intaktních mitochondrií byl skutečně naměřen rozdíl mezi pozorovanou produkcí peroxidu vodíku mezi měřením pouze s myxothiazolem a při použití obou inhibitorů myxothiazolu i atpeninu A5, což svědčí o částečném příspěvku komplexu II k této produkci. Avšak u vzorků s digitoninem 2 g/g či 6 g/g proteinu nebyla pozorována signifikantní změna v měřené produkci peroxidu po použití myxothiazolu, atpeninu A5 nebo jejich kombinace, jelikož zde je již dýchací řetězec disociován. Solubilizované vzorky mitochondrií jsou tedy vhodným modelem pro studium izolované produkce reaktivních forem kyslíku jednotlivými dehydrogenázami.

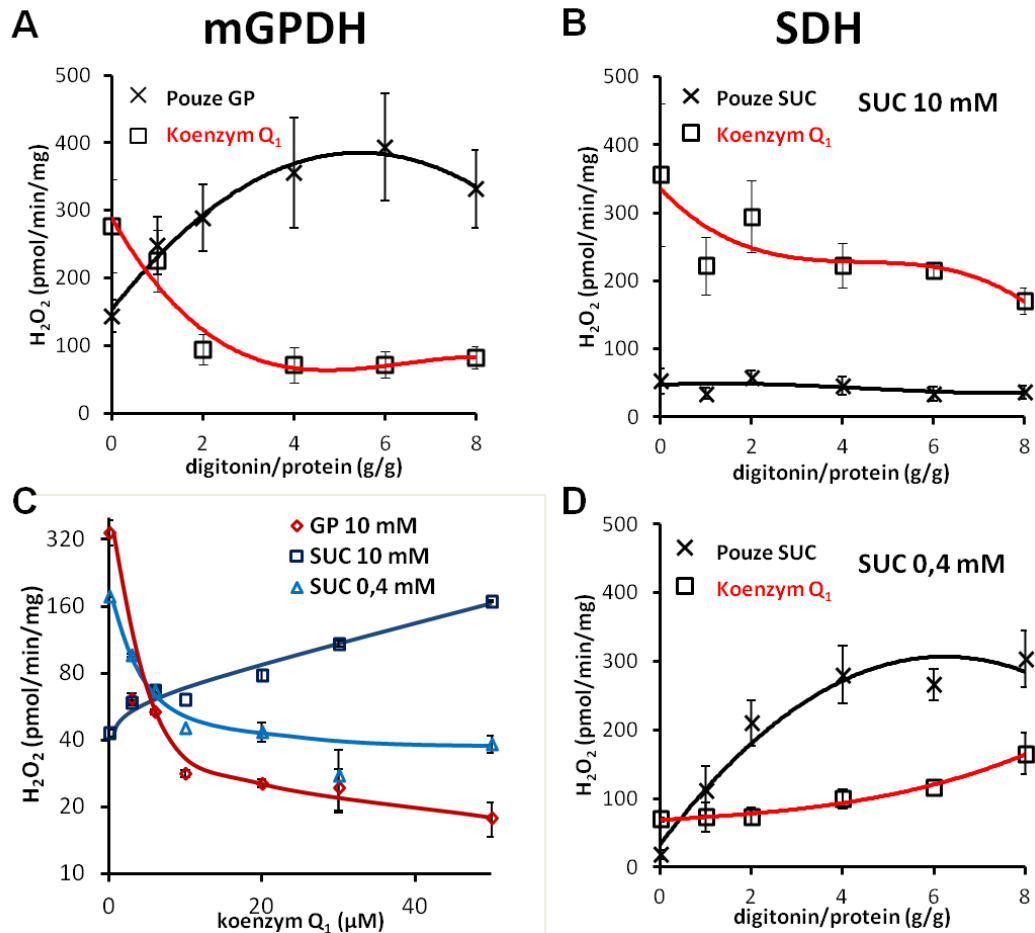


Obrázek 15: Produkce reaktivních forem kyslíku u mGPDH v solubilizovaných mitochondriích jako funkce inhibitorů dýchacího řetězce

Mitochondrie z hnědé tukové tkáně potkana byly solubilizovány digitoninem (2 a 6 g/g proteinu). Produkce reaktivních forem kyslíku byla detekována v mitochondriích a v supernatantech po solubilizaci jako produkce peroxidu vodíku měřená fluorometricky dle stupně oxidace Amplex UltraRed (50 μ M) za přítomnosti křenové peroxidázy (1 U/ml). Byly přidány inhibitory komplexu III – myxothiazol (MXT) a komplexu II – atpenin A5. $n = 3 \pm$ směrodatná odchylka

Stejně jako u měření enzymových aktivit i u měření produkce reaktivních forem kyslíku byl zkoumán efekt přidávání koenzymu Q_1 (obrázek 16). U všech tří typů substrátů byl u nesolubilizovaných mitochondrií pozorován prooxidační efekt koenzymu Q (16A, B, D). Při měření s konstantní koncentrací 12 μ M koenzymu Q se zvyšující se koncentrací použitého detergentu (digitonin 1 až 8 g/g proteinu) byl u mGPDH a nízké koncentrace sukcinátu u SDH po solubilizaci pozorován antioxidační efekt koenzymu Q, avšak u SDH s vysokou koncentrací substrátu došlo ke zvýšení pozorované produkce oproti produkci bez koenzymu Q.

Na obrázku 16C je poté zobrazeno titrování koenzymem Q_1 za stálé koncentrace detergentu digitoninu (2 g/g proteinu), které ukázalo znovu stejný – antioxidační efekt u mGPDH a nízké koncentrace substrátu u SDH a prooxidační efekt se saturační koncentrací substrátu pro SDH. Pro lepší zobrazení je zde produkce peroxidu vodíku vynesena na logaritmické ose vůči rostoucí koncentraci přidaného koenzymu Q_1 .

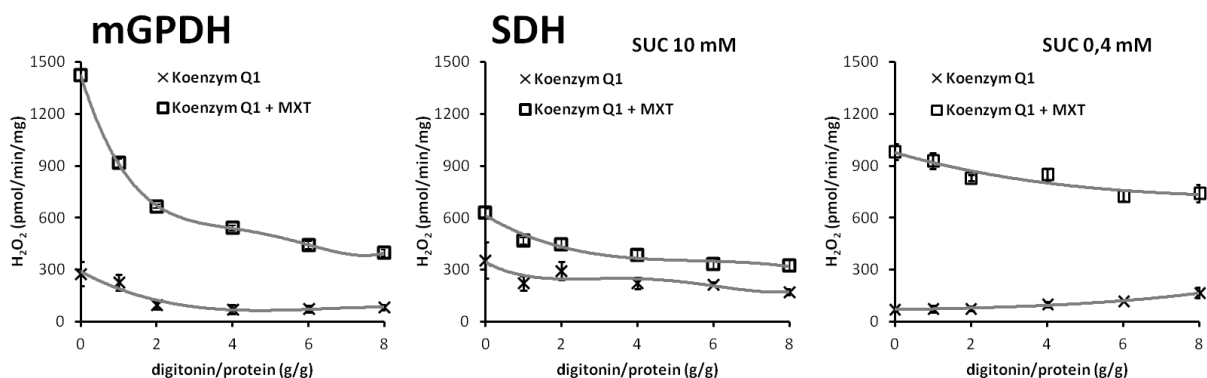


Obrázek 16: Vliv přidávání koenzymu Q₁ na produkci reaktivních forem kyslíku v solubilizovaných mitochondriích

Mitochondrie z hnědé tukové tkáně potkana byly solubilizovány digitoninem (1, 2, 4, 6 a 8 g/g proteinu nebo 2 g/g pro titraci koenzymem Q₁). Produkce reaktivních forem kyslíku byla detekována v mitochondriích a v supernatantech po solubilizaci jako produkce peroxidu vodíku měřená fluorometricky dle stupně oxidace Amplex UltraRed (50 μM) za přítomnosti křenuvé peroxidázy (1 U/ml). Byl pozorován efekt koenzymu Q₁ při konstantní koncentraci 12 μM (A, B, D) nebo při zvyšující se koncentraci (0 až 50 μM; část C). n = 3 až 5 ± směrodatná odchylka

Kromě vlivu přidávání koenzymu Q byl také zkoumán kombinovaný efekt s myxothiazolem (obrázek 17). Propojení dýchacího řetězce rozpustným koenzymem Q₁ vedlo k přenosu elektronů z SDH nebo mGPDH na komplex III, avšak při zablokování vstupu do komplexu III myxothiazolu došlo ke zvýšení možnosti úniku elektronů přímo z koenzymu Q, tedy ke zvýšení pozorované produkce peroxidu vodíku. V případě vysoké koncentrace sukcinátu bylo zvýšení produkce peroxidu vodíku malé. Produkce reaktivních forem kyslíku pozorovaná pouze po přidání koenzymu Q zde byla nejspíše způsobena zvýšením pravděpodobnosti úniku elektronů právě z koenzymu Q nebo též z komplexu III po propojení

řetězce. Bez koenzymu Q tato produkce pozorovatelná není, nepochází tedy pravděpodobně ze samotné dehydrogenázy.



Obrázek 17: Vliv přidávání koenzymu Q a myxothiazolu na produkci reaktivních forem kyslíku v solubilizovaných mitochondriích

Mitochondrie byly solubilizovány detergentem digitoninem (1, 2, 4, 6 a 8 g/g proteinu). Produkce reaktivních forem kyslíku byla detekována v mitochondriích a v supernatantech po solubilizaci jako produkce peroxidu vodíku měřená fluorometricky dle stupně oxidace Amplex UltraRed (50 μ M) za přítomnosti křenové peroxidázy (1 U/ml). Byl pozorován efekt koenzymu Q (12 μ M) a kombinovaný efekt s myxothiazolem (MXT; 1 μ M). $n = 3 \pm$ směrodatná odchylka

Produkce reaktivních forem kyslíku roste se zvyšující se koncentrací detergentu u mGPDH a u SDH s nízkou koncentrací substrátu (obrázek 14), což ukazuje na zvýšenou náchylnost k úniku elektronů u izolovaného enzymu nezapojeného do dýchacího řetězce, který by elektrony odebíral. Narozdíl od literatury jsme neprokázali, že by tvorba kyslíkových radikálů u mGPDH byla způsobena i jinými místy dýchacího řetězce než přímo tímto enzymem (obrázek 15). Zajímavý je pak vliv přidávání koenzymu Q k solubilizovaným vzorkům, kde je u mGPDH a SDH s nízkou koncentrací substrátu pozorován antioxidační vliv, naopak u vzorků s vysokou koncentrací sukcinátu dochází ke stimulaci produkce reaktivních forem kyslíku (obrázek 16). Přidání myxothiazolu do systému jen potvrdilo, že po propojení dýchacího řetězce koenzymem Q₁, dojde po zablokování komplexu III tímto inhibítorem k uvolňování elektronů na kyslík (obrázek 17).

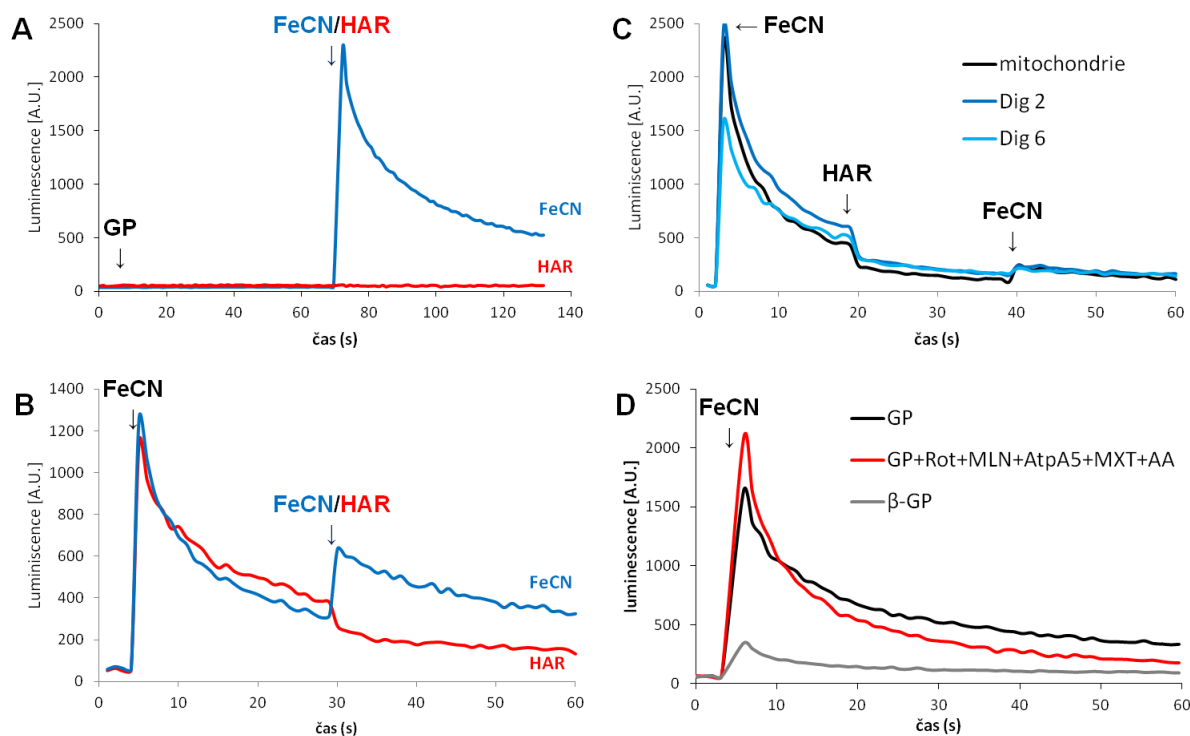
5.2.2 Produkce reaktivních forem kyslíku vyvolaná jedoelektronovými akceptory

Jak bylo popsáno v úvodních kapitolách a v článku Drahoty *et al.* (2002), lze u mGPDH vyvolat spotřebu kyslíku přidáním jedoelektronového akceptoru ferrikyanidu. Vliv různých akceptorů elektronů jsme se rozhodli detailněji prostudovat na modelu solubilizovaného enzymu.

V důsledku přidání FeCN vznikají v systému kyslíkové radikály. Finální přeměna peroxidu vodíku na vodu působením přidané křenové peroxidázy je spojena s měřitelným zábleskem luminolu. Experimenty na obrázku 18 ukazují, co se stane se vzorkem solubilizovaných mitochondrií, pokud k nim přidáme FeCN. Na obrázku 18A byl nejprve v 5. vteřině přidán substrát glycerol-3-fosfát, po dalších 60 vteřinách pak jedoelektronové akceptory FeCN nebo HAR. Zatímco přidání FeCN jednoznačně vedlo k záblesku luminiscence v důsledku vzniku peroxidu vodíku, HAR žádný pozorovatelný efekt na luminol neměl, v systému tedy nevznikly žádné reaktivní formy kyslíku.

Na obrázku 18B je pak vidět, co se stane po opakovaném přidání FeCN, nebo po přidání FeCN následovaném akceptorem HAR. Je vidět, že opakované přidání FeCN vede k opakované indukci vzniku peroxidu vodíku, naopak HAR dokáže nejspíše odebírat veškeré volné elektrony ze systému a inhibovat tak jejich únik na kyslík. Podobný experiment pak ukazuje obrázek 18C, kde byl nejprve přidán FeCN, poté HAR a poté znovu FeCN, kdy při druhém přidání FeCN došlo k indukci tvorby kyslíkových radikálů, jedná se tedy o neustálou koncentrační kompetici o elektrony. Navíc je na tomto obrázku ukázáno, že měření s mitochondriemi či vzorky solubilizovanými digitoninem 2 g/g proteinu vede k téměř stejným absolutním hodnotám. I u tohoto typu experimentů je však otázkou, zda se jedná o produkci reaktivních forem kyslíku spojenou přímo s enzymem nebo k ní dochází na jiných komponentách dýchacího řetězce. Odpověď přináší měření s digitoninem 6 g/g, kdy je řetězec kompletně rozbit a za snížení absolutní produkce může už výše zmiňovaná částečná inaktivace enzymu po solubilizaci. mGPDH jakožto producenta reaktivních forem kyslíku potvrzuje i výsledek na obrázku 18D, kde je porovnáno měření se samotným substrátem s kombinací substrátu glycerol-3-fosfátu a inhibitorů dýchacího řetězce rotenonu, atpeninu A5, malonátu, myxothiazolu a antimycinu A, které vylučují produkci superoxidu jakýmkoli dalšími komplexy dýchacího řetězce. Měření s enzymaticky neaktivním analogem substrátu β -glycerolfosfátem (obrázek 18D) navíc vylučuje, že by naměřené hodnoty v ostatních

experimentech byly artefaktem systému. Nízká naměřená hodnota pochází zřejmě ze zbytkového α -glycerolfosfátu, který může být ve stopovém množství u komerčně dostupného β -glycerolfosfátu přítomen.



Obrázek 18: Produkce reaktivních forem kyslíku enzymem mGPDH indukovaná pomocí FeCN měřená jako luminiscence

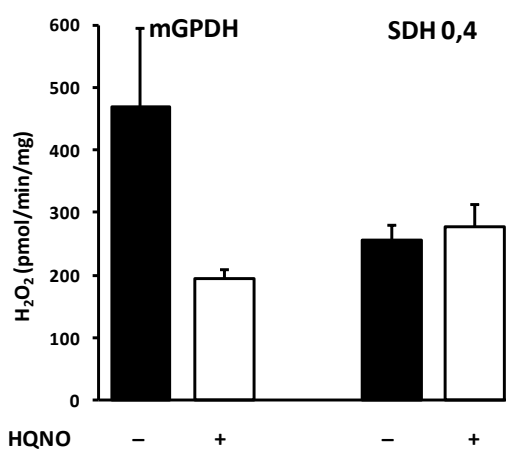
Oxidace luminolu (1 mM) za přítomnosti křenové peroxidázy (2,5 U/ml) byla indukována přidáním FeCN (500 μ M) nebo HAR (125 μ M). V případě A a D byly využity supernatanty vzniklé solubilizací 2 g/g proteinu, na obrázku B pak digitonin 6 g/g. Pro obrázek C byly využity mitochondrie a supernatanty 2g/g a 6g/g. Indukce produkce reaktivních forem kyslíku byla měřena za přítomnosti inhibitorů dýchacího řetězce a analogu substrátu.

Rot – rotenon, MLN – malonát, AtpA5 – atpenin A5, MXT – myxothiazol, AA – antimycin A

Měření produkce reaktivních forem kyslíku jako oxidace luminolu v různých variantách experimentu ukazují, že za tuto produkci je zodpovědná pouze mitochondriální glycerol-3-fosfát dehydrogenáza a že tato produkce je relativně vysoká. Vzhledem k tomu, že takto FeCN indukovaná produkce je specifická pro mGPDH, tak také *in vivo* může docházet ke stimulaci, která bude specifická pouze pro tento enzym.

5.2.3 Místem produkce reaktivních forem kyslíku u mGPDH je vazebné místo koenzymu Q

Předchozí experimenty naznačují, že místem zodpovědným za produkci kyslíkových radikálů u mGPDH je nejspíše vazebné místo koenzymu Q. Jelikož není znám žádný specifický inhibitor tohoto vazebného místa u mGPDH, byl využit obecný inhibitor působící na tato místa u různých enzymů (Kogut a Lightbown, 1962). Váže se do Q vazebného místa u bakteriálního analogu mGPDH, přičemž konkrétně toto místo je relativně konzervovanou oblastí (Yeh *et al.*, 2008). Měření s HQNO u mitochondrií solubilizovaných digitoninem 6 g/g proteinu ukázalo odlišnou odpověď mGPDH a SDH s nízkou koncentrací substrátu na působení tohoto inhibitoru (obrázek 19). Zatímco produkce měřeného peroxidu vodíku se u mGPDH snížila, na produkci komplexem II, kde k úniku elektronů dochází na flavinu, nemělo přidání HQNO vliv. Místem úniku elektronů u mitochondriální glycerol-3-fosfát dehydrogenázy, a zároveň místem produkce reaktivních forem kyslíku je tedy místo vázající koenzym Q. Vzniká-li zde semichinonon, pak může být vysvětlena i produkce na obě strany membrány podobným systémem, jako byl navržen u komplexu III (viz 2.2.2).



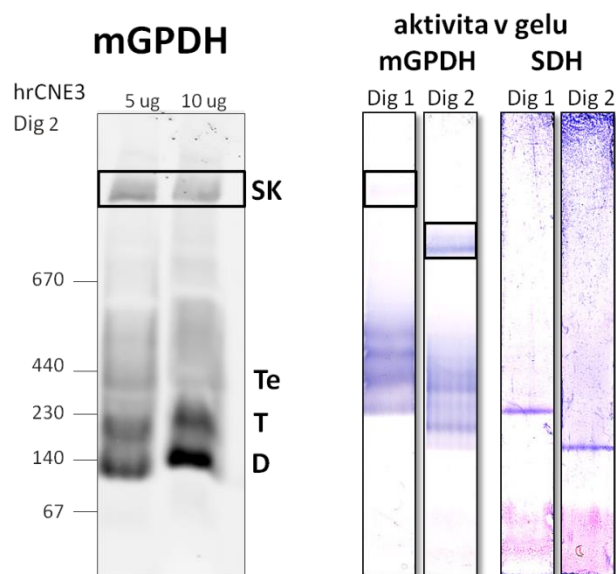
Obrázek 19: Efekt HQNO na produkci reaktivních forem kyslíku

Efekt přidání obecného inhibitoru Q vazebného místa HQNO (10 μ M) na produkci reaktivních forem kyslíku měřenou s Amplex UltraRed (50 μ M) a křenovou peroxidázou (1 U/ml) u supernatantů solubilizovaných digitoninem 6 g/g proteinu. $n = 3 \pm$ směrodatná odchylka

5.3 Charakterizace funkčních forem mGPDH

5.3.1 Různé funkční formy mGPDH

Již některé dřívější studie naznačují, že mGPDH vytváří oligomerní struktury o několikanásobně větší velikosti než je velikost holoenzymu se 74 kDa. Rozhodli jsme se proto studovat v jakých nativních formách či komplexech je mGPDH přítomna ve vnitřní mitochondriální membráně (obrázek 20). K těmto experimentům byl využit speciální nativní elektroforetický systém hrCNE3, který proteiny nenedaturuje jako běžná SDS elektroforéza. Narozdíl od běžněji využívané modré nativní elektroforézy také lépe zachovává vysokomolekulární formy a umožňuje následná enzymatická měření, která jsou inhibována barvou Coomassie Blue přidávanou právě do modré nativní elektroforézy (Wittig a Schagger, 2009). Histochemická detekce aktivit enzymů přímo v gelu ukázala, že u mGPDH existuje několik různých forem, které jsou všechny katalyticky aktivní. V tomto systému jsme tedy mohli pozorovat několik funkčních forem proteinu mGPDH jak na signálu protilátky z Western blotu, tak přímým histochemickým měřením, které potvrdilo, že všechny detekované formy (D – dimer, T – trimer, Te – tetramer, SK – superkomplex) jsou funkční. U SDH byla pozorována pouze aktivita monomeru. Zdánlivý rozdíl velikostí mezi vzorky solubilizovanými s detergentem 1 g/g a 2 g/g proteinu je způsoben větší velikostí micel, tedy obaleností proteinů zbytky membrány.



Obrázek 20: Různé funkční formy enzymů mGPDH a SDH separované pomocí hrCNE3 elektroforézy

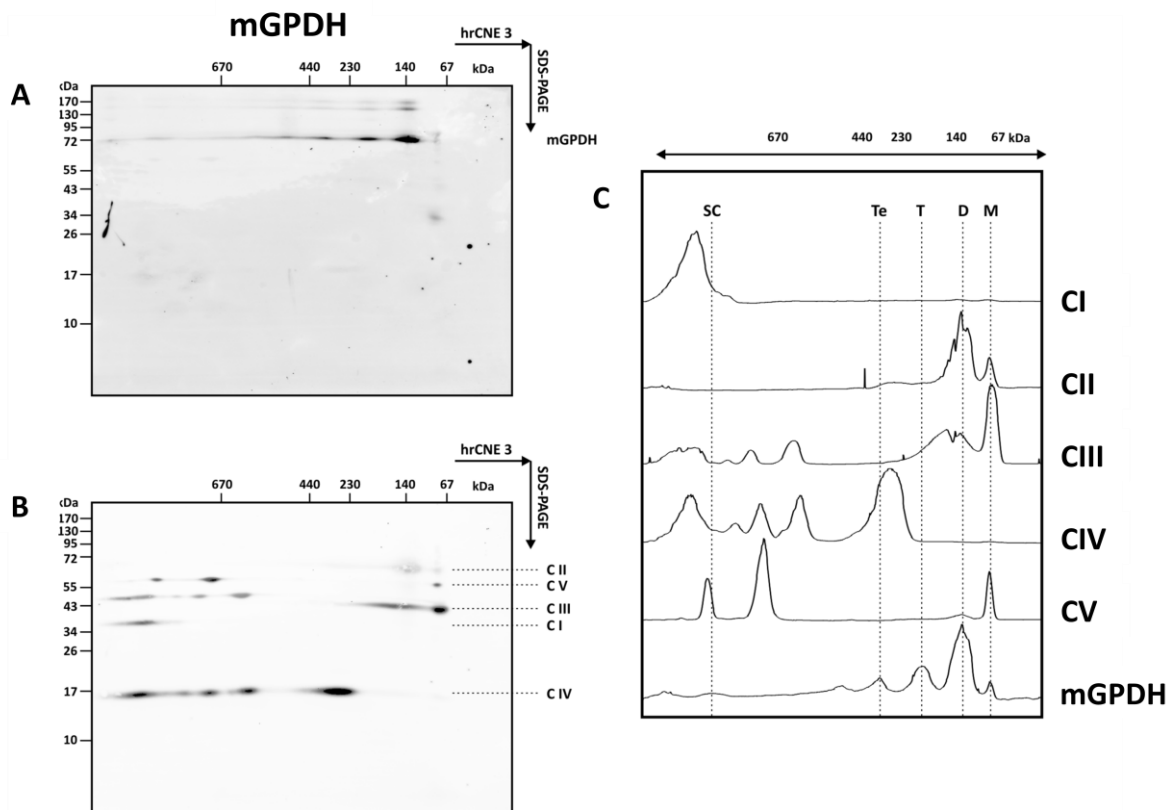
Vzorky mitochondrií solubilizované digitoninem 1 a 2 g/g proteinu byly separovány pomocí nativní elektroforézy hrCNE3. V první části obrázku byl signál mGPDH detekován specifickou protilátkou, aktivita enzymů mGPDH a SDH v gelu byla stanovena histochemicky; u mGPDH je vyznačen superkomplex.

D – dimer; T – trimer; Te – tetramer; SK – superkomplex

5.3.2 Superkomplexy proteinu mGPDH

Předchozí výsledky ukázaly, že mGPDH existuje ve vysokomolekulárních formách, které jsou navíc enzymaticky aktivní. Otázkou zůstávají interakční partneři mGPDH, především pak v pozorovaném superkomplexu. Interakce s komplexy dýchacího řetězce či jinými mitochondriálními proteiny by mohla představovat superkomplex specifický pro mGPDH. K tomu byla využita dvourozměrná elektroforéza, kdy byly proteiny v prvním rozměru separovány hrCNE3 nativní elektroforézou tak, aby co nejvíc původních interakcí mezi proteiny bylo zachováno. V druhém rozměru pak bylo využito klasické denaturační SDS elektroforézy v 10% gelu. V tomto systému bychom měli všechny proteiny, které putovaly za nativních podmínek spolu, vidět v druhém rozměru pod sebou. Gel z druhého rozměru byl využit pro Western blot a na stejné membráně byla detekována mGPDH (obrázek 21A) a komplexy dýchacího řetězce s koktejlem protilátek proti reprezentativním podjednotkám (21B). Počítačová analýza (21C) neprokázala žádný výrazný překryv signálů jednotlivých forem mGPDH s ostatními enzymy. Zdánlivý překryv s komplexem II je způsoben podobnou velikostí dimeru mGPDH a holoenzymu komplexu II. Případný komplex vzniklý interakcí

mGPDH a SDH by totiž musel dosahovat velikosti okolo 280 kDa. Lze tedy tvrdit, že mGPDH tvoří funkční homooligomery a nebo vysokomolekulární komplexy s jinými proteiny než jsou enzymy dýchacího řetězce.



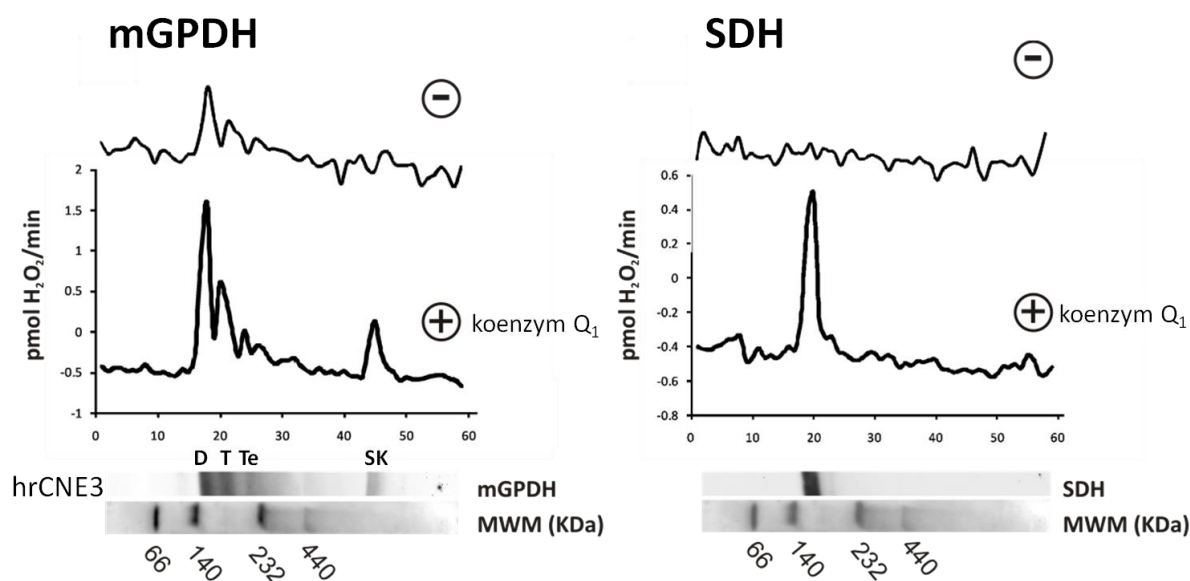
Obrázek 21: Různé formy proteinů dýchacího řetězce

Vzorek mitochondrií solubilizovaných digitoninem 2g/g proteinu byl separován nejprve pomocí nativní elektroforézy hrCNE3, v druhém rozměru pak pomocí 10% SDS elektroforézy. Po přenesení proteinů na PVDF membránu pomocí Western blotu byly detekovány enzymy dýchacího řetězce pomocí specifických protilátek. (A) signál mGPDH, (B) signál komplexů I až V. (C) počítačová analýza překryvu signálů.

5.3.3 Produkce reaktivních forem kyslíku izolovaným enzymem

Separace enzymů pomocí nativní elektroforézy umožňuje studovat izolované proteiny v gelu. Za využití této techniky jsme vyvinuli metodu, jak zkoumat produkci reaktivních forem kyslíku izolovanými proteiny (obrázek 22).

Vzorky solubilizovaných mitochondrií s koncentrací detergentu 2 g/g proteinu byly separovány hrCNE3 nativním gelem. Část gelu byla využita pro Western blot detekci specifickými protilátkami, což je ukázáno jako proužek gelu pod grafem. Stejně široký proužek gelu pak byl nakrájen na 1 mm dlouhé fragmenty a v každém pak byla detekována produkce reaktivních forem kyslíku. Měření produkce peroxidu vodíku ukázalo, že gelem izolované enzymy mGPDH a SDH jsou schopny vytvářet reaktivní formy kyslíku. Opět se potvrdilo, že v nativním gelu zůstává aktivita enzymů měřitelná, u mGPDH dokonce bez přidání koenzymu Q₁. Avšak po přidání molekul koenzymu Q₁ do systému se produkce superoxidu u mGPDH ještě zvýšila a u SDH se stala měřitelnou. Koenzym Q₁ mohl usnadnit překonání difúzní bariéry gelu, ale především došlo v důsledku přidání hydrofilního koenzymu Q₁ k usnadnění úniku elektronů. Navíc jsme i zde opět detekovali



Obrázek 22: Produkce reaktivních forem kyslíku izolovanými enzymy mGPDH a SDH

Vzorky mitochondrií solubilizované digitoninem 2 g/g proteinu byly separovány pomocí nativní elektroforézy hrCNE3. Část gelu byla využita pro detekci pomocí specifické protilátky, část pak pro měření produkce reaktivních forem kyslíku s Amplex UltraRed (50 μM) a křenovou peroxidázou (1 U/ml). Pro stimulaci měření byl přidáván koenzym Q₁ (12 μM).

D – dimer, T – trimer, Te – tetramer, SK – superkomplex

vysokomolekulární funkční formu mGPDH, která je rovněž schopna produkce reaktivních forem kyslíku. Pro to svědčí skutečnost, že signály protilátek přesně odpovídají vrcholům grafu. Do systému byl přidáván pouze substrát daných dehydrogenáz, naměřená tvorba peroxidu vodíku je tedy způsobená pouze samotnými dehydrogenázami.

6 DISKUSE

Molekulární mechanismus produkce reaktivních forem kyslíku flavinovým dehydrogenázami je aktuální téma v oblasti studia mitochondriální energetiky, o čemž svědčí i velké množství publikací. Nejdůležitější poznatky z literatury pak byly stručně shrnuty v první části práce. Přestože o existenci kyslíkových radikálů víme již od roku 1956, stále ještě zůstává mnoho otázek nezodpovězeno, naopak s pokračujícím výzkumem a vylepšováním dostupných technik se objevují nové. Zatímco například produkce komplexem III je již delší dobu popsána a víme, že souvisí s produkcí semichinonu v Q cyklu (Turrens *et al.*, 1985, Boveris *et al.*, 1976), konkrétní mechanismus dosud není znám. Ještě komplikovanější je pak tvorba superoxidu či peroxidu vodíku komplexem I, což souvisí se složitostí molekuly. Bylo navrženo hned několik kandidátních míst (Genova *et al.*, 2001, Kushnareva *et al.*, 2002, Esterhazy *et al.*, 2008), ale v souladu s publikovanými pracemi není vyloučeno, že za různých situací a podmínek pokusu dochází k produkci superoxidu na různých místech enzymu. Sukcinát dehydrogenáza a mitochondriální glycerol-3-fosfát dehydrogenáza jsou pravděpodobně spíše minoritní producenti, ovšem za různých patofyziologických podmínek může podíl reaktivních forem kyslíku produkovaných těmito enzymy hrát významnou roli. Na příkladu sukcinát dehydrogenázy je také ukázáno, jak moc může záležet na experimentálních podmínkách měření (Quinlan *et al.*, 2012).

Praktická část práce se zaměřila právě na studium mechanismu produkce reaktivních forem kyslíku u SDH a mGPDH na modelu solubilizovaných mitochondrií z hnědé tukové tkáně potkana. Solubilizace mitochondriálních membrán umožnila snadnější přístup ke studiu těchto izolovaných enzymů. Měření enzymových aktivit v supernatantu a sedimentu po solubilizaci naznačují, že určitá část enzymů zůstává i v sedimentu, avšak toto množství se v zásadě nemění s rostoucí koncentrací detergentu. V souladu s dřívějšími pracemi (Cottingham a Ragan, 1980) je pak pozorování částečné inaktivace obou dehydrogenáz po solubilizaci, více pak v případě mGPDH. Navíc jsme ukázali, že v průběhu solubilizace dochází ke ztrátě molekul koenzymu Q nezbytných pro funkci dýchacího řetězce, jelikož přidání koenzymu Q₁ do systému dokáže obě dehydrogenázy reaktivovat (obrázek 13). Experimenty naznačují, že mGPDH má vyšší afinitu ke koenzymu Q a méně jej ztrácí z kontaktu.

Pro studium produkce reaktivních forem kyslíku je však solubilizace vhodnou metodou studia, jelikož takto lze oddělit příspěvek ostatních komplexů dýchacího řetězce k této tvorbě. To bylo ukázáno měřeními s inhibitory myxothiazolem a atpeninem A5, kde byl odbourán příspěvek komplexu II, o kterém hovoří literatura (Quinlan *et al.*, 2012, Orr *et al.*, 2012). Především v případě mGPDH bylo ukázáno, že za produkci je zodpovědná samotná dehydrogenáza (obrázky 15 a 18D). Výsledky ukazují, že zvyšující se koncentrace detergentu způsobuje větší únik elektronů v případě mGPDH a SDH při použití nízké koncentrace substrátu (obrázek 14). Přidávání koenzymu Q pozorované množství peroxidu vodíku u mGPDH snižuje, ale v případě SDH záleží tento efekt na použité koncentraci substrátu. Zatímco za saturační koncentrace došlo k nárůstu peroxidu vodíku, za nízké koncentrace byl pozorován antioxidační efekt stejně jako u mGPDH (obrázek 16). Koenzym Q způsobuje opětovné propojení dýchacího řetězce, tedy odebrání elektronů z dehydrogenáz, které pak nejsou tolik náchylné k úniku elektronů na kyslík za vzniku superoxidu. Tento antioxidační efekt byl narušen myxothiazolem, tudíž přenos elektronů od dehydrogenáz na komplex III je nezbytným krokem pro roli koenzymu Q jako antioxidantu (obrázek 17). Prooxidační efekt v případě saturační koncentrace substrátu u SDH nejspíše uvolňuje „přetlak“ elektronů na tomto enzymu, avšak ne všechny elektrony jsou zpracovány komplexem III, tudíž jejich malá část může reagovat s kyslíkem.

Měření s arteficiálními akceptory elektronů potvrzují, že produkce reaktivních forem kyslíku enzymem mGPDH je pro tento protein specifická a odlišuje se od ostatních komplexů dýchacího řetězce, což nejspíše souvisí i s odlišným mechanismem katalýzy. Přestože HAR i FeCN jsou jednoelektronovými akceptory (viz 2.4), pouze přidání FeCN indukuje záblesk luminolu, což svědčí pro odlišný mechanismus působení obou akceptorů. FeCN nejspíše odebírá elektron v takovém místě enzymu, kde dochází ke vzniku reaktivního intermediátu. Navíc měření s koktejlem inhibitorů komplexů I, II a III dokazuje, že za únik elektronů je zodpovědná pouze mGPDH.

Odlišný mechanismus produkce reaktivních forem kyslíku naznačuje i měření s inhibitorem HQNO (obrázek 19). Ten nemá vliv na SDH, ale u mGPDH produkci měřeného peroxidu vodíku výrazně snižuje. Jelikož se jedná o obecný inhibitor místa vázající koenzym Q (Kogut a Lightbown, 1962), bylo nezbytné využít solubilizované mitochondrie, u kterých by se vyloučil vliv těchto míst u ostatních komplexů dýchacího řetězce. Naměřené snížení produkce v důsledku přidání HQNO pak dokazuje, že Q vazebné místo u enzymu mGPDH je

zodpovědné za únik elektronů a má přímý vliv na produkci kyslíkových radikálů. U SDH pak tento výsledek souhlasí s navrženým flavinem (Quinlan *et al.*, 2012), jakožto místem úniku elektronů z komplexu II.

Konkrétní mechanismus produkce reaktivních forem kyslíku u mGPDH však stále zůstává otázkou. Tento enzym má relativně jednoduchou strukturu a nejspíše pouze flavin, jako jediné místo schopné odebírat elektrony od substrátu. U bakteriálního analogu, u kterého je katalytické místo relativně konzervováno, byl navržen ping pongový mechanismus katalýzy (Yeh *et al.*, 2008), u kterého se na tomtéž místě střídá glycerol-3-fosfát s koenzymem Q, avšak tyto molekuly přicházejí každá z jiné strany – GP ze strany mezimembránového prostoru, koenzym Q se pak nachází uvnitř membrány. Navíc Q vazebné místo u mGPDH není na rozdíl od stejného místa u SDH nijak významně chráněno aminokyselinovými zbytky, jedná se spíše o planární oblast molekuly (Mracek *et al.*, 2013), která interaguje s lipidy v membráně. Podobný tvar molekuly má i ETF:ubichinon oxidoreduktáza (Zhang *et al.*, 2006), která byla také identifikována jako producent reaktivních forem kyslíku v mitochondriích (Seifert *et al.*, 2010). Koenzym Q může od dehydrogenázy snadno přijmout pouze jeden elektron a stát se tak náchylným k jeho ztrátě, což bylo uměle vyvoláno i přítomností ferrikyanidu, který jeden elektron odebírá a dokud není z flavinu odebrán i druhý elektron, nemůže dojít k dalšímu cyklu oxidace glycerol-3-fosfátu. Tento elektron by tedy mohl snadno být odstraněn endogenním koenzymem Q za vzniku semichinonového radikálu, který způsobil přenos tohoto elektronu na molekulu kyslíku. Popsaný mechanismus vysvětluje i pozorovanou produkci superoxidu na obě strany membrány (Miwa a Brand, 2005), přestože samotný enzym skrz membránu neprochází.

Mitochondriální glycerol-3-fosfát dehydrogenáza vytváří několik funkčních forem. Běžně existuje jako dimer, trimer a tetramer a pomocí nativní elektroforézy byla ukázána i její asociace do vysokomolekulárních struktur (Cottingham a Ragan, 1980). Všechny tyto oligomery jsou navíc v gelu enzymaticky aktivní, dokonce schopné produkce reaktivních forem kyslíku. Existence superkomplexů ostatních enzymů dýchacího řetězce je běžně akceptována (Acin-Perez *et al.*, 2008, Schagger, 2002), proto nás zajímalo, zda může mGPDH také interagovat s ostatními komponentami dýchacího řetězce. Žádná přímá interakce s těmito komplexy však prokázána nebyla (obrázek 21). mGPDH tedy může vytvářet homooligomery nebo specifické superkomplexy s jinými mitochondriálními proteiny podobně jako v případě dehydrogenasomu popsaného u bakterií (Grandier-Vazeille *et al.*,

2001). Pro další potvrzení nebo vyvrácení interakčních partnerů by byla vhodná analýza proužků gelu pomocí hmotnostní spektrometrie nebo imunoprecipitace proti mGPDH. Jelikož nebyla zjištěna interakce mGPDH s komplexem III, molekuly koenzymu Q nejsou uzavřeny v tomto superkomplexu a mohou způsobovat únik elektronů za vzniku reaktivních forem kyslíku (Lenaz *et al.*, 2007).

Oba enzymy mGPDH i SDH jsou schopny nezávislé produkce reaktivních forem kyslíku, což ukázala měření s izolovanými enzymy v gelu (obrázek 22). mGPDH dokáže indukovat tvorbu peroxidu vodíku i bez endogenního koenzymu Q, SDH až po jeho přidání do roztoku. To je ale v souladu s předchozím pozorováním snadnější ztráty molekul koenzymu Q z tohoto enzymu v průběhu solubilizace (obrázky 12 a 13). Naopak bylo ukázáno, že i vyšší detekované formy mGPDH jsou schopny produkce reaktivních forem kyslíku.

Tato práce se zaměřila na studium mechanismu produkce reaktivních forem kyslíku u enzymů mGPDH a SDH. Solubilizace a tedy zamezení toku elektronů dýchacím řetězcem vede ke zvyšujícímu se množství této produkce. Potvrdili jsme, že flavinové místo v SDH je pravděpodobně zodpovědné za vznik kyslíkových radikálů v souladu s publikovanými pozorováními (Quinlan *et al.*, 2012), u mGPDH bylo navrženo místo vázající molekuly koenzymu Q. Pomocí nativních elektroforéz bylo navíc ukázáno, že mGPDH dokáže vytvářet homooligomerní a vysokomolekulární komplexy, které jsou navíc enzymaticky aktivní a představují tak přirozenou složku membrán.

7 ZÁVĚRY

Tato diplomová práce studovala vliv solubilizace na mitochondriální membrány a upřesnila některé detaily molekulárního mechanismu produkce reaktivních forem kyslíku u flavinových dehydrogenáz mGPDH a SDH. Konkrétně pak bylo ukázáno, že:

- Integrita dýchacího řetězce je po solubilizaci narušena především díky ztrátě koenzymu Q
- Nativní mGPDH má vyšší afinitu ke koenzymu Q než SDH
- Solubilizace membrán vede ke zvýšení produkce kyslíkových radikálů u mGPDH; u SDH je obdobný efekt pozorován pouze při nízké koncentraci substrátu
- Přidání koenzymu Q působí na mGPDH antioxidantně, zatímco účinek na SDH závisí na koncentraci substrátu
- Izolovaná mGPDH je schopna nezávislé produkce reaktivních forem kyslíku
- Flavin je zdrojem úniku elektronů u SDH, zatímco v případě mGPDH je za produkci reaktivních forem kyslíku zodpovědné místo vázající koenzym Q
- mGPDH tvoří homooligomery a specifické superkomplexy
- Izolované proteiny mGPDH i SDH jsou schopny tvořit kyslíkové radikály; pouze u mGPDH k této tvorbě dochází i bez přidání koenzymu Q₁

8 SEZNAM LITERATURY

- ACIN-PEREZ, R., FERNANDEZ-SILVA, P., LUISA PELEATO, M., PEREZ-MARTOS, A. & ENRIQUEZ, J. A. 2008. Respiratory Active Mitochondrial Supercomplexes. *Molecular Cell*, 32, 529-539.
- BARADARAN, R., BERRISFORD, J. M., MINHAS, G. S. & SAZANOV, L. A. 2013. Crystal structure of the entire respiratory complex I. *Nature*, 494, 443-8.
- BLEIER, L. & DROSE, S. 2012. Superoxide generation by complex III: From mechanistic rationales to functional consequences. *Biochim Biophys Acta*.
- BOVERIS, A., CADENAS, E. & STOPPANI, A. O. M. 1976. Role of Ubiquinone in Mitochondrial Generation of Hydrogen-Peroxide. *Biochemical Journal*, 156, 435-444.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-54.
- CANNON, B. & LINDBERG, O. 1979. Mitochondria from brown adipose tissue: isolation and properties. *Methods Enzymol*, 55, 65-78.
- CAPALDI, R. A. 1982. Arrangement of Proteins in the Mitochondrial Inner Membrane. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 694, 291-306.
- COLLINSON, I. R., VANRAAIJ, M. J., RUNSWICK, M. J., FEARNLEY, I. M., SKEHEL, J. M., ORRISS, G. L., MIROUX, B. & WALKER, J. E. 1994. ATP Synthase from Bovine Heart Mitochondria. In vitro assembly of a stalk complex in the presence of F1-ATPase and in its absence. *Journal of Molecular Biology*, 242, 408-421.
- COTTINGHAM, I. R. & RAGAN, C. I. 1980. Purification and properties of L-3-glycerophosphate dehydrogenase from pig brain mitochondria. *Biochem J*, 192, 9-18.
- DAVIES, K. M., STRAUSS, M., DAUM, B., KIEF, J. H., OSIEWACZ, H. D., RYCOVSKA, A., ZICKERMANN, V. & KUHLBRANDT, W. 2011. Macromolecular organization of ATP synthase and complex I in whole mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 14121-14126.
- DOGAN, S. A. & TRIFUNOVIC, A. 2011. Modelling Mitochondrial Dysfunction in Mice. *Physiological Research*, 60, S61-S70.
- DRAHOTA, Z., CHOWDHURY, S. K. R., FLORYK, D., MRACEK, T., WILHELM, J., RAUCHOVA, H., LENAŽ, G. & HOUSTEK, J. 2002. Glycerophosphate-dependent hydrogen peroxide production by brown adipose tissue mitochondria and its activation by ferricyanide. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 34, 105-113.
- DROSE, S. & BRANDT, U. 2008. The mechanism of mitochondrial superoxide production by the cytochrome bc1 complex. *J Biol Chem*, 283, 21649-54.
- DUDKINA, N. V., SUNDERHAUS, S., BOEKEMA, E. J. & BRAUN, H. P. 2008. The higher level of organization of the oxidative phosphorylation system: mitochondrial supercomplexes. *J Bioenerg Biomembr*, 40, 419-24.
- ESTERHAZY, D., KING, M. S., YAKOVLEV, G. & HIRST, J. 2008. Production of reactive oxygen species by complex I (NADH : ubiquinone oxidoreductase) from Escherichia coli and comparison to the enzyme from mitochondria. *Biochemistry*, 47, 3964-3971.
- FATO, R., BERGAMINI, C., BORTOLUS, M., MANIERO, A. L., LEONI, S., OHNISHI, T. & LENAŽ, G. 2009. Differential effects of mitochondrial Complex I inhibitors on production of reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1787, 384-392.

- FRONCISZ, W., SCHOLES, C. P., HYDE, J. S., WEI, Y. H., KING, T. E., SHAW, R. W. & BEINERT, H. 1979. Hyperfine structure resolved by 2 to 4 GHz EPR of cytochrome c oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 254, 7482-7484.
- GALKIN, A. 2005. Superoxide Radical Formation by Pure Complex I (NADH:Ubiquinone Oxidoreductase) from *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 30129-30135.
- GENOVA, M. L., VENTURA, B., GIULIANO, G., BOVINA, C., FORMIGGINI, G., CASTELLI, G. P. & LENAZ, G. 2001. The site of production of superoxide radical in mitochondrial Complex I is not a bound ubisemiquinone but presumably iron-sulfur cluster N2. *Febs Letters*, 505, 364-368.
- GILLE, L. & NOHL, H. 2001. The Ubiquinol/bc1 Redox Couple Regulates Mitochondrial Oxygen Radical Formation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 388, 34-38.
- GNAIGER, E. 2001. Bioenergetics at low oxygen: dependence of respiration and phosphorylation on oxygen and adenosine diphosphate supply. *Respir Physiol*, 128, 277-97.
- GRANDIER-VAZEILLE, X., BATHANY, K., CHAIGNEPAIN, S., CAMOUGRAND, N., MANON, S. & SCHMITTER, J. M. 2001. Yeast mitochondrial dehydrogenases are associated in a supramolecular complex. *Biochemistry*, 40, 9758-69.
- GRAY, M. W. 1999. Mitochondrial Evolution. *Science*, 283, 1476-1481.
- GRIVENNIKOVA, V. G. & VINOGRADOV, A. D. 2013. Partitioning of superoxide and hydrogen peroxide production by mitochondrial respiratory complex I. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1827, 446-454.
- GUO, J. 2003. The Ubiquinone-binding Site of the *Saccharomyces cerevisiae* Succinate-Ubiquinone Oxidoreductase Is a Source of Superoxide. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 47629-47635.
- HAN, D., ANTUNES, F., CANALI, R., RETTORI, D. & CADENAS, E. 2003. Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 5557-5563.
- HAN, D., WILLIAMS, E. & CADENAS, E. 2001. Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. *Biochemical Journal*, 353, 411-416.
- HARMAN, D. 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journals of Gerontology*, 11, 298-300.
- HATEFI, Y. & STIGGALL, D. L. 1978. Preparation and properties of succinate: ubiquinone oxidoreductase (complex II). *Methods Enzymol*, 53, 21-7.
- HEIDE, H., BLEIER, L., STEGER, M., ACKERMANN, J., DROSE, S., SCHWAMB, B., ZORNIG, M., REICHERT, A. S., KOCH, I., WITTIG, I. & BRANDT, U. 2012. Complexome profiling identifies TMEM126B as a component of the mitochondrial complex I assembly complex. *Cell Metab*, 16, 538-49.
- HIONA, A. & LEEUWENBURGH, C. 2008. The role of mitochondrial DNA mutations in aging and sarcopenia: Implications for the mitochondrial vicious cycle theory of aging. *Experimental Gerontology*, 43, 24-33.
- HIRST, J. 2010. Towards the molecular mechanism of respiratory complex I. *Biochemical Journal*, 425, 327-339.
- HOPPINS, S., LACKNER, L. & NUNNARI, J. 2007. The Machines that Divide and Fuse Mitochondria. *Annual Review of Biochemistry*, 76, 751-780.

- HOUSTEK, J., CANNON, B. & LINDBERG, O. 1975. Glycerol-3-phosphate shuttle and its function in intermediary metabolism of hamster brown-adipose tissue. *European Journal of Biochemistry*, 54, 11-18.
- HUNTE, C., ZICKERMANN, V. & BRANDT, U. 2010. Functional Modules and Structural Basis of Conformational Coupling in Mitochondrial Complex I. *Science*, 329, 448-451.
- CHRETIEN, D., RUSTIN, P., BOURGERON, T., ROTIG, A., SAUDUBRAY, J. M. & MUNNICH, A. 1994. Reference charts for respiratory chain activities in human tissues. *Clinica Chimica Acta*, 228, 53-70.
- ISHIHARA, H., NAKAZAKI, M., KANEGAE, Y., INUKAI, K., ASANO, T., KATAGIRI, H., YAZAKI, Y., KIKUCHI, M., MIYAZAKI, J., SAITO, I. & OKA, Y. 1996. Effect of mitochondrial and/or cytosolic glycerol S-phosphate dehydrogenase overexpression on glucose-stimulated insulin secretion from MIN6 and HIT cells. *Diabetes*, 45, 1238-1244.
- ISHII, N., FUJII, M., HARTMAN, P. S., TSUDA, M., YASUDA, K., SENOO-MATSUDA, N., YANASE, S., AYUSAWA, D. & SUZUKI, K. 1998. A mutation in succinate dehydrogenase cytochrome b causes oxidative stress and ageing in nematodes. *Nature*, 394, 694-697.
- JESINA, P., KHOLOVA, D., BOLEHOVSKA, R., CERVINKOVA, Z., DRAHOTA, Z. & HOUSTEK, J. 2004. Glycerophosphate-dependent hydrogen peroxide production by rat liver mitochondria. *Physiological Research*, 53, 305-310.
- KOGUT, M. & LIGHTBOWN, J. W. 1962. Selective inhibition by 2-heptyl-4-hydroxyquinoline N-oxide of certain oxidation-reduction reactions. *Biochem J*, 84, 368-82.
- KOKOSZKA, J. E., COSKUN, P., ESPOSITO, L. A. & WALLACE, D. C. 2001. Increased mitochondrial oxidative stress in the Sod2 (+/-) mouse results in the age-related decline of mitochondrial function culminating in increased apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 2278-2283.
- KUJOTH, G. C., HIONA, A., PUGH, T. D., SOMEYA, S., PANZER, K., WOHLGEMUTH, S. E., HOFER, T., SEO, A. Y., SULLIVAN, R., JOBLING, W. A., MORROW, J. D., VAN REMMEN, H., SEDIVY, J. M., YAMASOBA, T., TANOKURA, M., WEINDRUCH, R., LEEUWENBURGH, C. & PROLLA, T. A. 2005. Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science*, 309, 481-484.
- KUSHNAREVA, Y., MURPHY, A. N. & ANDREYEV, A. 2002. Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)(+) oxidation-reduction state. *Biochemical Journal*, 368, 545-553.
- KUSSMAUL, L. & HIRST, J. 2006. The mechanism of superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 7607-7612.
- LAMBERT, A. J. & BRAND, M. D. 2004. Superoxide production by NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) depends on the pH gradient across the mitochondrial inner membrane. *Biochemical Journal*, 382, 511-517.
- LANCIANO, P., KHALFAOUI-HASSANI, B., SELAMOGLU, N., GHELLI, A., RUGOLO, M. & DALDAL, F. 2013. Molecular mechanisms of superoxide production by complex III: A bacterial versus human mitochondrial comparative case study. *Biochim Biophys Acta*.

- LAPUENTE-BRUN, E., MORENO-LOSHUERTOS, R., ACIN-PEREZ, R., LATORRE-PELLICER, A., COLAS, C., Balsa, E., PERALES-CLEMENTE, E., QUIROS, P. M., CALVO, E., RODRIGUEZ-HERNANDEZ, M. A., NAVAS, P., CRUZ, R., CARRACEDO, A., LOPEZ-OTIN, C., PEREZ-MARTOS, A., FERNANDEZ-SILVA, P., FERNANDEZ-VIZARRA, E. & ENRIQUEZ, J. A. 2013. Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain. *Science*, 340, 1567-70.
- LARSEN, N. B., RASMUSSEN, M. & RASMUSSEN, L. J. 2005. Nuclear and mitochondrial DNA repair: similar pathways? *Mitochondrion*, 5, 89-108.
- LASS, A. & SOHAL, R. S. 1999. Comparisons of coenzyme Q bound to mitochondrial membrane proteins among different mammalian species. *Free Radic Biol Med*, 27, 220-6.
- LEE, D. W., SELAMOGLU, N., LANCIANO, P., COOLEY, J. W., FORQUER, I., KRAMER, D. M. & DALDAL, F. 2011. Loss of a conserved tyrosine residue of cytochrome b induces reactive oxygen species production by cytochrome bc1. *J Biol Chem*, 286, 18139-48.
- LENAZ, G., FATO, R., FORMIGGINI, G. & GENOVA, M. L. 2007. The role of Coenzyme Q in mitochondrial electron transport. *Mitochondrion*, 7 Suppl, S8-33.
- MACDONALD, M. J. & BROWN, L. J. 1996. Calcium activation of mitochondrial glycerol phosphate dehydrogenase restudied. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 326, 79-84.
- MARANZANA, E., BARBERO, G., FALASCA, A. I., LENAZ, G. & GENOVA, M. L. 2013. Mitochondrial Respiratory Supercomplex Association Limits Production of Reactive Oxygen Species from Complex I. *Antioxid Redox Signal*.
- MARGULIS, L. 1975. Symbiotic theory of the origin of eukaryotic organelles; criteria for proof. *Symp Soc Exp Biol*, 21-38.
- MCBRIDE, H. M., NEUSPIEL, M. & WASIAK, S. 2006. Mitochondria: More than just a powerhouse. *Current Biology*, 16, R551-R560.
- MCCORD, J. M. & FRIDOVIC, I. 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*, 244, 6049-&.
- MEGLASSON, M. D., SMITH, K. M., NELSON, D. & ERECINSKA, M. 1989. Alpha-Glycerophosphate shuttle in a clonal beta-cell line. *American Journal of Physiology*, 256, E173-E178.
- MITTAL, C. K. & MURAD, F. 1977. Activation of guanylate cyclase by superoxide dismutase and hydroxyl radical: a physiological regulator of guanosine 3',5'-monophosphate formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74, 4360-4364.
- MIWA, S. & BRAND, M. D. 2005. The topology of superoxide production by complex III and glycerol 3-phosphate dehydrogenase in *Drosophila* mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1709, 214-219.
- MIYADERA, H., SHIOMI, K., UI, H., YAMAGUCHI, Y., MASUMA, R., TOMODA, H., MIYOSHI, H., OSANAI, A., KITA, K. & OMURA, S. 2003. Atpenins, potent and specific inhibitors of mitochondrial complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 473-7.
- MORENO-SANCHEZ, R., HERNANDEZ-ESQUIVEL, L., RIVERO-SEGURA, N. A., MARIN-HERNANDEZ, A., NEUZIL, J., RALPH, S. J. & RODRIGUEZ-ENRIQUEZ, S. 2013. Reactive oxygen species are generated by the respiratory

- complex II--evidence for lack of contribution of the reverse electron flow in complex I. *FEBS J*, 280, 927-38.
- MRACEK, T., DRAHOTA, Z. & HOUSTEK, J. 2013. The function and the role of the mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase in mammalian tissues. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1827, 401-410.
- MRACEK, T., JESINA, P., KRIVAKOVA, P., BOLEHOVSKA, R., CERVINKOVA, Z., DRAHOTA, Z. & HOUSTEK, J. 2005. Time-course of hormonal induction of mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase biogenesis in rat liver. *Biochim Biophys Acta*, 1726, 217-23.
- MRÁČEK, T., PECINOVÁ, A., VRBACKÝ, M., DRAHOTA, Z. & HOUŠTĚK, J. 2009. High efficiency of ROS production by glycerophosphate dehydrogenase in mammalian mitochondria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 481, 30-36.
- MULLER, F., CROFTS, A. R. & KRAMER, D. M. 2002. Multiple Q-cycle bypass reactions at the Q(o) site of the cytochrome bc(1) complex. *Biochemistry*, 41, 7866-7874.
- MULLER, F. L. 2004. Complex III Releases Superoxide to Both Sides of the Inner Mitochondrial Membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 49064-49073.
- MULLER, FLORIAN L., LIU, Y., ABDUL-GHANI, MUHAMMAD A., LUSTGARTEN, MICHAEL S., BHATTACHARYA, A., JANG, YOUNGMOK C. & VAN REMMEN, H. 2008. High rates of superoxide production in skeletal-muscle mitochondria respiring on both complex I- and complex II-linked substrates. *Biochemical Journal*, 409, 491.
- MURPHY, MICHAEL P. 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, 417, 1.
- NACHLAS, M. M., MARGULIES, S. I. & SELIGMAN, A. M. 1960. A colorimetric method for the estimation of succinic dehydrogenase activity. *J Biol Chem*, 235, 499-503.
- NELSON, D. L. & COX, M. M. 2005. *Lehninger Principles of Biochemistry*, New York, Freeman.
- OHNISHI, S. T., SHINZAWA-ITOH, K., OHTA, K., YOSHIKAWA, S. & OHNISHI, T. 2010. New insights into the superoxide generation sites in bovine heart NADH-ubiquinone oxidoreductase (Complex I): The significance of protein-associated ubiquinone and the dynamic shifting of generation sites between semiflavin and semiquinone radicals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1797, 1901-1909.
- OHNISHI, T. 1998. Iron-sulfur clusters semiquinones in Complex I. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1364, 186-206.
- ORR, A. L., QUINLAN, C. L., PEREVOSHCHIKOVA, I. V. & BRAND, M. D. 2012. A refined analysis of superoxide production by mitochondrial sn-glycerol 3-phosphate dehydrogenase. *J Biol Chem*, 287, 42921-35.
- OYEDOTUN, K. S. 2001. The Quinone-binding Sites of the *Saccharomyces cerevisiae* Succinate-ubiquinone Oxidoreductase. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 16936-16943.
- PARANAGAMA, M. P., SAKAMOTO, K., AMINO, H., AWANO, M., MIYOSHI, H. & KITA, K. 2010. Contribution of the FAD and quinone binding sites to the production of reactive oxygen species from *Ascaris suum* mitochondrial complex II. *Mitochondrion*, 10, 158-65.
- PERKINS, G. 2001. Electron tomography of mitochondria after the arrest of protein import associated with Tom19 depletion. *European Journal of Cell Biology*, 80, 139-150.

- QUINLAN, C. L., GERENCSEK, A. A., TREBERG, J. R. & BRAND, M. D. 2011. The mechanism of superoxide production by the antimycin-inhibited mitochondrial Q-cycle. *J Biol Chem*, 286, 31361-72.
- QUINLAN, C. L., ORR, A. L., PEREVOSHCHIKOVA, I. V., TREBERG, J. R., ACKRELL, B. A. & BRAND, M. D. 2012. Mitochondrial complex II can generate reactive oxygen species at high rates in both the forward and reverse reactions. *J Biol Chem*, 287, 27255-64.
- RADI, R., TURRENS, J. F., CHANG, L. Y., BUSH, K. M., CRAPO, J. D. & FREEMAN, B. A. 1991. Detection of catalase in rat heart mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 266, 22028-22034.
- RAHA, S., MCEACHERN, G. E., MYINT, A. T. & ROBINSON, B. H. 2000. Superoxides from mitochondrial complex III: The role of manganese superoxide dismutase. *Free Radical Biology and Medicine*, 29, 170-180.
- REXROTH, S., POETSCH, A., ROGNER, M., HAMANN, A., WERNER, A., OSIEWACZ, H. D., SCHAFER, E. R., SEELERT, H. & DENCHER, N. A. 2012. Reactive oxygen species target specific tryptophan site in the mitochondrial ATP synthase. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1817, 381-387.
- ROTTENBERG, H., COVIAN, R. & TRUMPOWER, B. L. 2009. Membrane potential greatly enhances superoxide generation by the cytochrome bc1 complex reconstituted into phospholipid vesicles. *J Biol Chem*, 284, 19203-10.
- SACKTOR, B. & COCHRAN, D. G. 1958. The respiratory metabolism of insect flight muscle. I. Manometric studies of oxidation and concomitant phosphorylation with sarcosomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 74, 266-276.
- SEIFERT, E. L., ESTEY, C., XUAN, J. Y. & HARPER, M. E. 2010. Electron transport chain-dependent and -independent mechanisms of mitochondrial H₂O₂ emission during long-chain fatty acid oxidation. *J Biol Chem*, 285, 5748-58.
- SHAPIRA, Y., HAREL, S. & RUSSELL, A. 1977. Mitochondrial encephalomyopathies: a group of neuromuscular disorders with defects in oxidative metabolism. *Isr J Med Sci*, 13, 161-4.
- SCHAGGER, H. 2002. Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria. *Biochim Biophys Acta*, 1555, 154-9.
- SCHOLZ, P. M., RABINDRANATH, P., NAIM, K. L., WEISS, H. R. & TSE, J. 1997. The negative functional and metabolic effects of muscarinic stimulation are enhanced by beta-adrenergic activation in control and hypertrophic dog hearts in vivo. *Basic Research in Cardiology*, 92, 391-401.
- SCHON, E. A., DIMAURO, S. & HIRANO, M. 2012. Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations. *Nat Rev Genet*, 13, 878-90.
- SIEBELS, I. & DROSE, S. 2013. Q-site inhibitor induced ROS production of mitochondrial complex II is attenuated by TCA cycle dicarboxylates. *Biochim Biophys Acta*, 1827, 1156-1164.
- SLANE, B. G. 2006. Mutation of Succinate Dehydrogenase Subunit C Results in Increased O₂·, Oxidative Stress, and Genomic Instability. *Cancer Research*, 66, 7615-7620.
- SLED, V. D. & VINOGRADOV, A. D. 1993. Kinetics of the mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase interaction with hexammineruthenium(III). *Biochim Biophys Acta*, 1141, 262-8.
- SOUSA, P. M., SILVA, S. T., HOOD, B. L., CHARRO, N., CARITA, J. N., VAZ, F., PENQUE, D., CONRADS, T. P. & MELO, A. M. 2011. Supramolecular

- organizations in the aerobic respiratory chain of *Escherichia coli*. *Biochimie*, 93, 418-25.
- ST-PIERRE, J. 2002. Topology of Superoxide Production from Different Sites in the Mitochondrial Electron Transport Chain. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 44784-44790.
- STANIEK, K. & NOHL, H. 2000. Are mitochondria a permanent source of reactive oxygen species? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*.
- STARKOV, A. A. & FISKUM, G. 2001. Myxothiazol Induces H₂O₂ Production from Mitochondrial Respiratory Chain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 281, 645-650.
- STOCK, D., LESLIE, A. G. W. & WALKER, J. E. 1999. Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science*, 286, 1700-1705.
- SUN, F., HUO, X., ZHAI, Y., WANG, A., XU, J., SU, D., BARTLAM, M. & RAO, Z. 2005. Crystal Structure of Mitochondrial Respiratory Membrane Protein Complex II. *Cell*, 121, 1043-1057.
- SWIERCZYNSKI, J., SCISLOWSKI, P. & ALEKSANDROWICZ, Z. 1976. High activity of alpha-glycerophosphate oxidation by human placental mitochondria. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 429, 46-54.
- TREBERG, J. R., QUINLAN, C. L. & BRAND, M. D. 2011. Evidence for Two Sites of Superoxide Production by Mitochondrial NADH-Ubiquinone Oxidoreductase (Complex I). *Journal of Biological Chemistry*, 286, 27103-27110.
- TRETTNER, L. & ADAM-VIZI, V. 2004. Generation of reactive oxygen species in the reaction catalyzed by alpha-ketoglutarate dehydrogenase. *J Neurosci*, 24, 7771-8.
- TRIFUNOVIC, A., WREDENBERG, A., FALKENBERG, M., SPELBRINK, J. N., ROVIO, A. T., BRUDER, C. E., BOHLOOLY-Y, M., GIDLOF, S., OLDFORS, A., WIBOM, R., TORNELL, J., JACOBS, H. T. & LARSSON, N. G. 2004. Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature*, 429, 417-423.
- TURRENS, J. F., ALEXANDRE, A. & LEHNINGER, A. L. 1985. Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 237, 408-414.
- VAN GELDER, B. F. & BEINERT, H. 1969. Studies of the heme components of cytochrome c oxidase by EPR spectroscopy. *Biochim Biophys Acta*, 189, 1-24.
- VERMULST, M., BIELAS, J. H., KUJOTH, G. C., LADIGES, W. C., RABINOVITCH, P. S., PROLLA, T. A. & LOEB, L. A. 2007. Mitochondrial point mutations do not limit the natural lifespan of mice. *Nature Genetics*, 39, 540-543.
- VINOGRADOV, A. D., GAVRIKOVA, E. V. & GOLOVESHKINA, V. G. 1975. A new ferricyanide reactive site in soluble succinate dehydrogenase. *Biochem Biophys Res Commun*, 65, 1264-9.
- VRBACKY, M., DRAHOTA, Z., MRACEK, T., VOJTISKOVA, A., JESINA, P., STOPKA, P. & HOUSTEK, J. 2007. Respiratory chain components involved in the glycerophosphate dehydrogenase-dependent ROS production by brown adipose tissue mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1767, 989-997.
- WANG, Y., MOHSEN, A. W., MIHALIK, S. J., GOETZMAN, E. S. & VOCKLEY, J. 2010. Evidence for physical association of mitochondrial fatty acid oxidation and oxidative phosphorylation complexes. *J Biol Chem*, 285, 29834-41.
- WILHELM, J. & VILIM, V. 1986. Variables in xanthine oxidase-initiated luminol chemiluminescence: implications for chemiluminescence measurements in biological systems. *Anal Biochem*, 158, 201-10.

- WILSON, E. J. & MCMURRAY, W. C. 1981. Regulation of malic enzyme and mitochondrial alpha-glycerophosphate dehydrogenase by thyroid hormones, insulin, and glucocorticoids in cultured hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 256, 1657-1662.
- WITTIG, I., CARROZZO, R., SANTORELLI, F. M. & SCHAGGER, H. 2006. Supercomplexes and subcomplexes of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta*, 1757, 1066-72.
- WITTIG, I. & SCHAGGER, H. 2009. Native electrophoretic techniques to identify protein-protein interactions. *Proteomics*, 9, 5214-23.
- YAKES, F. M. & VANHOUTEN, B. 1997. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 514-519.
- YANKOVSKAYA, V. 2003. Architecture of Succinate Dehydrogenase and Reactive Oxygen Species Generation. *Science*, 299, 700-704.
- YEH, J. I., CHINTE, U. & DU, S. 2008. Structure of glycerol-3-phosphate dehydrogenase, an essential monotopic membrane enzyme involved in respiration and metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 3280-3285.
- ZHANG, J., FRERMAN, F. E. & KIM, J. J. 2006. Structure of electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase and electron transfer to the mitochondrial ubiquinone pool. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 16212-7.
- ZHANG, L., YU, L. D. & YU, C. A. 1998. Generation of superoxide anion by succinate-cytochrome c reductase from bovine heart mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 33972-33976.