Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie
Studijní program: Chemie
Studijní obor: Biochemie

Bc. Kateřina Kedrová

Dopad izolovaného deficitu F_1F_O-ATPsyntázy na ostatní komplexy oxidační fosforylace v kožních fibroblastech v závislosti na podmínkách kultivace

Impact of isolated deficiency of F_1F_O-ATPsynthase on other complexes of oxidative phosphorylation in skin fibroblasts depending on culture conditions

Diplomová práce

Vedoucí práce: Prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Konzultant: RNDr. Hana Hansíková, CSc.

Praha, 2014

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, 2014

Podpis

Poděkování

Děkuji RNDr. Haně Hansíkové, CSc. a zejména Ing. Markétě Tesařové Ph.D. za odborné vedení při práci v laboratoři a neocenitelné rady při sepisování této diplomové práce. Za odbornou pomoc s prací v laboratoři a trpělivost s jakou mi pomáhala naučit se použitým metodám bych chtěla ještě poděkovat Mgr. Hance Kratochvílové. Dále také děkuji prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. zastupující katedru biochemie PřF UK v Praze za cenné připomínky při sepisování této diplomové práce.

Nakonec bych chtěla poděkovat skupině pracovníků Laboratoře pro studium mitochondriálních poruch (Klinika dětského a dorostového lékařství 1.LF UK a VFN) za vytvoření příjemně přátelské atmosféry, své rodině a partnerovi za jejich podporu po celou dobu mého studia.

Tato diplomová práce byla podpořena výzkumným projektem IGA MZd ČR NT 13114-4/2012 a PRVOUK P24/LF1/3.

Obsah

Abstract 1

Abstrakt 2

1 Úvod 4

1.1 Mitochondrie 4

1.1.1 Mitochondriální genom 4

1.2 Komplexy systému oxidační fosforylace 5

1.3 F_1F_O-ATPsyntáza 7

1.3.1 Struktura a topologie F_1F_O-ATPsyntázy 8

1.3.2 Biogeneze F_1F_O-ATPsyntázy 9

1.3.3 Supramolekulární struktury F_1F_O-ATPsyntázy ve vnitřní mitochondriální membráně 11

1.3.4 Mechanismus syntézy a hydrolýzy ATP F_1F_O-ATPsyntázou 12

1.4 Syntéza ATP jako zdroje energie pro buněčné procesy 15

1.5 Mitochondriální onemocnění 18

1.5.1 Izolovaný deficit F_1F_O-ATPsyntázy 19

2 Cíl práce 26

3 Materiál a metody 27

3.1 Materiál 27

3.1.1 Biologický materiál 27

3.1.2 Chemikálie 27

3.1.3 Použité přístroje 31

3.2 Metody 32

3.2.1 Práce s tkáňovými kulturami 32

3.2.2 Analýza množství podjednotek a celých komplexů oxidační fosforylace a dalších mitochondriálních proteinů pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu

v prostředí dodecylsulfátu sodného („SDS-PAGE“), modré nativní elektrofézy v polyakrylamidovém gelu („BN-PAGE“), „Western blotu“ a imunodetekce 36

4 Výsledky 41

4.1 Charakterizace růstu a stanovení vlivu délky kultivace na rovnovážné množství vybraných podjednotek komplexů oxidační fosforylace, fumarázy a porinu u primárních kožních fibroblastů s primárním deficitem F_1F_O-ATPsyntázy v médiu Leibovitz obsahujícím a neobsahujícím L-glutamin 41

4.2 Stanovení rovnovážného množství vybraných podjednotek komplexů oxidační fosforylace, fumarázy, porinu a podjednotek komplexu pyruvátdehydrogenázy ve 2 liniích primárních kožních fibroblastů s deficitem F_1F_O-ATPsyntázy ve 4 vybraných kultivačních médiích 49

4.3 Analýza mitochondriální sítě ve 2 liniích primárních kožních fibroblastů s deficitem F_1F_O-ATPsyntázy ve 4 vybraných kultivačních médiích 61

4.4 Stanovení rovnovážného množství komplexů oxidační fosforylace v linii kožních fibroblastů s izolovaným deficitem F_1F_O-ATPsyntázy způsobeným mutací v *TMEM70* po 5 dnech kultivace ve 4 vybraných médiích 65

5 Diskuze 70

6 Souhrn 77

Abstract

Isolated deficiency of F_1F_O-ATPsynthase is a soubgroup of mitochondrial diseases caused by mutations in nuclear and mitochondrial-encoded structural subunits, or nuclear-encoded assembly factors of F_1F_O-ATPsynthase. The most often mutations are found in a *MTATP6* gene localized in the mitochondrial DNA and a *TMEM70* gene, localized in the nuclear DNA. A *MTATP6* gene encodes subunit a of F_1F_O-ATPsynthase and its mutation usually leads to reduced phosphorylation activity of F_1F_O-ATPsynthase. A *TMEM70* gene encodes a 21 kDa mitochondrial protein of the inner mitochondrial membrane of not completely explained function and its mutation results in the decrease in a content of fully assembled F_1F_O-ATPsynthase. The aim of this thesis was to investigate the impact of isolated F_1F_O-ATPsynthase deficiency on the oxidative phosphorylation system (complex I-IV), other selected mitochondrial proteins, and mitochondrial network in two cell lines of primary human skin fibroblasts with an isolated deficiency of F_1F_O-ATPsynthase (mutation m.8851T>C in *MTATP6* and mutation c.317-2A>G in *TMEM70*) during the first days of their cultivation in media containing galactose or glucose as a carbohydrate source with a presence or absence of L-glutamine.

The control cell line was found to have higher amounts of respiratory chain complexes including F_1F_O-ATPsynthase except complex III in a DMEM medium containing galactose as carbohydrate source compared to cultivation in a DMEM medium containing glucose as a carbohydrate source. However in the cell lines with the isolated F_1F_O-ATPsynthase deficiency, only higher amounts of complex IV of the respiratory chain were found. L-glutamine increased the viability and growth of cell lines with isolated deficiency of F_1F_O-ATPsynthase in media containing galactose as a carbohydrate source.

The impact of isolated deficiency of F_1F_O-ATPsynthase on other respiratory chain complexes depended on the type of cultivation media containing galactose as a carbohydrate source. It was further supported by similar observations in the control line in these media. In cell lines with isolated F_1F_O-ATPsynthase deficiency higher amounts of respiratory chain subunits were found compared to a control cell line in Leibovitz medium. On the contrary, lower amounts of respiratory chain subunits (except of complex III subunit) were found in DMEM medium.

In Czech.

Abstrakt

Izolovaný deficit F_1F_O-ATPsyntázy je skupinou mitochondriálních onemocnění způsobených mutacemi v jaderně- a mitochondriálně-kódovaných strukturních podjednotkách, nebo jaderně-kódovaných faktorech biogenese komplexu F_1F_O-ATPsyntázy. Nejčastěji jsou to mutace v genu *MTATP6*, nacházející se v mitochondriální DNA, a v genu *TMEM70*, nacházející se v jaderné DNA. Gen *MTATP6* kóduje strukturní podjednotku „a“ komplexu F_1F_O-ATPsyntázy a jeho mutace způsobuje snížené množství F_1F_O-ATPsyntázy a její fosforylační aktivitu. Gen *TMEM70* kóduje protein vnitřní mitochondriální membrány o velikosti 21 kDa s doposud zcela neobjasněnou funkcí a jeho mutace způsobuje poruchu biogeneze komplexu F_1F_O-ATPsyntázy. Cílem práce bylo studovat ve dvou liniích primárních kožních fibroblastů s izolovaným deficitem F_1F_O-ATPsyntázy (mutace m.8851T>C v *MTATP6* a mutace c.317-2A>G v *TMEM70*) dopad tohoto deficitu na systém oxidační fosforylace, vybrané mitochondriální proteiny a mitochondriální síť ve srovnání s kontrolní linií primárních kožních fibroblastů v prvních dnech kultivace (1-5 dní) v médiu obsahujícím jako zdroj sacharidů galaktózu nebo glukózu a v médiu s přítomnou a nepřítomnou aminokyselinou L-glutaminu.

U kontrolní linie kultivované v médiu DMEM obsahujícím jako zdroj sacharidů galaktózu bylo nalezeno vyšší množství komplexů dýchacího řetězce včetně F_1F_O-ATPsyntázy (kromě komplexu III), oproti její kultivaci v médiu DMEM obsahujícím jako zdroj sacharidů glukózu. Zatímco u linií s izolovaným deficitem F_1F_O-ATPsyntázy bylo vyšší pouze množství komplexu IV dýchacího řetězce, přítomnost aminokyseliny L-glutaminu v médiu obsahujcím jako zdroj sacharidů galaktózu zvyšovala viabilitu a schopnost růstu linií s izolovaným deficitem F_1F_O-ATPsyntázy.

K analýze dopadu izolovaného deficitu F_1F_O-ATPsyntázy na ostatní komplexy dýchacího řetězce byla použita kultivace buněk v médiích obsahujících jako zdroj sacharidů galaktózu (Leibovitz a DMEM). U obou linií s izolovaným deficitem F_1F_O-ATPsyntázy bylo v médiu Leibovitz nalezeno vyšší množství podjednotek komplexů dýchacího řetězce v porovnání s kontrolou. V médiu DMEM bylo naopak jejich množství nižší s vyjímkou podjednotky komplexu III dýchacího řetězce. Dopad izolovaného deficitu F_1F_O-ATPsyntázy na ostatní komplexy dýchacího řetězce je v těchto podmínkách závislý na typu použitého kultivačního média.

Seznam použitých zkratek

ANT - adeninnukleotidový transportér

APS - peroxodisíran amonný

BN-PAGE – modrá nativní elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

BSA - hovězí sérový albumin

DMEM - „Dulbecco's Modified Eagle“ medium

EDTA - kyselina ethylendiamintetraoctová

HSP- promotor pro transkripci těžkého vlákna mitochondriální DNA

LSP - promotor pro transkripci lehkého vlákna mitochondriální DNA

mtDNA - mitochondriální DNA

OH - počátek replikace mitochondriální DNA

OXPHOS – systém oxidační fosforylace

PBS – „Phosphate-buffered saline” (složení viz 3.1.2.2. Roztoky a pufry, strana 30)

PDH – pyruvátdehydrogenázový komplex

Pi - anorganický fosfát (HPO_4^{2-}, H_2PO_{4-})

PIC - fosfátový transportér

PVDF - polyvinylidendifluorid

RIPA - „Radio-Immunoprecipitation Assay“ pufr (složení viz 3.1.2.2. Roztoky a pufry, strana 29)

ROS - volné kyslíkové radikály

SDS- dodecylsulfát sodný

SDS-PAGE – elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného

TBS - „Tris-buffered saline“ pufr (složení viz 3.1.2.2. Roztoky a pufry, strana 29)

TBST - „Tris-buffered saline - tween“ pufr (složení viz 3.1.2.2. Roztoky a pufry, strana 29)

TEMED - N,N,N',N'-tetramethyl-ethylen-1,2-diamin

TIM - translokáza vnitřní mitochondriální membrány

TOM - translokáza vnější mitochondriální membrány

UCP – rozpřahující protein

1 Úvod

1.1 Mitochondrie

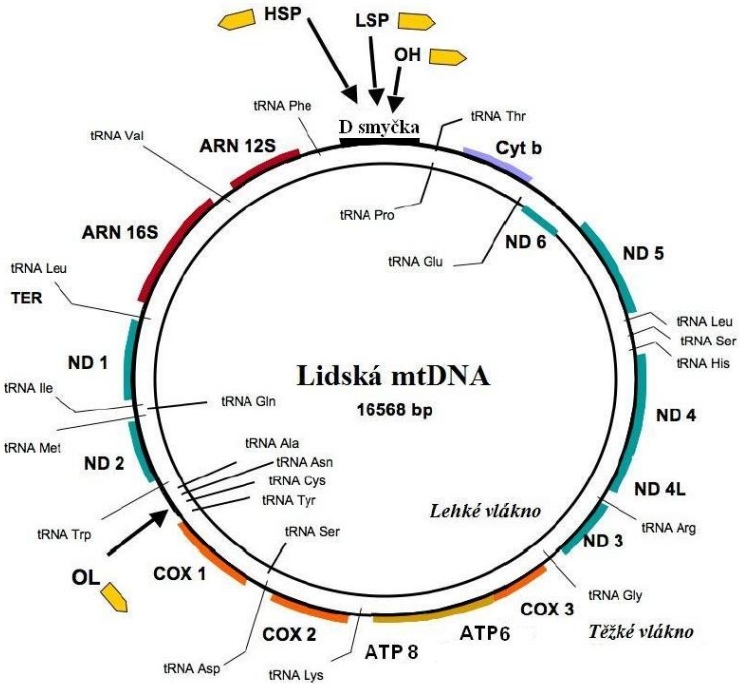
Mitochondrie jsou semiautonomní organely, tvořící souvislou síť, která se může dělit na menší válcovité struktury v závislosti na stavu buňky. Jsou důležitou organelou pro energetický metabolismus buňky, produkci tepla, syntézu hemu a steroidů, odbourávání amoniaku, signalizaci pomocí vápenatých iontů a dalších dějů. Jsou místem průběhu oxidační fosforylace, citrátového cyklu, beta-oxidace mastných kyselin, části močovinového cyklu a syntézy hemu a dalších metabolických drah. Důležitou roli mají například i v procesu stárnutí a v průběhu apoptózy. [1]

Vnitřní prostředí mitochondriální matrix, oddělují od cytosolu dvě membrány, mezi kterými je mezimembránový prostor. Vnější mitochondriální membrána je obvykle hladká a obsahuje vysoké množství porinů (transmembránových proteinů umožňující volný průchod iontům a molekulám do velikosti přibližně 5 kDa), takže mezimembránový prostor nemá výrazně odlišné chemické složení od cytoplasmy. Mezimembránový prostor a matrix jsou odděleny vnitřní mitochondriální membránou, která je velmi bohatá na proteiny (tvoří přes 70% její celkové hmotnosti). Obsahuje zejména enzymy dýchacího řetězce, komplexy F_1F_o-ATPsyntázy a specifické transportní bílkoviny regulující průchod metabolitů a makromolekul přes tuto membránu. Pro vnitřní membránu je specifická přítomnost fosfolipidu kardiolipinu (difosfatidylglycerol), který zvyšuje nepropustnost membrány pro H^+ ionty. Tato membrána je zvrásněna do útvarů vychlípených do matrix, zvaných kristy. [1]

1.1.1 Mitochondriální genom

Ve shodě s endosymbiotickou teorií mají mitochondrie svou vlastní DNA (mtDNA), replikací podobnou bakteriální DNA. K její replikaci dochází nezávisle na jaderné DNA, na rozdíl od jaderné DNA, několikrát za buněčný cyklus a v jedné buňce je přítomna v tisících kopií. Pokud jsou v buňce přítomny pouze sekvenčně identické kopie, tak se tento stav nazývá homoplasmie. Stav, kdy jsou v buňce přítomny kopie s různou sekvencí (mutace, polymorfismus), se nazývá heteroplasmie. Charakteristickou vlastností savčí mtDNA je její nemendelovská maternální dědičnost, jelikož potomek získává mitochondrie pouze od samice. [2]

Savčí mtDNA je cirkulární dvouřetězcová molekula, řetězce se označují jako H („Heavy“) a L („Light“) podle vyššího obsahu GT bazí u H-vlákna a AC u L-vlákna. Kóduje 37 genů (většina je lokalizována na H-řetězci): 13 podjednotek komplexů oxidační fosforylace, 22 tRNA a 2 rRNA (pro intramitochondriální syntézu proteinů). Tyto geny jsou vysoce úsporně uspořádany, nejsou zde přítomny introny ani mezigenové sekvence a některé geny se dokonce překrývají. V mtDNA jsou pouze dvě nekódující oblasti. Jednou oblastí tzv. D-smyčka („displacement-loop“, na pozici 16024 - 576), která obsahuje promotory pro transkripci lehkého (LSP) a těžkého (HSP) vlákna a počátek replikace těžkého vlákna (OH). Druhou oblastí je kontrolní region, obsahující počáteční sekvenci pro replikaci lehkého vlákna (OL, na pozici 5721-5798). [2] Viz obr. 1.1.



Obrázek 1.1. ***Mapa lidské mitochondriální DNA.*** *LSP-promotor lehkého vlákna, HSP-promotor těžkého vlákna, OH-počátek replikace na těžkém vláknu, OL-počátek replikace na lehkém vláknu, ND1-6 -geny pro podjednotky komplexu I, COX1-3-geny pro podjednotky komplexu IV, ATP6 a ATP8 -geny pro podjednotky F1Fo-ATPsyntázy, Cyt b -gen pro cytochrom b, ARN 12S a ARN 16S -geny pro mitochondriální rRNA, upraveno podle [1]*

1.2 Komplexy systému oxidační fosforylace

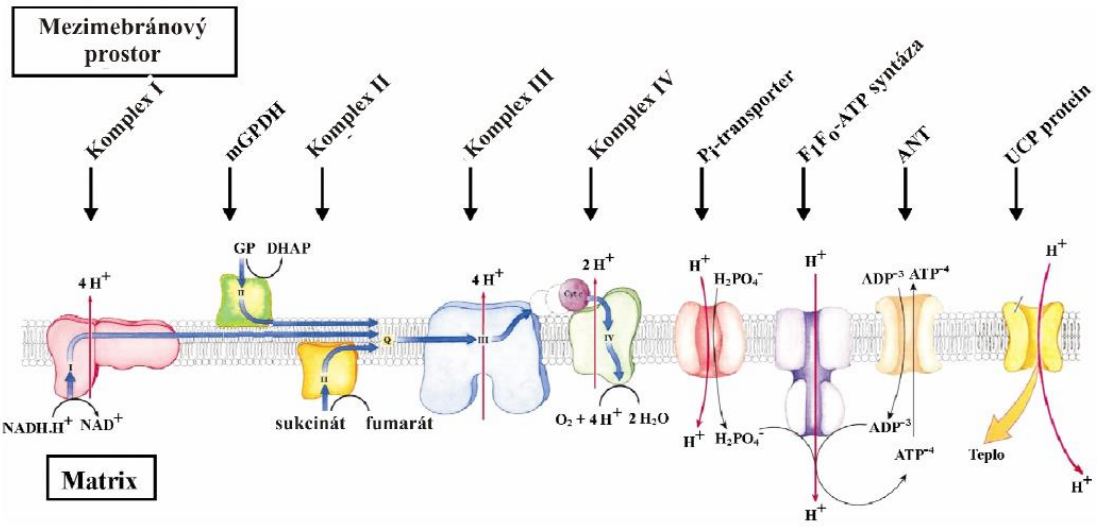
Systém oxidační fosforylace (OXPHOS) nacházející se ve vnitřní mitochondriální membráně se skládá ze sedmi hlavních komponent: NADH:ubichinon-oxidoreduktázy (komplexu I dýchacího řetězce), sukcinát:ubichinon-oxidoreduktázy (komplexu II

dýchacího řetězce), ubichinol:cytochrom-c-oxidoreduktázy (komplex III dýchacího řetězce), ferrocytochrom-c-O_2-oxidoreduktázy (komplexu IV dýchacího řetězce), dvou proteinů fungujících jako přenašeče elektronů (koenzym Q a cytochrom c) a komplexu F_1F_O-ATPsyntázy (komplex V dýchacího řetězce). Systém těchto komplexů umožňuje proces, při kterém dochází k reoxidaci kofaktorů NADH a $FADH_2$, které jsou produkty metabolismu téměř všech živin, a k syntéze ATP. Většina buněčného ATP je generována tímto procesem. Klíčová je v tomto procesu tvorba protonového gradientu, přenosem protonů z matrix do mezimebránového prostoru, a jeho následné využití jako zdroje energie na syntézu ATP.

Protonový gradient je generován přenosem protonů třemi komplexy dýchacího řetězce (I, III a IV) pomocí energie získané postupným přenosem elektronů z redukovaných kofaktorů NADH a $FADH_2$. Elektrony z NADH se přenášejí přes prostetickou skupinu flavinmonodukleotidu a FeS centra NADH:ubichinon-oxidoreduktázy (komplexu I dýchacího řetězce) na mobilní přenašeč koenzym Q (ubichinon), který se tím redukuje na ubichinol ($CoQH_2$). Elektrony z $FADH_2$ se přenášejí přes prostetickou skupinu flavinadenindinukleotidu a FeS centra sukcinát:ubichinon-oxidoreduktázy (komplexu II dýchacího řetězce) také na ubichinon. Ubichinol dále přenáší elektrony na ubichinol:cytochrom-c-oxidoreduktázu (komplex III dýchacího řetězce), ze které se pomocí cytochromů elektrony přecházejí na další mobilní přenašeč cytochrom c. Ten přenáší elektrony na ferrocytochrom-c-O_2-oxidoreduktázu (komplex IV dýchacího řetězce), pomocí které jsou elektrony přeneseny na svůj konečný akceptor O_2. [3]

Tímto procesem vzniklý protonový gradient je následně využit F_1F_o-ATPsyntázou na syntézu ATP. [3]

Kromě výše zmíněných složek jsou se systémem oxidační fosforylace obvykle sdruženy ještě další proteiny a komplexy. Jsou to například některé další dehydrogenázy, jako mitochondriální glycerofosfátdehydrogenáza (mGPDH). Dále fosfátový (PIC) a andeninnukleotidový transportér (ANT), případně rozpřahující protein (UCP protein). [3] Viz obrázek 1.2.



Obrázek 1.2. ***Schéma systému oxidační fosforylace****. Enzymy dýchacího řetězce (I, II, III a IV) a mGPDH (mitochondriální glycerofosfátdehydrogenáza) přenáší elektrony z NADH a FADH na kyslík, současně vytváří protonový gradient na vnitřní mitochondriální membráně, který může být přeměněn na teplo rozpřahujícím proteinem (UCP protein) nebo je využit F1Fo-ATPsyntázou na syntézu ATP. Důležitou výměnu ADP/ATP umožňuje ANT (translokátor adeninových nukleotidů) a transport anorganického fosfátu do mitochondrie zajišťuje fosfátový transportér. Upraveno podle[4]*

Komplexy dýchacího řetězce jsou tradičně popisovány jako lineární řetězec komplexů působících izolovaně. Některé komplexy dýchacího řetězce spolu ovšem mohou interagovat a tvoří superkomplex, tzv. respirazóm. V savčích mitochondriích byly pozorovány superkomplexy složené z komplexů I, III a IV. Komplex II v těchto superkomplexech zatím nebyl pozorován. [5] Ze studia těchto superkomplexů se zdá, že komplex I se vždy nachází v superkomplexu s komplexem III a na tento superkomplex se může a nemusí vázat i komplex IV. Pomocí tohoto respirazómu dochází k přenosu elektronů z kofaktoru NADH. Dále se v membráně vykytuje superkomplex složený z komplexu III a IV nebo volný komplex III a volný komplex IV, pomocí kterých dochází k přenosu elektronů z komplexu II a dalších mitochondriálních dehydrogenáz. Množství jednotlivých superkomplexů v membráně je zřejmě závislý na metabolismu buňky. [6]

1.3 F_1F_O-ATPsyntáza

Mitochondriální adenosintrifosfátsyntáza (F_1F_o-ATPsyntáza., EC 3.6.3.14) je molekulární motor složený z několika podjednotek patřících mezi F-ATPázy. Ty syntetizují ATP z ADP a fosfátu, za pomoci energie získané pasivním transportem H^+ iontů přes membránu ve směru koncentračního gradientu. Tento proces může být za určitých okolností i obrácen:

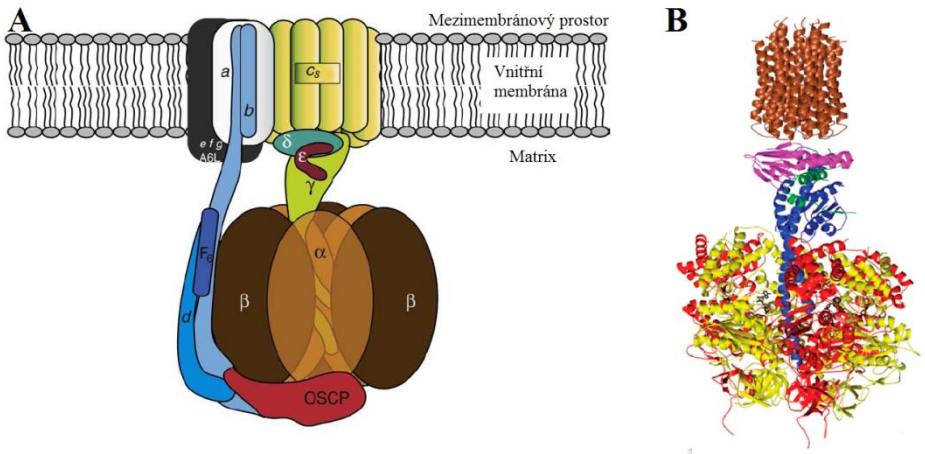
může tedy fungovat jako protonová pumpa s využitím energie vzniklé hydrolýzou ATP. [7]

1.3.1 Struktura a topologie F_1F_O-ATPsyntázy

Lidská mitochondriální F_1F_O-ATPsyntáza o molekulové hmotnosti dosahující 600 kDa je tvořena z 15 různých podjednotek. Může být rozdělena na dvě části: část F_1 o molekulové hmotnosti 370 kDa a nacházející se v mitochondriální matrix, která je hydrofilní a dostala svůj název od pojmu „frakce 1“, a část F_O, která je zanořena ve vnitřní mitochondriální membráně a dostala svůj název díky tomu, že je inhibovatelná oligomycinem. část F_1 se skládá ze tří kopií podjednotek α a β a z jedné kopie podjednotek γ, δ a ε. část F_O obsahuje po jedné kopii podjednotky a, b, d, F6 a OSCP, dále c-kruh (pravděpodobně tvořený osmi kopiemi podjednotek c, jak je vidět z mitochondrií hovězího srdce [8]) a pomocné podjednotky e, f, g a A6L. [9] Podjednotky α a β jsou uspořádány do heterohexameru střídavě jako plátky pomeranče kolem centrální α-helikální domény podjednotky γ. Podjednotky γ, δ a ε tvoří tzv. centrální stopku, která spoje hexametr $\alpha_3\beta_3$ a c-kruh. Při syntéze ATP se otáčí dokola a funguje jako hřídel. C-kruh při tomto ději funguje jako rotor a rotuje dokola. Všechny ostatní části F_1F_O-ATPsyntázy žádný pohyb nevykonávají a fungují tedy jako stator.

C-kruh je složen v závislosti na druhu organismu z různého počtu podjednotek c (u savců zřejmě 8 [8]). Každá podjednotka c je složena ze dvou α-helixů spojených smyčkou a dohromady vytváří dvojitě kruhovou strukturu. N-koncový α-helix tvoří vnitřní kruh (cTMH1) a C-koncový α-helix vytváří vnější kruh (cTMH2). U savců byly objeveny tři izoformy podjednotky c, které se liší v N-koncové mitochondriální cílové sekvenci. Aminokyselinová sekvence „maturovaných“ proteinů je shodná. Každá izoforma plní před integrováním do membrány jinou funkci, i když stále ne úplně známou. Izoformy jsou tkáňově specifické a nejsou navzájem redundantní. [9-10]

Hexametr $\alpha_3\beta_3$ a c-kruh jsou ještě spojeny tzv. periferní stopkou tvořenou podjednotkami b, d, F6 a OSCP, která se pomocí podjednotky b zanořuje do membrány. V membráně se tedy nachází c-kruh, část podjednotky b a dále podjednotky a, e, f, g a A6L. Organizace podjednotek je znázorněna na obrázku 1.3. [9]



Obrázek 1.3: ***Struktura lidské mitochondriální F_1F_0-ATPsyntázy.*** *A- Organizace podjednotek F_1F_0-ATPsyntázy, která se skládá ze dvou funkčních domén, F_1 a F_O. F_1 se skládá z 5 různých podjednotek (tří α a β a jedné γ, δ a ε) a nachází se v mitochondriální matrix. F_O obsahuje podjednotky c, a, b, d, F6, OSCP a pomocné podjednotky e, f, g a A6L. Převzato z [11]. B-struktura části F_1F_0-ATPsyntázy z mitochondrií hovězího srdce znázorněná pomocí stužkového modelu, α podjednotka je znázorněna červeně, β žlutě, γ modře, δ fialově, ε zeleně a c-kruh hnědě. Převzato z [8].*

Na F_1F_O-ATPsyntázu se ještě váže inhibiční protein IF1 a faktor B. IF1 není strukturní podjednotkou F_1F_O-ATPsyntázy, váže se na ni reverzibilně v závislosti na okolním pH. IF1 se při pH menším než 6,5 nachází ve své aktivní formě homodimeru a vazbou na F_1-ATPsyntázu v oblasti $\alpha_3\beta_3$ hexametru (v oblasti katalytického rozhraní α/β podjednotek) zabraňuje hydrolytické aktivitě F_1F_O-ATPsyntázy. [9, 12-13] U některých nádorových buněk bylo pozorováno, že zvýšená exprese IF1 vede k inhibici hydrolytické a syntetické aktivity F_1F_O-ATPsyntázy. [14] IF1 zřejmě hraje roli i při stabilizaci vyšších oligomerních stavů F_1F_O-ATPsyntázy. [15] Faktor B také není strukturní podjednotkou a zřejmě se váže na část F_O na matrixové straně. V části F_O pravděpodobně existují pro translokaci protonů dvě možné cesty, ale jen jedna je spřažena se syntézou ATP, druhá je zřejmě nežádoucí. Faktor B zřejmě blokuje tok protonů touto nežádoucí cestou. [9, 16]

S F_1F_O-ATPsyntázou jsou asociované ještě dva proteiny: proteolipid MLQ, jehož funkce je stále neznámá, a protein AGP (neboli DAPIT či usmg5), který zřejmě hraje roli v regulaci energetického metabolismu. [17]

1.3.2 Biogeneze F_1F_O-ATPsyntázy

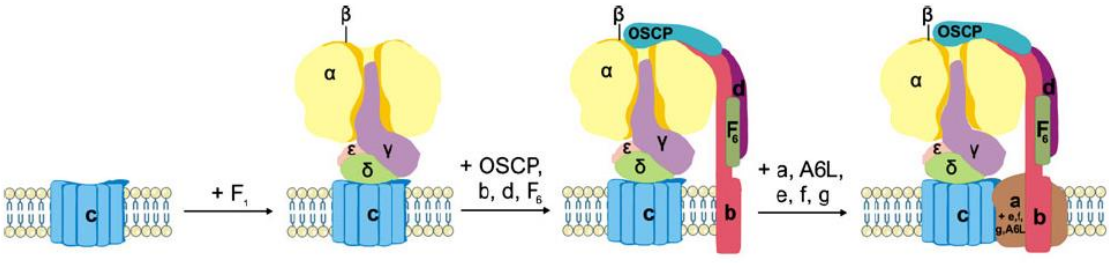
Většina strukturních podjednotek F_1F_O-ATPsyntázy je kódována jadernými geny, výjimkou jsou podjednotky a a A6L, kódované mitochondriální DNA. Jaderně-kódované

podjednotky jsou syntetizovány v cytosolu a na jejich N-konci se nachází mitochondriální cílová sekvence, jež je rozpoznávána komplexem TOM (translokáza vnější mitochondriální membrány), který „nesbalené“ proteiny transportuje do mezimembránového prostoru. Dále jsou tyto proteiny přenášeny do matrix pomocí komplexu TIM (translokáza vnitřní mitochondriální membrány). Po vstupu do matrix je cílová sekvence odštěpena proteázou a k „maturaci“ proteinu přispívají chaperony Hsp60 a Hsp10. [11, 18]

Zatím byly nalezeny pouze dva specifické chaperony tvorby komplexu lidské mitochondriální F_1F_O-ATPsyntázy: Atpaf1 a Atpaf 2, zajišťující správnou tvorbu hexameru $\alpha_3\beta_3$.[9] Na tomto hexameru se na rozhraní mezi podjednotkami α a β nachází tři vazebná místa pro nukleotidy, mající katalytickou aktivitu při syntéze a hydrolýze ATP, které se střídají se třemi vazebnými místy pro nukleotidy bez katalytické aktivity. Atpaf2 se váže na podjednotku α v místě, které v hexameru tvoří nekatalytické rozhraní mezi podjednotkami α a β. Atpaf1 se váže na podjednotku β na místě tvořící katalytické místo sestaveného komplexu. [19-20] Zdá se, že při sestavování hexameru jsou jednotlivé chaperony postupně vytlačovány příslušnou podjednotkou, respektive jejím dimerem: dimer α/Atpaf2 vytlačuje Atpaf1 z komplexu β/Atpaf1, což vede ke vzniku katalytického rozhraní, a dimer β/Atpaf1 vytlačuje Atpaf2 z komplexu α/Atpaf2 za vzniku nekatalytického rozhraní. Celý proces zřejmě iniciuje podjednotka γ. [20-21]

Jediným dalším známým lidským proteinem spojeným s biogenezí F_1F_O-ATPsyntázy je protein Tmem70, jehož přesná role v tomto procesu však zatím není známa. [22]

Je známo, že k tvorbě části F_1, postranní stopky a c-kruhu dochází zvlášť, ale průběh celkového následného sestavení F_1F_O-ATPsyntázy není znám. Z výsledků dosavadního výzkumu se zdá, že nejprve dochází k tvorbě c-kruhu, ke kterému se připojuje část F_1, následně postraní stopka a nakonec podjednotky a a A6L. Viz obrázek 1.4. [9]

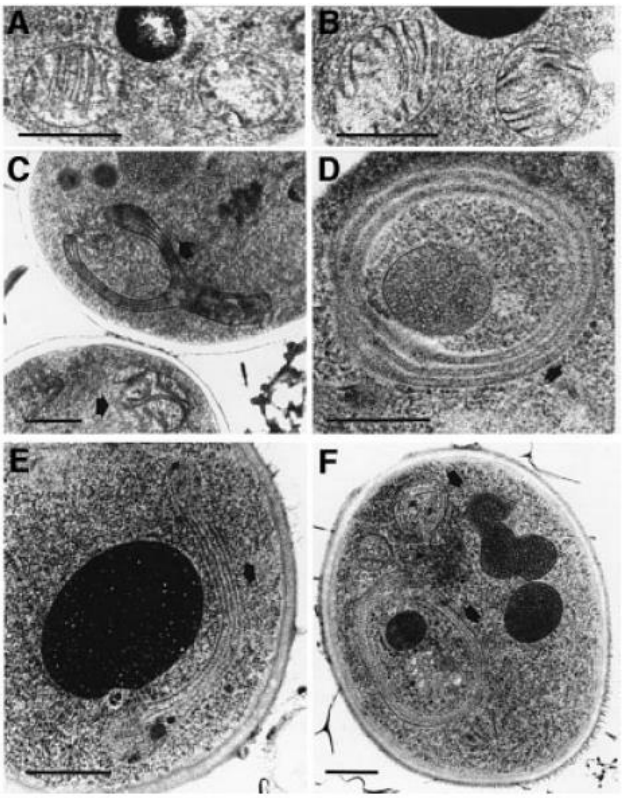


Obrázek 1.4: ***Tvorba komplexu F_1F_O-ATPsyntázy.*** *Ke složenému c-kruhu se připojuje složená část F_1, následně se ke komplexu připojuje postranní stopka a nakonec podjednotky a, A6L, e, f a g.*

1.3.3 Supramolekulární struktury F_1F_O-ATPsyntázy ve vnitřní mitochondriální membráně

F_1F_O-ATPsyntáza se ve vnitřní mitochondriální membráně nachází ve formě dimeru či vyšších oligomerních stavech. [23-24] K interakci mezi dvěma monomery F_1F_O-ATPsyntázy dochází zejména v membránové části F_O. Zatím bylo zjištěno, že v této interakci hrají roli podjednotky: a, A6L, e, g a b. [15, 25-28] Zdá se, že podjednotka a hraje nejdůležitější roli v stabilizaci těchto oligomerních stavů, protože má vysoký počet předpokládaných transmembránových α-helixů. [26] Dalším proteinem, který by se mohl účastnit stabilizace těchto oligomerních stavů je IF1, který zřejmě spojuje dva monomery v části F_1, v oblasti hexameru $\alpha_3\beta_3$. [15]

Monomer F_1F_O-ATPsyntázy je plně schopen syntézy ATP, ale vytvoření oligomerů zřejmě umožňuje správné vytvoření krist a větší stabilizaci komplexu, který je neustále v pohybu. [26, 29] Dimery F_1F_O-ATPsyntázy se seskupují a vytváří okolo 80 dimerů dlouhé „řetízky“, které se pravděpodobně svým tvarem podílí na zakřivení membrány. Jejich seskupení na vrcholcích krist navíc umožňuje lepší syntézu ATP, protože v zakřiveném výčnělku kristy se lépe vytváří protonový gradient. [29] V případě absence dimerizace F_1F_O-ATPsyntázy (deplecí podjednotek e a g) u *S. cerevisiae*, dochází ke ztrátě normálního tvaru krist a jsou pozorované tzv. „onion-like“ struktury, složené z koncentrických závitů zřejmě vnitřní membrány (viz obrázek: 1.5). [30]



Obrázek 1.5: ***Ultrastruktura mitochondrií S. cerevisiae s deplecí podjednotek g a e (se ztrátou dimerizace F_1F_O-ATPsyntázy).*** *Elektronové snímky z transmisního elektronového mikroskopu, měřítko představuje 0,5 µm. A-„wild-type" S. cerevisiae B-S. cerevisiae s deplecí podjednotky i, jejíž nepřítomnost vede ke snížení aktivity F_1F_O-ATPsyntázy, ale stále dochází k dimerizaci F_1F_O-ATPsyntázy [31] C,D-S. cerevisiae s deplecí podjednotky g E,F-S. cerevisiae s deplecí podjednotky e. Převzato z [30]*

Navíc F_1F_O-ATPsyntáza tvoří superkomplex zvaný ATPsyntazóm, ve kterém je F_1F_O-ATPsyntáza asociovaná s fosfátovým (PIC) a adeninnukleotidovým (ANT) transportérem. [32]

1.3.4 Mechanismus syntézy a hydrolýzy ATP F_1F_O-ATPsyntázou

Důležitou funkcí F_1F_O-ATPsyntázy je syntéza ATP za spotřeby energie získané přenosem H^+ iontů přes vnitřní mitochondriální membránu ve směru koncentračního gradientu. H^+ ionty procházejí spontánně membránovou částí F_1F_O-ATPsyntázy, respektive rozhraním mezi podjednotkami c a a, což způsobuje rotaci c-kruhu a centrální stopky. Takto je proton-motivní síla přeměňována na mechanickou práci. Naopak při hydrolýze ATP dochází v důsledku rotace centrální stopky k přenosu H^+ proti koncentračnímu gradientu. [7]

Přesný mechanismus průchodu H^+ iontů zatím není znám. Nicméně nejvíce přijímaným modelem je tzv. „two-channel“ model, který předpokládá, že podjednotka a má dvě od sebe prostorově vzdálené cesty pro H^+, z nichž každá zasahuje do poloviny membrány, a že tyto dvě cesty jsou spojeny místem vázajícím proton na podjednotce c. Každý kanál pro H^+ je spojen s jednou podjednotkou c (tedy jedna podjednotka a je takto vázaná ke dvěma podjednotkám c). Proton vstupuje z mezimembránového prostoru do prvního kanálu a je přenesen na karboxylový zbytek na podjednotce c. Tato protonace neutralizuje negativní náboj na karboxylovém zbytku, což umožňuje posunutí podjednotky c od podjednotky a k okolní lipidové dvouvrstvě. V tom okamžiku dochází z druhé strany k posunutí jiné podjednotky c od lipidové dvouvrstvy k podjednotce a. Vytváří se zde kontakt mezi karboxylovou skupinou podjednotky c a druhým H^+-kanálem, ve kterém je hydrofilní prostředí podporující deprotonizaci karboxylové skupiny. Uvolněný proton pak vstupuje do matrix. [7, 33] Přenosu protonů „zkratkou“ z jednoho kanálu na druhý přes karboxylovou skupinu podjednotky c bez rotace c-kruhu, je zřejmě zabráněno pozitivně nabitým arginilovým zbytkem, který se nejspíš nachází mezi těmito dvěma kanály.[34] Při hydrolýze ATP je sekvence těchto dějů přesně opačná. [7]

V důsledku rotace c-kruhu dochází k rotaci centrální stopky. K otočení centrální stopky o celých 360° je potřeba otočení celého c-kruhu dokola, tedy průchod 8 protonů. Rotace centrální stopky následně způsobuje cyklické konformační změny v části F_1, a tím i syntézu ATP. Na hexameru $\alpha_3\beta_3$ části F_1 se nachází 6 vazebných míst pro nukleotidy, všechny leží na rozhraní mezi podjednotkami α a β. Tři katalytická místa syntézy ATP se střídají se třemi nekatalytickými místy. Katalytická místa se nachází převážně na podjednotce β, zatímco nekatalytická převážně na podjednotce α. [35] Uvnitř centrálního asymetrického prstence pseudo-hexameru $\alpha_3\beta_3$ se nachází asymetrická podjednotka γ, která se zde otáčí jako hřídel a její orientace ovlivňuje aktuální konformaci každého z katalytických míst. Podjednotka γ rotuje při syntéze ATP po směru hodinových ručiček, při pohledu od povrchu membrány směrem k části F1. Naopak při hydrolýze ATP rotuje proti směru hodinových ručiček. [36] Dále se při otáčivém pohybu excentricky orientovaná podjednotka ε, která je připojená k podjednotkám c a γ, dostane do kontaktu postupně s každou podjednotkou β v konzervované oblasti nazývané sekvence DELSEED (pojmenováno podle jednopísmených zkratek aminokyselin z této oblasti). [35, 37-38]

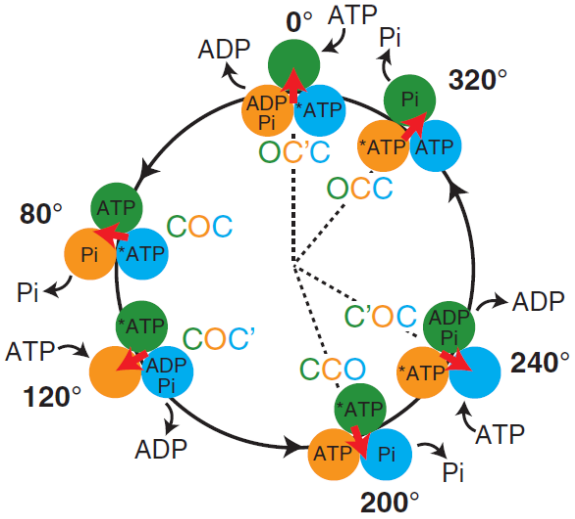
Na základě krystalových struktur F_1-ATPsyntázy mitochondrií hovězího srdce byly popsány tři základní struktury aktivních center (podjednotek β): β_E (bez ligandu), β_{TP} (vázající ATP), and β_{DP} (vázající ADP). Dále byla popsána konformace β_{HC} („half-closed"), která váže ADP a P_i. Tzv. otevřená konformace β_E a tzv. přivřená konformace β_{HC} podjednotek β jsou velmi odlišné od tzv. uzavřených struktur β_{TP} a β_{DP}, které jsou si navzájem podobné. Všechny tyto konformace se liší afinitami k nukleotidům. [35, 37]

Při syntéze ATP vykonává podjednotka γ rotující pohyb a za 1 otočku o 360° dochází postupně k syntéze 3 ATP. Rotací podjednotky γ dochází k postupným cyklicky se opakujícím konformačním změnám každého z katalytických center, které tak mění své vazebné vlastnosti k jednotlivým nukleotidům. Každé z katalytických center je ve stejný okamžik v jiné fázi cyklu syntézy ATP a tedy i v jiné konformaci. Tyto postupné konformační změny katalyzují syntézu ATP z ADP a P_i a vedou přes konformace: β_E následované β_{HC} dále pak β_{DP} následně β_{TP} a nakonec opět β_E. [39] Ale přesný vztah mezi mechanickým pohybem centrální stopky a konformačními změnami pseudo-hexameru $\alpha_3\beta_3$zatím není znám. [7]

Při hydrolýze ATP také dochází k rotaci podjednotky γ jen v opačném směru, než při syntéze ATP. Hydrolýzou 1 ATP dojde k pootočení podjednotky γ o 120° s točitým momentem přibližně 40 pN.nm, tedy k vykonání mechanické práce přibližně 80 pN.nm, která odpovídá volné energii získané za fyziologických podmínek z hydrolýzy jedné molekuly ATP. Tato skutečnost svědčí o vysoké účinnosti (téměř 100%) konverze energie. [40]

Podjednotka γ tedy rotuje v postupných krocích po 120°, každý z těchto kroků je zřejmě spouštěn až po navázáním ATP do jednoho z katalytických center. [40]. Každý z těchto kroků je rozdělen na 80° a následně 40° pootočení. Reakční schéma probíhajícího děje na jednom z katalytických center je následující: děj začíná navázáním ATP, označme pozici podjednotky γ jako úhel 0°, při úhlu 200° dochází k hydrolýze ATP, při úhlu 240° dochází k uvolnění ADP a Pi se následně uvolňuje při 320°. [7, 41-43] V pozici 0° má podjednotka β strukturu β_E, při úhlu 80° a 120° β_{TP}, při úhlu 200° β_{DP}, při úhlu 240° β_{HC}, a při úhlu 340° β_E. Takto děj probíhá cyklicky na každém z katalytických center, tedy za postupné hydrolýzy 3 ATP dochází k rotaci podjednotky γ o 360°. [7, 44-46] Viz obrázek 1.6.

Za standardních fyziologických podmínek, kdy je koncentrace ADP 0,5-1 μM a vyšší, je hydrolytická aktivita F_1F_O-ATPsyntázy inhibována ADP a tato inhibice je zvyšována v přítomnosti P_i. Tedy také fosfát, v koncentraci ≥ 0,1 mM, inhibuje hydrolýzu, ale pouze v případě dostatečně vysokých koncentrací ADP. Na druhou stranu, při nanomolárních koncentracích ADP, míra hydrolýzy vzrůstá. [47]



Obrázek 1.6: ***Schéma hydrolýzy ATP F_1-ATPsyntázou.*** *Každý kruh představuje jedno z katalytických míst na podjednotce β. Červená šipka představuje úhlovou polohu podjednotky γ. O značí otevřenou, C' přivřenou a C uzavřenou strukturu podjednotky β. Zelený kruh reprezentuje konformační změny podjednotky β, na které začíná cyklus navázáním ATP v pozici podjednotky γ označené jako 0°. Převzato z [7]*

Jednotlivá katalytická místa pseudo-hexameru $\alpha_3\beta_3$ nefungují na sobě nezávisle, nýbrž se zdají být spojeny tak, že konformační změna jednoho z nich (např. v důsledku vazby ligandu či rotace γ podjednotky) má vliv na konformaci dalších dvou míst. Důsledkem této kooperativy je zřejmě i vliv koncentrace jednotlivých ligandů na syntetickou či hydrolytickou aktivitu F_1F_O-ATPsyntázy. [38]

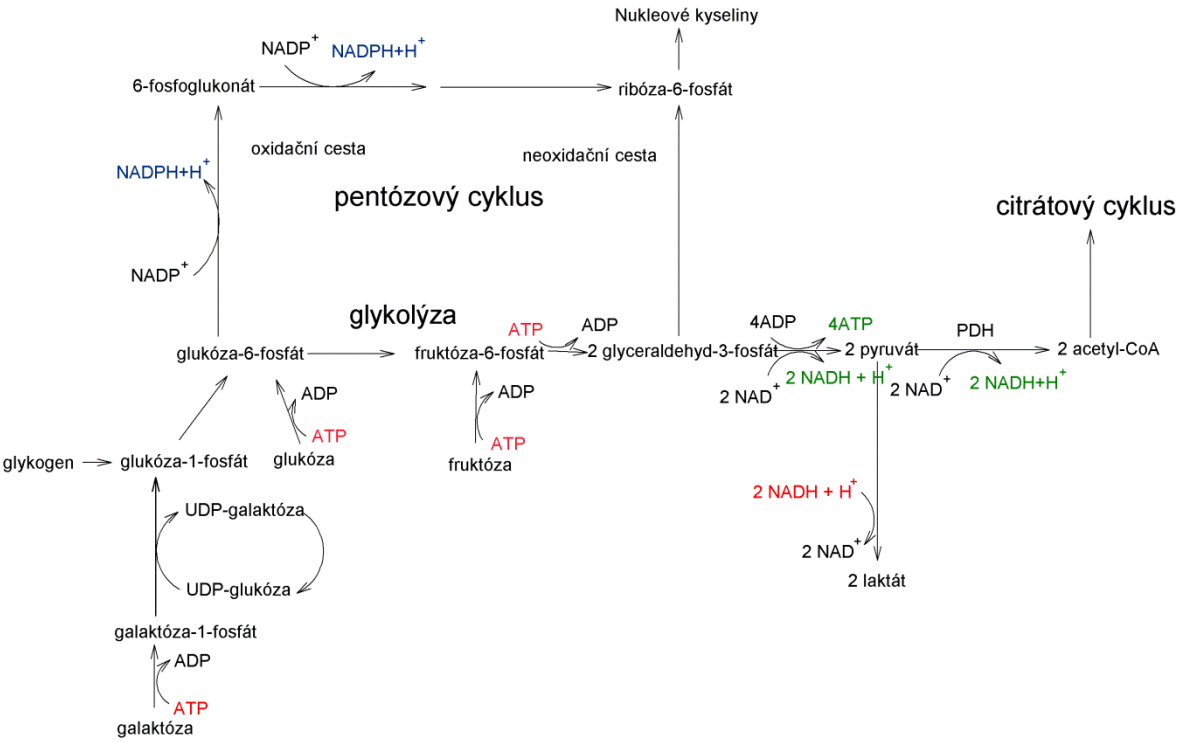
1.4 Syntéza ATP jako zdroje energie pro buněčné procesy

K syntéze ATP (případně GTP) v savčích buňkách, jako zdroji energie, dochází pomocí substrátové fosforylace a oxidační fosforylace. Obě tyto metabolické reakce vedou ke vzniku ATP, případně GTP, v případě substrátové fosforylace přenosem fosfátové skupiny z fosforylovaných intermediátů na molekulu ADP či GDP, a v případě oxidační fosforylace přenosem volné fosfátové skupiny na molekulu ADP. K substrátové fosforylaci dochází během katabolismu sacharidů. Současně jsou produktem těchto katabolických drah

redukované kofaktory $NADH+H^+$ a $FADH_2$, které mohou být využity k oxidační fosforylaci pomocí systému dýchacího řetězce (viz výše). Energie z živin tedy může být získána kromě substrátové fosforylace také oxidační fosforylací, která významně zvyšuje zisk energie z těchto živin (např. z jedné molekuly glukózy lze substrátovou fosforylací během glykolýzy získat 2 ATP, při použití i citrátového cyklu a oxidační fosforylace okolo 38 ATP). Sacharidy, lipidy a aminokyseliny nejsou v buňce využívány jen jako zdroj energie, také jsou důležitými prekurzory v biosyntetických drahách. [4]

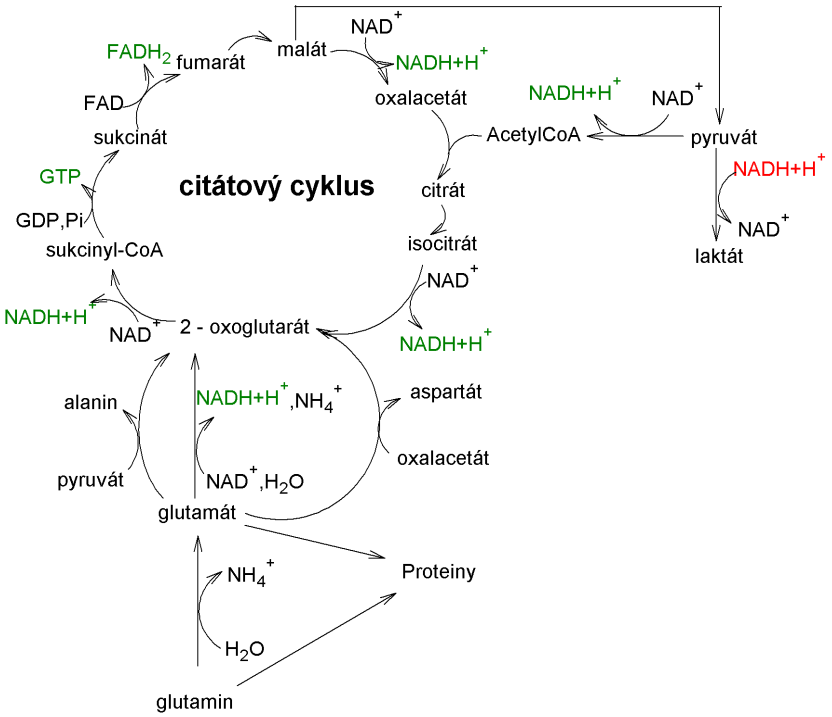
Katabolismem sacharidů, jako je glukóza, galaktóza nebo fruktóza, tedy dochází ke vzniku ATP jako zdroje energie. Společnou katabolickou dráhou těchto tří sacharidů je glykolýza (viz obrázek 1.7.). Do ní vstupuje glukóza a fruktóza po fosforylaci na 6. uhlíku a galaktóza po fosforylaci a epimeraci na glukóza-6-fosfát. Konečným produktem glykolýzy je pyruvát. K reoxidaci redukovaných kofaktorů $NADH+H^+$, vzniklých během glykolýzy, může docházet buď bez využití systému oxidační fosforylace, v tom případě je pyruvát přeměňován na laktát, nebo s využitím substrátové fosforylace, v tom případě je pyruvát přeměňován na acetyl-CoA pyruvátdehydrogenázovým komplexem. Acetyl-CoA pak dále vstupuje do citrátového cyklu. Redukované kofaktory $NADH+H^+$ a $FADH_2$, vzniklé během glykolýzy, přeměny pyruvátu na acetyl-CoA a citrátového cyklu, pak vstupují do systému oxidační fosforylace. [4]

Zároveň mohou být tyto sacharidy využity v biosyntetických drahách pomocí pentózového cyklu, kdy pomocí oxidační části pentózového cyklu dochází ke vzniku redukovaných kofaktorů $NADPH+H^+$ využívaných v biosyntetických drahách. [4] Schéma těchto dějů je znázorněno na obrázku 1.7.



Obrázek 1.7: ***Schéma metabolismu glukózy, galaktózy a fruktózy.*** *Společnou metabolickou dráhou těchto tří sacharidů je glykolýza, pomocí které dochází k syntéze ATP jako zdroje energie, a pentózový cyklus, pomocí kterého jsou tyto sacharidy využity v biosyntetických drahách. Konečným produktem glykolýzy je pyruvát, který může být dále přeměňován na acetylCoA pyruvátdehydrogenázovým komplexem (PDH).*

Podobně mohou být využity i aminokyseliny buď, v biosyntetických drahách jako prekurzory syntézy proteinů, nebo v katabolických drahách k syntéze ATP. Aminokyselinou, která je v savčích buňkách nejvíce využívána jako zdroj energie, je glutamin. [48-50] Glutamin je katabolizován procesem zvaným glutaminolýza. Nejprve dochází k hydrolýze aminoskupiny glutaminu za vzniku glutamátu a amoniaku. Následně je glutamát přeměňován na 2-oxoglutarát. K tomu může docházet třemi možnými reakcemi: transaminací pyruvátu a glutaminu aspartátaminotransferázou za vzniku alaninu a 2-oxoglutarátu, transaminací oxaloacetátu a glutaminu alaninaminotransferázou za vzniku aspartátu a 2-oxoglutarátu, nebo hydrolýzou aminoskupiny glutamátdehydrogenázou. 2-oxoglutarát vstupuje do citrátového cyklu a touto metabolickou dráhou dochází ke vzniku malátu, který je přeměňován na pyruvát a ten následně na laktát. Během těchto katabolických reakcí vzniká GTP a redukované kofaktory $NADH+H^+$ a $FADH_2$, které dále vstupují do systému oxidační fosforylace. [49] Schéma těchto dějů je znázorněno na obrázku 1.8.



Obrázek 1.8: ***Schéma metabolismu glutaminu.*** *Glutamin může být využit k biosyntéze proteinů, nebo jako zdroj energie, kdy jeho katabolismem vzniká GTP a redukované kofaktory NADH+H$^+$ a FADH$_2$. Konečným produktem jeho katabolismu je laktát.*

1.5 Mitochondriální onemocnění

Od pozorování prvního pacienta s mitochondriálním onemocněním v roce 1959 [51] bylo popsáno již více než 150 mitochondriálních syndromů. Tato onemocnění jsou charakterizována poškozením systému oxidační fosforylace, pyruvátdehydrogenázového komplexu a citrátového cyklu. Největší podmnožina zahrnuje onemocnění, při kterých dochází k poškození funkce dýchacího řetězce, k jejich výskytu dochází u více než 1 z 5000 narozených dětí [52]. Tato onemocnění se projevují buď v dětství, nebo v dospělosti, a jsou multisystémová nebo vysoce tkáňově specifická. Častými rysy těchto onemocnění je poškození centrální nervové soustavy, kardiomyopatie, myopatie kosterního svalstva, hluchota, slepota, střevní a periferní neuropatie, které mohou být doprovázeny laktátovou acidózou. [53]

Studium mitochondriálních onemocněních s využitím dostupných biologických vzorků pacientů významně přispělo k pochopení funkce a biogeneze systému oxidační fosforylace. Tyto poruchy zahrnují velké množství vzácných syndromů, z nichž každý se u konkrétního pacienta projevuje do jisté míry individuálním způsobem. V uplynulých letech došlo k

velkému pokroku v nalezení jejich genetické podstaty, ale stále víme málo o kaskádě událostí, které vedou k takové různorodé patologii. Úplné rozluštění jejich patogeneze by mohlo vést k inspiraci ve vývoji léků a klinických testů na tato onemocnění. [53]

Mitochondriální onemocnění mohou být způsobena mutací v jaderné DNA či v mitochondriální DNA. V případě jaderných mutací dochází k mendelovskému typu dědičnosti, zatímco u mitochondriálních mutací jsou poruchy děděny matermálně. Existuje však výjimka jedné popsané mutace v genu *ND2* u komplexu I, která pocházela z otcovské mtDNA. [54] V případě mitochondriálních mutací se v buňce nachází molekuly mutované DNA, ale i nemutované („wild-type"), v určitém poměru. Míra zastoupení mutované DNA se označuje jako míra heteroplazmie. U některých mutací v mtDNA míra heteroplazmie ovlivňuje fenotypové projevy daného onemocnění. [53]

1.5.1 Izolovaný deficit F_1F_O-ATPsyntázy

Mitochondriální onemocnění způsobená izolovaným deficitem F_1F_O-ATPsyntázy představují na molekulární úrovni heterogenní skupinu onemocnění způsobené mutacemi v jaderně- a mitochondriálně-kódovaných strukturních podjednotkách, nebo jaderně-kódovaných faktorech skládání tohoto komplexu. Uvedené poruchy jsou méně časté, než poruchy ostatních komplexů dýchacího řetězce, jsou neléčitelné a nástup prvních klinických příznaků bývá již v dětství, někdy v prvních dnech života. [55] V tabulce 1.1. jsou shrnuty dosud popsané patogenní mutace izolovaného deficitu F_1F_O-ATPsyntázy. Pouze u mutací v genech *MTATP6* [56-77] a *TMEM70* [22, 78-85] bylo nalezeno více pacientů, než jen 1-2 unikátní případy.

Snížená aktivita F_1F_O-ATPsyntázy vede k nízké produkci ATP a k nedostatečnému snižování protonového gradientu na vnitřní mitochondriální membráně. Dochází tak k zvýšení mitochondriálního membránového potenciálu ($\Delta\Psi m$) a to je spojeno se zvýšením produkce ROS komplexy dýchacího řetězce. [55, 86]

Tabulka 1.1.*: **Souhrn nalezených patogenních mutací vedoucích k izolovanému deficitu F_1F_O-ATPsyntázy.***

Mutace v jaderné DNA				
Gen	Protein	Mutace	Patologie	Reference

ATP5E	podjednotka ε	c.35A>G	laktátová acidóza, 3-hydroxy-3-methylglutarová acidurie, periferní neuropatie	[87]
ATP5A1	podjednotka α	c.985C>T	encefalomyopatie	[88]
ATP12	Atpaf2	c.94T>A	laktátová acidóza, encephalomyopatie	[89]
TMEM70	Tmem70	c.317-2A>G	laktátová acidóza, 3-hydroxy-3-methylglutarová a 3-methylglutarová acidurie, kardiomyopatie a poškození centrálního nervového systému	[22]
		c.494G>A		[79]
		c.118_119insGT		[81]
		c.211-450_317-568del		[78]
		c.628A>C		[85]
		c.336T>A		[82]
		c.316+1G>T		[82]
		c.238C>T		[82]
		c.578_579delCA		[82]
		c.580G>A		[78]
		g.2436_378 9del		[83]
		c.535C>T		[84]

Mutace v mitochondriální DNA					
Gen	Protein	Mutace	Manifestace na proteinové úrovni	Patologie	Reference
MTATP8	podjednotka A6L	m.8529G>A	Trp55stop	kardiomyopatie, neuropatie	[90]
		m.8528T>C	Trp55Arg	kardiomyopatie	[91]
MTATP6	podjednotka a	m.8993T>G	Leu156Arg	syndromy NARP a MILS	[70]

		m.8993T>C	Leu156Pro	syndromy NARP a MILS	[76]
		m.9176T>G	Leu217Arg	FBNS a Leighův syndrom	[71]
		m.9176T>C	Leu217Pro	Leighův syndrom	[74]
		m.9185T>C	Leu220Pro	syndrom MILS	[65]
		m.9191T>C	Leu220Pro	syndrom MILS	[65]
		m.8851T>C	Trp109Arg	FBNS syndrom	[64]
		m.9101T>C	Leu192T	LHON	[67]
		m.9205delTA	Ztráta proteinu, podjednotky a	encefalopatie	[66]

1.5.1.1 Mutace v genu *MTATP6*

Ačkoliv bylo nalezeno několik různých patogenních mutací (viz. Tabulka 1.1.) v genu *MTATP6*, nejčastěji se vyskytuje bodová mutace m.8993T>G. Fenotypový projev této mutace je závislý na míře heteroplasmie, která musí přesáhnout 70% mutované DNA, aby došlo ke klinickým projevům, která vedou k syndromu NARP („neuropathy, ataxia and retinitis pigmentosa“, <90% heteroplasmie) nebo MILS („maternally inherited Leigh syndrome“, >95% heteroplasmie). [72]

Tato mutace vede k záměně Leu156, u eukaryot vysoce konzervované aminokyseliny, za arginin, která vede k poškození rotace c-kruhu a tedy nemožnosti syntézy ATP. Průchod protonů částí F_O je umožněn, i když pomaleji. [60] Dochází tak ke snížení syntetické aktivity F_1F_O-ATPsyntázy, ale její hydrolytická aktivita zůstává zachována. [58] V případě záměny Leu156 za prolin (m.8993T>C) dochází ke snížení syntetické aktivity ATP jen mírně [92], přesto je fenotypový projev tohoto onemocnění podobný (jen trochu mírnější). [93] Na fenotypový projev má tedy zřejmě vliv zejména zvýšená produkce ROS. [56] U těchto mutací není narušena tvorba komplexu F_1F_O-ATPsyntázy. [75] V případě mutací Leu217 je pozorován podobný trend, při záměně za arginin dochází ke snížení produkce ATP [74], zatímco při záměně za prolin je pozorováno snížení pouze mírné [71].

Na kvasinkovém modelu (*S. cerevisce*) několika NARP-MILS mutací v genu *MTATP6* bylo pozorováno, že s klesající ATP-syntetickou aktivitou v buňkách klesá i aktivita komplexu IV dýchacího řetězce. [94] Snížení množství či aktivity komplexů dýchacího řetězce (včetně komplexu IV) je ale pozorováno pouze u některých pacientů a je

přisuzováno zvýšené produkci ROS. Zřejmě tato různá pozorování odráží různou míru heteroplazmie nebo různé genetické pozadí pacientů. [95-96]

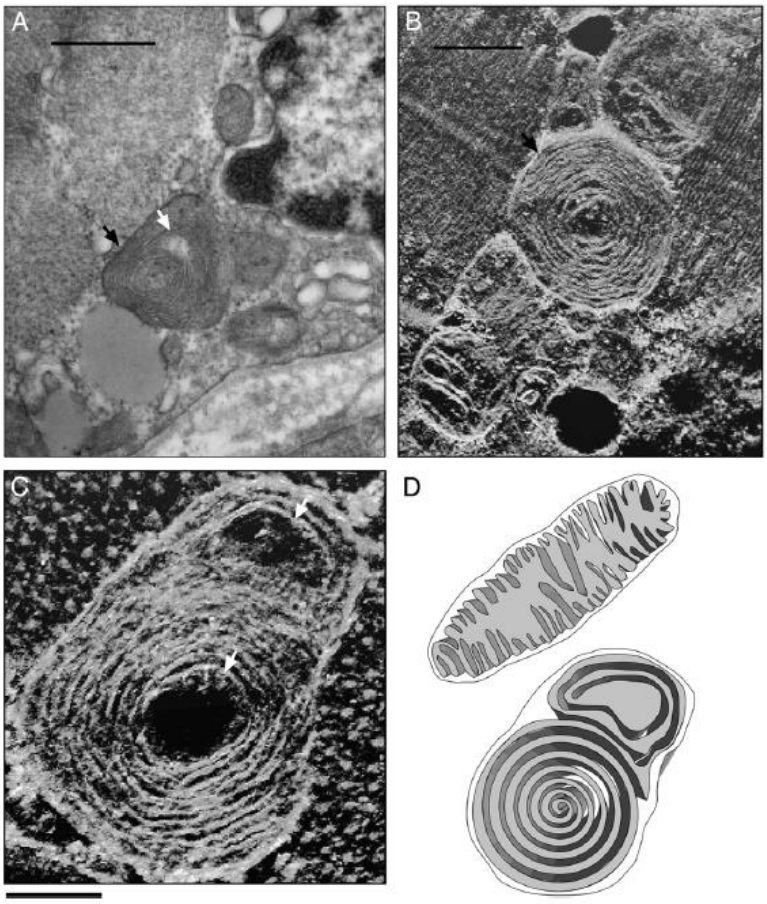
1.5.1.2 Mutace v genu *TMEM70*

V roce 2008 byla u skupiny pacientů se sníženým množstvím F_1F_O-ATPsyntázy a neonatální encefalo-kardiomyopatií nalezena mutace ve druhém intronu genu *TMEM70* (c.317-2A> G), kódující mitochondriální protein neznámé funkce o molekulové hmotnosti 29 kDa. Transfekce buněčných linií těchto jedinců „wt" cDNA *TMEM70* vedla k obnově biogeneze a metabolické funkce F_1F_O-ATPsyntázy. [22] Od té doby bylo nalezeno dalších 11 patogenních mutací v genu *TMEM70* (viz. Tabulka 1.1.), nicméně většina pacientů jsou homozygoti mutace *TMEM70* c.317-2A> G, která se nachází v místě sestřihu ve druhém intronu, a vede k chybnému sestřihu a ztrátě transkriptu genu *TMEM70*. [22, 78-83, 97] Většina pacientů, u kterých byla tato mutace v genu *TMEM70* nalezena, byla romského původu. [80]

Pro tyto pacienty je charakteristické selektivní snížení koncentrace F_1F_O-ATPsyntázy v buňkách (nejméně o 70%). [22] Normální hladiny transkriptů pro podjednotky F_1F_O-ATPsyntázy pozorované v buňkách těchto pacientů naznačují, že podjednotky jsou syntetizovány, ale následně nedochází k vytvoření komplexu a jednotlivé podjednotky jsou degradovány mitochondriálním systémem proteáz. Nebylo však pozorováno zvýšené množství těchto proteáz nebo jejich transkriptů. K degradaci podjednotek je zřejmě normální rovnovážné množství mitochondriálních proteáz dostačující. [98-99]

Studium dopadu mutace v genu *TMEM70* na komplexy dýchacího řetězce v kožních fibroblastech kultivovaných v médiu DMEM obsahujícím vysokou koncentraci glukózy (25 mM glukóza) ukázalo statisticky významné zvýšení množství komplexů III a IV, ale toto zvýšení nebylo pozorováno u všech pacientů. U některých pacientů bylo pozorováno zvýšení množství i komplexů I a II. Tato nesourodost výsledků může odrážet rozdíly v genomu jednotlivých pacientů, ovlivňující jejich schopnost reagovat na deficit F_1F_O-ATPsyntázy. Pozorovaný kompenzační efekt je na postranskripční úrovni, protože nebylo nalezeno zvýšení hladiny mRNA pro podjednotky jednotlivých komplexů. [99] Stejný trend-nárůstu některých komplexů dýchacího řetězce (II, III a IV), byl pozorován i v Laboratoři pro studium mitochondriálních poruch při pěstování kožních fibroblastů v médiu „Quantum 333 for fibroblasts" (18 mM glukóza). [100-101]

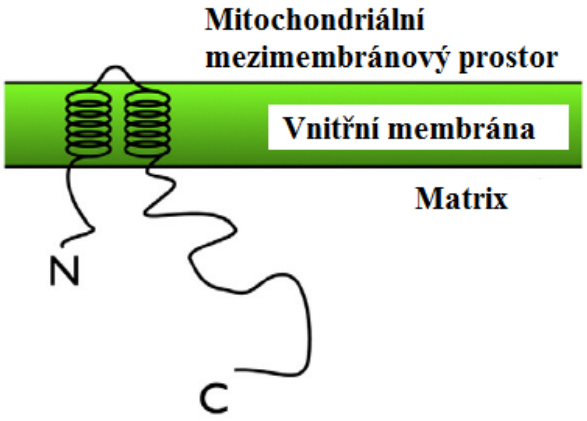
Elektronová mikroskopie a tomografie ukázala u těchto pacientů abnormální tvar mitochondrií, s kruhovými „onion-ring“ kristami (soustředné závity krist) a prázdná místa v mitochondriální matrix bez krist. V trojrozměrné projekci se tedy tvoří „rolled sock“ konformace vnitřní mitochondriální membrány (viz obr. 1.9). [81, 83, 101] Takovéto tvary mitochondrií ale nejsou specifické pro tento defekt. Ne u všech pacientů s mutací v genu *TMEM70* byly „onion-ring“ kristy pozorovány a u pacientů, u kterých pozorovány byly, nebyly zaznamenány ve všech buňkách. Navíc byly tyto struktury mitochondrií pozorovány i u pacientů s defektem komplexu I a IV dýchacího řetězce. [102-103]



Obrázek 1.9: ***Mitochondrie kosterního svalu pacienta s mutací v genu TMEM70.*** *Černé šipky ukazují abnormální soustředné závity kryst. Bílé šipky ukazují volná místa bez krist. A-snímek mitochondií z elektronového mikroskopu, měřítko představuje 500 nm. B,C-elektronový tomogram, měřítka představují 1,25 μm a 250 nm. D-obrázek normální mitochondrie a mitochondrie pacienta s mutací v TMEM70 z tomogramu C, krista tvoří jediný závit a obsahuje volný prostor bez krist. Převzato z [81].*

Tmem70 je protein vnitřní mitochondriální membrány o molekulové hmotnosti 21 kDa syntetizovaný jako prekurzor o molekulové hmotnosti 29 kDa obsahující na N-konci polypeptidového řetězce signální sekvenci aminokyselin pro transport do mitochondrií. Ve

vnitřní mitochondriální membráně se nachází ve formě dimeru. [104] Monomer prochází dvěma transmembránovými částmi vnitřní mitochondriální membránou a jeho C- a N-konec se nachází v mitochondriální matrix (viz obr. 1.10). [83] Jeho funkce v buňce souvisí s biogenezí F_1F_O-ATPsyntázy [105], a nachází se jen u vyšších eukaryot [22, 106].



Obrázek 1.10: ***Topologie proteinu Tmem70 ve vnitřní mitochondriální membráně.*** *Upraveno podle [83].*

1.5.1.3 Terapie mitochondriálních onemocnění

V současné době jsou dostupné možnosti v léčbě mitochondriálních onemocnění prakticky na podpůrné úrovni. Současný výzkum terapie těchto onemocnění se především zaměřuje na řešení pomocí genové terapie. [9]

Jednou z možností podpůrné terapie by v budoucnu mohlo být použití specifických antioxidantů, z důvodu potlačení zvýšené produkce ROS u těchto pacientů, nebo intermediátů Krebsova cyklu, jako podpory substrátové fosforylace v buňce. Na kožních fibroblastech pacientů s mutací m.8993T>G bylo ukázáno, že antioxidanty (N-acetylcystein a kyselina dihydrolipoová) [96], α-ketoglutarát a aspartát [107] zlepšují mitochondriální respiraci a syntézu ATP.

Jiný přístup nabízí genová terapie. U poruch způsobených mutací v mitochondriální DNA je jednou z možností snížení heteroplasmie. U cybridů s mutací m.8993T>G bylo pozorováno, že kultivace těchto cybridů v médiu obsahujícím galaktózu a oligomycin vede k selekci nemutované („wild type“) mtDNA. [108] Další možností je vložení genu pro daný mitochondriální protein do jaderné DNA. Tento gen ale musí obsahovat mitochondriální cílovou sekvenci, ta buď může být do genu vložena [109], nebo je použito

genu pro tento protein z jiného organismu, ve kterém se tento gen nachází v jaderné DNA a tedy mitochondriální cílovou sekvenci již obsahuje [110]. Genová terapie může být využita i v prevenci přenosu tohoto genetického onemocnění. Oocyt (nebo zygota) ženy s mutací v mtDNA může být použit jako akceptor nemutované („wild type“) mtDNA. [111]

2 Cíl práce

Cílem diplomové práce bylo studovat ve dvou liniích primárních kožních fibroblastů s izolovaným deficitem F_1F_O-ATPsyntázy (mutace v genech *MTATP6* a *TMEM70*), ve srovnání s kontrolní linií primárních kožních fibroblastů, dopad tohoto deficitu na systém oxidační fosforylace, vybrané mitochondriální proteiny a mitochondriální síť v prvních dnech kultivace v médiu obsahujícím jako zdroj sacharidů galaktózu nebo glukózu.

Specifickým cílem práce bylo:

- Charakterizace růstu a stanovení vlivu délky kultivace na rovnovážné množství vybraných podjednotek komplexů oxidační fosforylace, fumarázy a porinu u primárních kožních fibroblastů kultivovaných v médiu Leibovitz, obsahující a neobsahující L-glutamin.

- Stanovení rovnovážného množství vybraných podjednotek komplexů oxidační fosforylace, fumarázy, porinu a podjednotek komplexu pyruvátdehydrogenázy a analýza mitochondriální sítě ve 2 liniích primárních kožních fibroblastů s deficitem F_1F_O-ATPsyntázy ve 4 vybraných kultivačních médiích.

- Stanovení rovnovážného množství komplexů oxidační fosforylace v linii kožních fibroblastů s izolovaným deficitem F_1F_O-ATPsyntázy způsobeným mutací v genu *TMEM70* po 5 dnech kultivace ve 4 vybraných médiích.

3 Materiál a metody

3.1 Materiál

3.1.1 Biologický materiál

Vzorky pacientů byly získány po informovaném souhlasu ve spolupráci s klinikou dětského a dorostového lékařství 1. LF Univerzity Karlovy a VFN.

3.1.1.1 Buněčné linie

- primární kožní fibroblasty s mutací m.8851T>C v genu *MTATP6* a heteroplasmií 80-90%, způsobující snížení množství a fosforylační aktivitu F_1F_O-ATPsyntázy
- primární kožní fibroblasty s mutací c.317-2A>G v genu *TMEM70*, způsobující sníženou biogenezi komplexu F_1F_O-ATPsyntázy
- primární kožní fibroblasty s mutací c.[312_321del10insAT];[845_846delCT] v genu *SURF1* (protein biogeneze komplexu IV dýchacího řetězce)
- kontrolní linie kultivovaných kožních fibroblastů (ATCC, USA)

3.1.2 Chemikálie

3.1.2.1 Čisté chemikálie

2-merkaptoethanol, Sigma (USA)

6-aminohexanová kyselina, Sigma-Aldrich (USA)

Akrylamid, Sigma (USA)

Bisakrylamid, Sigma (USA)

Bis-Tris, Sigma-Aldrich (USA)

Bromfenolová modř, Sigma (USA)

Coomassie Briliant Blue R-250, Sigma (USA)

Denaturovaný ethanol, Penta (ČR)

Dihydrogenfosforečnan draselný, Penta (ČR)

Dimethylsulfoxid (DMSO), Sigma-Aldrich (USA)

Dodecylsulfát sodný (SDS), Sigma (USA)

Ethanol 96%, Penta (ČR)

Galaktóza, Sigma-Aldrich (USA)

Glukóza, Sigma (USA)

Glycerol, Penta (ČR)

Glycin, Sigma (USA)

Hovězí sérový albumin (BSA), Sigma (USA)

Hydrogenuhličitan sodný, Lachema (ČR)

Hydroxid sodný, Penta (ČR)

Chlorid sodný, Penta (ČR)

Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA), Sigma (USA)

Kyselina chlorovodíková, Penta (ČR)

Kyselina octová, Penta (ČR)

L-glutamin 200 mM, PAA (Rakousko)

Methanol, Penta (ČR)

Barvivo MitoTracker Red, Life Technologies (USA)

N,N,N´,N´-tetramethylethylendiamin (TEMED), Sigma-Aldrich (USA)

n-dodecyl-*β*-D-maltopyranosid, Sigma-Aldrich (USA)

Oxalacetát, Sigma (USA)

Peroxosíran amonný, Sigma (USA)

Propan-1-ol, Penta (ČR)

Serva Blue G, Sigma-Aldrich (USA)

Síran měďnatý, Penta (ČR)

Tricine, Sigma (USA)

Tris, Sigma (USA)

Tween-20, Sigma (USA)

3.1.2.2 Roztoky a pufry

Směsi připravené z chemikálií v laboratoři

Anodový pufr „BN-PAGE“ [50 mM Bis-Tris-HCl; pH 7,0]

Anodový pufr „SDS-PAGE“ [100 mM Tris-HCl; pH 8,9]

Barvící roztok [0,25% (w/v) Coomassie Briliant Blue R 250; 45% (v/v) methanol; 10% (v/v) kyselina octová]

Extrakční pufr „BN-PAGE“ [75 mM Bis-Tris-HCl; pH 7,0; 1,75 M 6-

aminohexanová kyselina; 2 mM EDTA; 1% (v/v) koktejl inhibitorů proteáz (PIC, od společnosti Roche)]

Gelový pufr „SDS-PAGE“ [3 x koncentrovaný: 3 M Tris-HCl; pH 8,45; 0,3% (w/v) dodecylsulfát sodný]

Gelový pufr „BN-PAGE“ [3 x koncentrovaný: 150 mM Bis-Tris-HCl; pH 7,0; 1,5 M 6-aminohexanová kyselina]

Katodový bezbarvý pufr „BN-PAGE“ [15 mM Bis-Tris-HCl; pH 7,0; 50 mM tricin]

Katodový modrý pufr „BN-PAGE“ [15 mM Bis-Tris-HCl; pH 7,0; 50 mM tricin; 0,02% (w/v) Serva Blue G-250]

Katodový pufr „SDS-PAGE“ [100 mM Tris-HCl; pH 8,25; 100 mM tricin; 0,1% (w/v) dodecylsulfát sodný]

Odbarvovací roztok [25,5% (v/v) denaturovaný ethanol; 8% (v/v) kyselina octová]

„Radio-Immunoprecipitation Assay“ (RIPA) pufr [50 mM Tris-HCl; pH 7,4; 150 mM NaCl; 1 mM fenylmethylsulfonyl fluorid; 1 mM kyselina ethylendiamintetraoctová; 1% (v/v) Triton X-100; 1% (w/v) sodium deoxycholát; 0,1% (w/v) dodecylsulfát sodný; 1% (v/v) PIC]

Roztok Lowry A [0,4% (w/v) NaOH, 2% (w/v) Na_2CO_3]

Roztok Lowry B [0,5% (w/v) $CuSO_4$]

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

Transferový pufr [25 mM Tris-HCl; 192 mM glycin; 10% (v/v) metanol; 0,02% (w/v) dodecylsulfát sodný]

„Tris-buffered saline – Tween-20“ (TBST) pufr [20 mM Tris-HCl; pH 7,5; 137 mM NaCl; 0,1% (v/v) Tween]

„Tris-buffered saline“ (TBS) pufr [20 mM Tris-HCl; pH 7,5; 137 mM NaCl]

Vzorkový pufr „BN-PAGE“ [0,05 M Bis-Tris-HCl; pH 7,0; 0,75 M 6-aminohexanová kyselina; 0,5 M EDTA; 5% (w/v) Serva Blue G-250; 1% PIC]

Vzorkový pufr „SDS-PAGE“ [4 x koncentrovaný: 50 mM Tris-Cl; pH 6,8; 12% (v/v) glycerol; 4% (w/v) dodecylsulfát sodný; 2% (v/v) β-merkaptoetanol; 0,01% (w/v) bromfenolová modř; 1% PIC]

Komerčně dodávané směsi

Antibiotický a antimykotický roztok (koncentrovaný 100x), PAA (Rakousko)

„Dulbecco's Modified Eagle“ medium (DMEM) neobsahující L-glutamin a glukózu, PAA (Rakousko)

EDTA-Trypsin roztok [koncentrovaný 10x: 0,5% (w/v) trypsinu; 0,2% (w/v) EDTA v roztoku PSB], PAA (Rakousko)

Fetální hovězí sérum-dializované, PAA (Rakousko)

Folinovo reagens, Sigma (USA)

Fosfátový pufr - PBS [koncentrovaný 10x: 100 mM Na_2HPO_4, 1,5 M NaCl, 20 mM KCl, 20 mM KH_2PO_4, pH 7,4], Lonza (Švýcarsko)

Koktejl inhibitorů proteáz (PIC), Roche (Švýcarsko)

Leibovitz médium neobsahující glutamin, Lonza (Švýcarsko)

Primární protilátky, jejich přehled je uveden v tabulce 3.1

„Quantum 333 for fibroblasts“ médium, PAA (Rakousko)

Sekundární protilátky, jejich přehled je uveden v tabulce 3.2

Standardy molekulových hmotností SeeBlue Plus 2 Prestained Standard, Invitrogen (USA) a Protein Mixture, GE healthcare (Velká Británie)

Substrát pro peroxidázu SuperSignal WestFemto Sensitivity Substrate, ThermoScientific (USA)

Sušené odtučněné mléko Laktimo, Promil (ČR)

*Tabulka 3.1: **Primární protilátky**. Přehled primárních protilátek a jejich ředění použité pro „BN-PAGE“ a „SDS-PAGE“.*

Protilátka	Ředění	Typ	Společnost
β-aktin	1:2 000	Králičí polyklonální	Cell Signaling (USA)
Porin	1:20 000	Myší monoklonální	MitoScience (Velká Británie)
FH	1:5 000	Myší monoklonální	Abnova (Taiwan)
Complex I subunit NDUFA9	1:3 333	Myší monoklonální	MitoScience (Velká Británie)
Complex II subunit 70 KDa Fp	1:20 000	Myší monoklonální	MitoScience (Velká Británie)
Complex III subunit NDUFA9 Core2	1:3 333	Myší monoklonální	MitoScience (Velká Británie)
Complex IV (COX) subunit II	1:10 000	Myší monoklonální	MitoScience (Velká Británie)
Complex V subunit α	1:5 000	Myší monoklonální	MitoScience (Velká Británie)
Complex V subunit β	1:10 000	Myší monoklonální	MitoScience (Velká Británie)
Complex V subunit OSCP	1:2 000	Myší monoklonální	MitoScience (Velká Británie)
Anti-CV-d	1:2 000	Myší monoklonální	MitoScience (Velká Británie)
PDH antipody coctail	1:4 000	Myší monoklonální	MitoScience (Velká Británie)

Tabulka 3.2: ***Sekundární protilátky.*** *Přehled sekundárních protilátek a jejich ředění použité pro „BN-PAGE“ a „SDS-PAGE“.*

Protilátka	Ředění	Typ	Společnost
proti králičím IgG konjugovaná s peroxidázou	1:1 666	Kozí polyklonální	Sigma-Aldrich (USA)
proti myším IgG konjugovaná s peroxidázou	1:2 000	Kozí polyklonální	Sigma-Aldrich (USA)

3.1.3 Použité přístroje

3D míchačka, Heidoloph (Německo)

Analytické váhy ABT 220-50M, Kern (Německo)

Aparatura pro vertikální elektroforézu Mini-PROTEAN 3 Cell, Bio-Rad (USA)

Automatické pipety Hermo Elektron (USA), Eppendorf (Německo), Gilson (USA)

Blotovací aparatura TE77X Semidry blotter, Hoefer (USA)

Centrifuga Biofuge 28RS, Heraeus Sepatech (Německo)

Centrifuga Mikro 200, Hettich Zentrifugen (Německo)

Centrifuga Universal 32R, Hettich Zentrifugen (Německo)

Dvoukomůrkový přístroj na přípravu gelového gradientu s pumpou Pump P-1, Pharmacia Biotech (Švédsko).

Elektroforetický zdroj PowerPac Basic, Bio-Rad (USA)

Inkubátor MCO-18 AIC, Sanyo (Japonsko)

Laminární box Clean Air, Schoeller (ČR)

Mikroskop DIAPHOT 200, NIKON (Japonsko)

pH metr 774, Metrohm (Švýcarsko)

Scepter Handheld Automated Cell Counter, MilliPore (USA)

Spektrofotometr UV-2401PC, Shimadzu (Japonsko)

Sušička gelů, Biometra (Německo)

Systém gelové dokumentace VersaDoc imaging systém, BioRad (USA)

Systém gelové dokumentace DigiGenius, Syngene (USA)

Termostat AccuBlock Digital Dry Bath, Labnet (USA)

Termoblok, Labnet (USA)

„Vortex“ Vortex-Genie 2, Scientific Industries (USA)

3.2 Metody

3.2.1 Práce s tkáňovými kulturami

3.2.1.1 Rozmražení a dlouhodobá kultivace buňek

Buňky primárních kožních fibroblastů byly skladovány v kryozkumavkách v počtu maximálně 300 000 buněk ve 2 ml média „Quantum 333 for fibroblasts“ (PAA) obsahujícího 1% (v/v) antibiotický a antimykotický roztok (PAA), značeno jako Quantum 333, a 10% (v/v) dimethylsulfoxidu při teplotě -196°C. Takto skladovaná kryozkumavka s buňkami byla nechána v termostatu při teplotě 37°C, dokud nebyl obsah ampule rozmražen a následně byl celý obsah kryozkumavky přemístěn do kultivační láhve s kultivační plochou 75 cm^2 obsahující 10 ml čerstvého kultivačního média. Jako kultivační médium bylo využíváno médium Quantum 333. Kultivační láhev byla ponechána přes noc v inkubátoru při 37°C a 5% CO_2. Druhý den bylo médium odsáto, buňky byly omyty 3-5 ml PBS pufru a do kultivační láhve bylo přidáno 10 ml kultivačního média. Buňky byly dále pěstovány do požadovaného množství v kultivačním médiu v inkubátoru při 37°C a 5% CO_2. Buňky byly „pasážovány“ a sklízeny při pokrytí 90-100% kultivační plochy jednou vrstvou buněk (90-100% konfluenci), nebo byly využity ke krátkodobé kultivaci při konfluenci 75%. Buňky nikdy nebyly „pasážovány“ vice jak 12 x. Kultivační médium bylo do lahví přidáváno o objemu 10 ml pomocí injekční stříkačky přes filtr o velikosti pórů 20 μm a měněno bylo po 3-5 dnech.

3.2.1.2 Krátkodobá kultivace ve vybraných kultivačních médiích

Z kultivační láhve o kultivační ploše 75 cm^2 s konfluencí buněk okolo 75% bylo odstraněno médium určené k dlouhodobé kultivaci, buňky byly omyty 3-5 ml PBS pufru a do kultivační láhve bylo přidáno médium DMEM (PAA) neobsahující L-glutamin a glukózu, obsahující 1% (v/v) antibiotický a antimykotický roztok (PAA). V tomto médiu byly buňky ponechány 6 h hladovět v inkubátoru při 37°C a 5% CO_2, aby došlo k rychlejšímu přizpůsobení buněk změně média. [112] Poté bylo z láhve médium

odstraněno, buňky byly omyty 3-5 ml roztoku PBS a do láhve bylo přidáno příslušné kultivační médium. Používaná média byla: médium „Quantum 333 for fibroblasts“ (PAA), DMEM (PAA) obsahující 2 mM L-glutamin a 5 mM glukóuzu (DMEMglc), DMEM obsahující 2 mM L-glutamin a 5 mM galaktózu (DMEMgal), Leibovitz (Lonza) neobsahující L-glutamin a Leibovitz obsahující 2 mM L-glutamin. Všechna média obsahovala 1% (v/v) antibiotický a antimykotický roztok (PAA) a všechna média DMEM a Leibovitz obsahovala 10% (v/v) dialyzovaného fetálního hovězího séra (PAA). Úplné složení použitých médií je uvedeno v tabulce 3.3. Všechna kultivační média byla do kultivačních láhví nalévána o objemu 10 ml pomocí injekční stříkačky přes filtr o velikosti pórů 20 μm. Buňky byly kultivovány v příslušném médiu v inkubátoru při 37°C a 5% CO_2.

3.2.1.3 „Pasážování“

Jedna kultivační láhev o kultivační ploše 75 cm^2 byla při 90-100% konfluenci „pastována“ do dvou kultivačních lahví o kultivační ploše 75 cm^2. Z láhve bylo odstraněno médium, buňky byly omyty 3-5 ml pufru PBS a do kultivační láhve bylo přidáno 2 ml roztoku EDTA-trypsinu (PAA). Následně byla láhev nechána inkubovat 10 minut v termostatu při 37°C. Poté bylo do kultivační láhve přidáno 3 ml kultivačního média k zastavení působení trypsinu a lehce jí bylo poklepáno o stůl, aby se buňky co nejlépe uvolnily. Poté byly buňky resupendovány pomocí pipety a 2,5 ml vzniklé suspenze buněk bylo rozděleno do dvou kultivačních láhví a do každé bylo přidáno 10 ml kultivačního média.

3.2.1.4 Izolace buněk

Z láhve bylo odstraněno médium, buňky byly omyty 3-5 ml PBS pufru a do kultivační láhve bylo přidáno 3-5 ml PBS pufru. Následně byly buňky strženy z kultivační plochy pomocí stěrky pro tkáňové kultury a vzniklá suspenze buněk byla přenesena do zkumavky Falcon o objemu 15 ml a centrifugována 6 min při 4°C a 600g. Následně byl odstraněn supernatant, peleta byla resuspendována ve 2 ml PBS a opět centrifugována 6 min při 4°C a 600g. Takto byla peleta buněk omyta dvakrát za sebou. Nakonec byl důkladně odstraněn supernatant a peleta buněk byla uložena v -80°C.

Tabulka 3.3: ***Složení použitých kultivačních médií.***

		Množství [mg/l]		
		DMEMglc/ DMEMgal	Leibovitz +/- L-glutamin	„Quantum 333 for fibroblasts“
Anorganické soli	chlorid vápenatý	200	140	200
	chlorid draselný	400	400	400
	chlorid hořečnatý	0	93,67	0
	chlorid sodný	6400	8000	6800
	dusičnan železitý	0,1	0	0
	síran hořečnatý	97,7	97,7	97,7
	dihydrogenfosforečnan sodný	125	0	140
	hydrogenfosforečnan sodný	0	190	0
	dihydrogenfosforečnan draselný	0	60	0
	hydrogenuhličitan sodný	3700	0	2200
Aminokyseliny	glycin	30	200	0
	L-glutamin	292	292/0	292
	L-alanin	0	0	450
	L-arginin	69,4	500	115,7
	L-asparagin	0	0	250
	L-cystein	48	120	26
	L-histidin	31	250	31
	L-isoleucin	105	250	52
	L-leucin	105	125	52
	L-lysin	116,5	75	57,8
	L-methionin	30	150	15
	L-fenylalanin	66	250	32
	L-serin	42	200	0
	L-treonin	95	600	48
	L-tryptofan	16	20	10
	L-tyrosin	72	273,6	36
	L-valin	94	200	40
Vitaminy	pantotenová kyselina	4	1	1
	kyselina listová	4	1	1,5
	cholinchlorid	4	1	1
	myo-inositol	7,2	2	2
	nikotinamid	4	1	1
	pyridoxal	4	1	1
	riboflavin	0,4	0,1	0,1
	thiamin	4	1	1
Ostatní	fenolová červeň	15	10	10
	dializované fetální hovězí sérum (PAA)	10% (v/v)	10% (v/v)	0
	sérum dodávané již v médiu (PAA)	0	0	neznámé množství
	glukóza	900/0	0	3400
	galaktóza	0/900	900	0
	pyruvát sodný	0	550	0

	antibiotický a antimykotický roztok(PAA)	1% (v/v)	1% (v/v)	1% (v/v)

3.2.1.5 Měření růstové křivky buněk

Do každé jamky šestijamkových destiček bylo nasazeno 20-30 000 buněk. Do každé jamky bylo přidáno 3 ml kultivačního média Quantum 333. Destičky byly následně ponechány 48 h v inkubátoru při 37°C a 5% CO_2. Poté bylo z každé jamky odsáto médium, každá jamka byla omyta 2 ml pufru PBS a přidáno 3 ml média DMEM neobsahujícího L-glutamin a glukózu, obsahujícího 1% (v/v) antibiotický a antimykotický roztok. Následně byly buňky ponechány v tomto médiu 6 h hladovět v inkubátoru při 37°C a 5% CO_2. Poté bylo z každé jamky médium odsáto, jamky byly omyty 2 ml PBS pufru a přidáno 3 ml příslušného média. Destičky s buňkami byly kultivovány v příslušném médiu v inkubátoru při 37°C a 5% CO_2. Každých 24 h byly izolovány buňky ze dvou jamek (měření v „dubletu“) a pátý den inkubace bylo buňkám měněno médium. Při sklízení jamek bylo po odstranění média a omytí 2 ml PBS do každé jamky přidáno 400 µl roztoku EDTA-trypsinu. Následně byla destička inkubována 10 minut v termostatu při 37°C. Poté bylo do příslušné jamky přidáno 3 ml kultivačního média k zastavení působení trypsinu, buňky byly resuspendovány pomocí pipety a přeneseny do zkumavky Falcon o objemu 15 ml. Poté bylo do jamky přidáno 1-3 ml roztoku PBS, pomocí kterého byla jamka omyta a roztok byl přenesen do stejné zkumavky Falcon. To bylo prováděno 1-3 x dokud nebyly z jamky izolovány všechny buňky, což bylo kontrolováno pod mikroskopem. Poté byl měřen objem suspenze buněk a koncentrace buněk o průměru 12-24 µm v této suspenzi. Koncentrace buněk byla měřena pomocí ručního počítače buněk (Milipore). Výsledný počet buněk v jamce byl vypočítán jako součin objemu suspenze buněk a koncentrace buněk.

3.2.1.6 Analýza mitochondriální sítě v buňkách

Na jedno měření bylo nasazeno 10 000 buněk na kulaté krycí sklíčko (d=12 mm) umístěné v jamce dvacetičtyřjamkové destičky. Do každé jamky bylo přidáno 0,5 ml kultivačního média Quantum 333. Destičky byly následně inkubovány 48 h při 37°C a 5% CO_2. Poté byla odebrána dvě sklíčka, na kterých byly značeny mitochondrie, a z ostatních jamek bylo odsáto médium, jamky byly omyty 0,5 ml PBS pufru a přidáno do nich 0,5 ml média DMEM neobsahující L-glutamin a glukózu, obsahující 1% (v/v) antibiotický a antimykotický roztok. Následně byly buňky ponechány 6 h hladovět v inkubátoru při 37°C a 5% CO_2. Poté bylo z každé jamky médium odsáto, sklíčko bylo omyto 0,5 ml PBS pufru

a bylo přidáno 0,5 ml příslušného média. Destičky s buňkami byly kultivovány v příslušném médiu v inkubátoru při 37 °C a 5 % CO_2. Takto kultivované buňky na sklíčkách byly následně barveny flourescenční sondou MitoTracker Red.

Zásobní roztok flourescenční sondy MitoTracker Red rozpuštěné v roztoku dimethylsulfoxidu byl připraven v koncentraci 1mM. Z tohoto zásobního roztoku byl připraven roztok o koncentraci barviva 50 nM v příslušném médiu. 500 µl takto připraveného roztoku bylo pipetováno do jamky obsahující sklíčko s buňkami a destička byla následně inkubována při 37°C po dobu 10-20 min. Buňky byly následně pozorovány flourescenčním mikroskopem (Nikon Diaphot 200) pod UV světlem za použití filtru UV-2A 330-380 při zvětšení 600x a obraz byl snímán CCD kamerou DP50 (Olympus).

3.2.2 Analýza množství podjednotek a celých komplexů oxidační fosforylace a dalších mitochondriálních proteinů pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného („SDS-PAGE“), modré nativní elektrofézy v polyakrylamidovém gelu („BN-PAGE“), „Western blotu“ a imunodetekce

3.2.2.1 Příprava vzorku celobuněčného lyzátu pro analýzu pomocí elektroforézy v prostředí dodecylsulfátu sodného („SDS-PAGE“)

Celobuněčný lyzát byl připraven z pelety buněk z 1 lahve o kultivační ploše 75 cm^2. Peleta buněk byla resuspendována v 150 µl roztoku RIPA a inkubována 20 min na ledu a každých 5 min byla míchána pomocí vortexu. Poté byla směs centrifugována 20 min při 51 000 g a 4ºC. Následně byl odebrán supernatant, v takto vzniklém buněčné lyzátu byla Lowryho metodou [113] měřena koncentrace proteinu a vzorek byl skladován při -80ºC.

15 µg proteinů buněčného lyzátu bylo promícháno se vzorkovým pufrem „SDS-PAGE“ v poměru 4:1 (v/v). Směs byla zahřívána na 37°C po dobu 30 min a poté nanášena na gel.

3.2.2.2 Příprava vzorku celobuněčného lyzátu fibroblastů pro analýzu pomocí modré nativní elektroforézy („BN-PAGE“) [114]

Celobuněčný lyzát byl připraven z pelety buněk z 6 lahví o kultivační ploše 75 cm^2. Peleta buněk byla resuspendována ve 100 µl ledového roztoku PBS obsahujícího 1% (v/v) roztok

koktejlu inhibitorů proteáz. K vzniklé suspenzi bylo přidáno 100 µl roztoku ledového digitoninu rozpuštěného v PBS (8 mg/ml). Směs byla inkubována 10 min na ledu, poté byla 7x ředěna ledovým PBS a centrifugována 5 min při 12 000 g a 4ºC. Následně byl odstraněn supernatant a peleta byla resuspendována v 1 ml ledového PBS a opět centrifugována 5 min při 12 000 g a 4ºC. Takto byla peleta promyta 2x za sebou.

Poté byla peleta resuspendována ve 100 µl extrakčního pufru a do vzniklé suspenze bylo přidáno 20 µl 10% (w/v) n-dodecyl-*β*-D-maltopyranosid. Směs byla inkubována na ledu po dobu 5 min. Suspenze byla následně centrifugována 30 min při 20 000 g a 4ºC. Byl odebrán supernatant a přidáno k němu, po odebrání 10 µl na změření koncentrace proteinu, 10 µl vzorkového pufru „BN-PAGE“. Připravený vzorek byl nanášen na gel, případně skladován při -80ºC.

3.2.2.3 Stanovení koncentrace proteinu Lowryho metodou [113]

Ze stanovovaného vzorku bylo odebráno 2 x 3 µl pro dvě nezávislá měření (výsledná koncentrace proteinu v daném vzorku poté byla vypočítána jako průměr těchto dvou měření). 3 µl vzorku byly doplněny destilovanou vodou na objem 200 µl. Jako kalibrační křivka pro odečtení koncentrace proteinu byla použita koncentrační řada hovězího sérového albuminu: 5, 10, 15, 20, 25 µg.

K připraveným vzorkům byl přidán 1 ml směsi vzniklé smícháním zásobních roztoků Lowry A:B:C v poměru 48:1:1. Vzorky byly promíchány pomocí „vortexu“ a inkubovány při laboratorní teplotě 15 min. Následně bylo ke každému vzorku přidáno 100 µl čerstvě ředěného Folinova reagens s destilovanou vodou v poměru 1:1, promícháno pomocí „vortexu“ a inkubováno při laboratorní teplotě 30 min. Poté byla měřena absorbance při 700 nm pomocí spektrofotometru UV-2401PC.

3.2.2.4 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného („SDS-PAGE“)

Aparatura Mini Proteanu 3 cell (BioRad) byla sestavena podle návodu výrobce a mezi skla byl připraven dvouvrstvý polyakrylamidový gel postupným nanesením 12% separačního gelu a 4% zaostřovacího gelu, složení je uvedeno v tabulce 3.3. Polymerace separačního gelu probíhala při laboratorní teplotě pod převrstvením destilovanou vodou 1 h. Zaostřovací gel, do kterého byl vložen hřebínek o 10 nebo 15 zubech, polymeroval 0,5 h také při laboratorní teplotě.

Tabulka 3.3.: ***Složení gelu použitého pro elektroforézu v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného.***

Složka	Množství [ml]	
	Zaostřovací gel 4%	Separační gel 12%
Zásobní roztok akrylamidu a bisakrylamidu (48% akrylamid; 1,5% bisakrylamid)	0,8	2,4
Gelový pufr (3 x koncentrovaný)	3,33	3,33
Destilovaná voda	5,8	4,2
APS 10%	0,12	0,05
TEMED	0,012	0,005

Po promytí jamek pomocí injekční stříkačky bylo do první jamky aplikováno 3 µl standardů s různými molekulovými hmotnosti (SeeBlue Plus 2 Prestained Standard). Do zbylých jamek byly naneseny připravené vzorky, množství proteinu v každé jamce bylo 15 µg. Elektroforéza probíhala za laboratorní teploty za použití katodového a anodového „SDS-PAGE“ pufru při 40 V cca 20 min a 100 V 2,5 h.

3.2.2.5 Modrá nativní elektroforéza v polyakrylamidovém gelu („BN-PAGE“) [114]

Mezi skla sestavené aparatury Mini Protean 3 Cell (BioRad) byl připraven separační lineárně gradientový polyakrylamidový gel (od 6% do 15%) pomocí dvoukomůrkového přístroje na přípravu gelového gradientu s pumpu P-1 (Pharmacia Biotech). Polymerace gradientového separačního gelu probíhala při laboratorní teplotě pod převrstvením destilovanou vodou 1. Následně byla ze separačního gelu odsáta voda a byl připraven zaostřovací gel (4%), do kterého byl vložen hřebínek o 10 zubech, který polymeroval 0,5 h také při laboratorní teplotě. Složení gelů je uvedeno v tabulce 3.4.

Tabulka 3.4.: ***Složení gelu použitého pro modrou nativní elektroforézu v polyakrylamidovém gelu.***

Složka	Množství [ml]		
	Separační gel		Zaostřovací gel
	6% gel	15% gel	4% gel
Zásobní roztok akrylamidu a bisakrylamidu (48% akrylamid; 1,5% bisakrylamid)	1,2	3	0,4
Gelový pufr (3 x koncentrovaný)	3,33	3,33	1,66
Destilovaná voda	5,4	1,64	2,87
Glycerol 75%	0	2	0
APS 10%	0,06	0,03	0,06
TEMED	0,006	0,003	0,006

Po promytí jamek pomocí injekční stříkačky bylo do první jamky aplikováno 5 µl standardů s různými molekulovými hmotnosti Protein Mixture (GE healthcare). Do zbylých jamek byly aplikovány připravené vzorky, množství proteinu v každé jamce bylo 30 µg. Elektroforéza byla spuštěna s „modrým„ katodovým a anodovým pufrem při 40 V a 4ºC po dobu 3 h. Poté byl „modrý“ katodový pufr nahrazen bezbarvým „katodovým“ pufrem a elektroforéza dále probíhala 16 h při 40 V a 4ºC.

3.2.2.6 Přenos proteinů na PVDF membránu („Semi-dry western blot“)

Po ukončení elektroforézy byla aparatura Mini Protean 3 Cell (BioRad) rozebrána, odstraněna vrstva zaostřovacího gelu a vrstva separačního gelu byla inkubována v transferovém pufru 0,5 h na 3D třepačce. Polyvinylidendifluoridová (PVDF) membrána (Immobilon-P, Milipore) o rozměrech gelu byla aktivována 15 s v methanolu, poté 5 min hydratována v destilované vodě a nakonec 15 min ekvilibrována v transferovém pufru.

Na anodě blotovací aparatury TE77X Semidry blotter (Hoefer) byl připraven „sendvič“, tak že na sebe byly naskládány v daném pořadí: 3 kusy papírů Whatman o rozměrech gelu, PVDF membrána, gel a 3 kusy papírů Whatman. Všechny složky byly při skládání dostatečně navlhčeny transférovým pufrem. Z tohoto „sendviče“ byly pomocí skleněné tyčinky vytlačeny vzduchové bubliny. Na „Sendvič“ byla položena katoda opláchnutá destilovanou vodou. Přenos probíhal 1 h při napětí: [(plocha gelu) x 0,6] mA.

Po ukončení přenosu byl „sendvič“ rozebrán a PVDF membrána usušena za laboratorní teploty volně na vzduchu. Pro vizuální kontrolu kvality přenosu byl gel inkubován v barvícím roztoku přes noc na 3D třepačce a následně odbarven odbarvovacím roztokem. Následně byl gel vložen na cca 1 min do destilované vody (kvůli omytí odbarvovacího roztoku) a usušen na sušičce gelů (Biometra) 1,5 h při 90ºC.

3.2.2.7 Imunodetekce

Usušená PVDF membrána byla za laboratorní teploty aktivována 15 s v methanolu, poté byla přemístěna do destilované vody, kde byla ponechána 5 min, a následně do pufru TBS, kde byla ponechána 10 min. Mezitím byl připraven blokovací roztok suspendováním 1,25 g sušeného mléka ve 25 ml pufru TBS [5% (w/v) roztok mléka]. Poté byl odstraněn pufr TBS a bylo přidáno 25 ml připraveného blokovacího roztoku, membrána byla takto blokována za laboratorní teploty 2 h na 3D třepačce.

Všechny následující inkubace a omývání byly prováděny na 3D třepačce při laboratorní teplotě. Blokování bylo ukončeno odstraněním blokovacího roztoku a omytím membrány pufrem TBS 3 x za sebou po dobu 10 min. Následně byla membrána inkubována 2 h v roztoku primární protilátky. Roztok primární protilátky byl připraven přidáním protilátky do 2% (w/v) roztoku mléka (0,4 g sušeného mléka suspendovaného ve 20 ml pufru TBST). Po inkubaci v roztoku primární protilátky byla membrána opláchnuta 3 x pufrem TBST po dobu 10 min. Následně byla membrána inkubována 1 h v roztoku sekundární protilátky, který byl připraven přidáním protilátky do 20 ml 2% (w/v) roztoku mléka v pufru TBST.

Následovalo opláchnutí membrány 3 x pufrem TBST a 1 x pufrem TBS vždy po dobu 10 min.

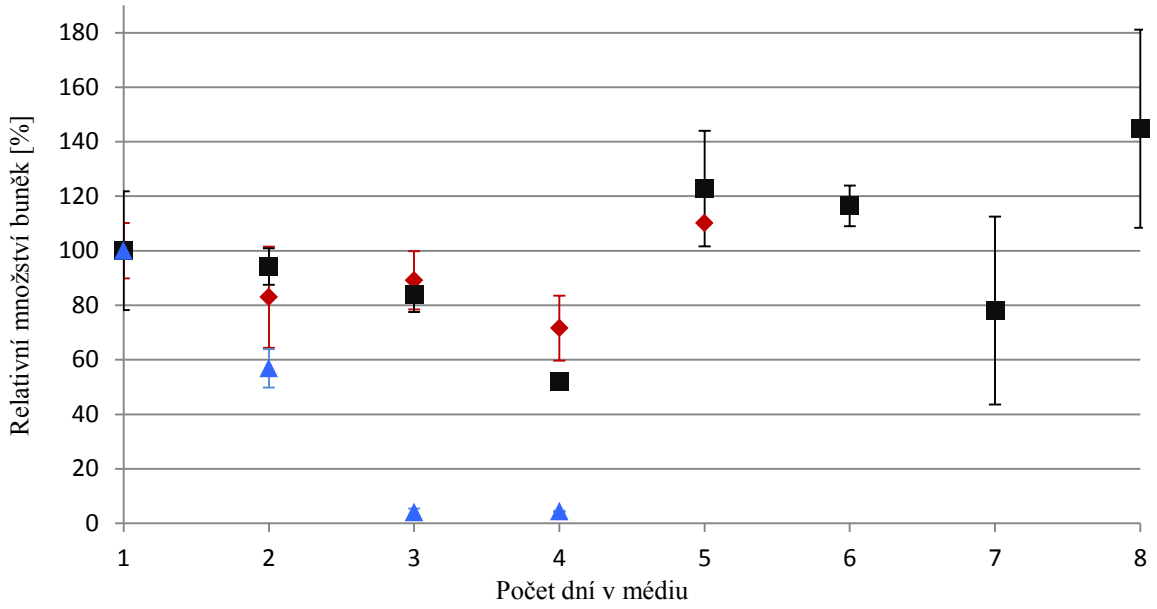
Detekce proteinů byla provedena chemiluminiscencí, kdy na membránu položenou na transparentní fólii byla nanesena směs substrátu pro peroxidázu (SuperSignal WestFemto Sensitivity Substrate, od společnosti ThermoScientific). Následně byla membrána detekována CCD kamerou pomocí přístroje VersaDoc 4000 (BioRad) nebo DigiGenius (Syngene). Vyhodnocení intenzity signálu, bylo provedeno pomocí programu Quantity One (BioRad).

4 Výsledky

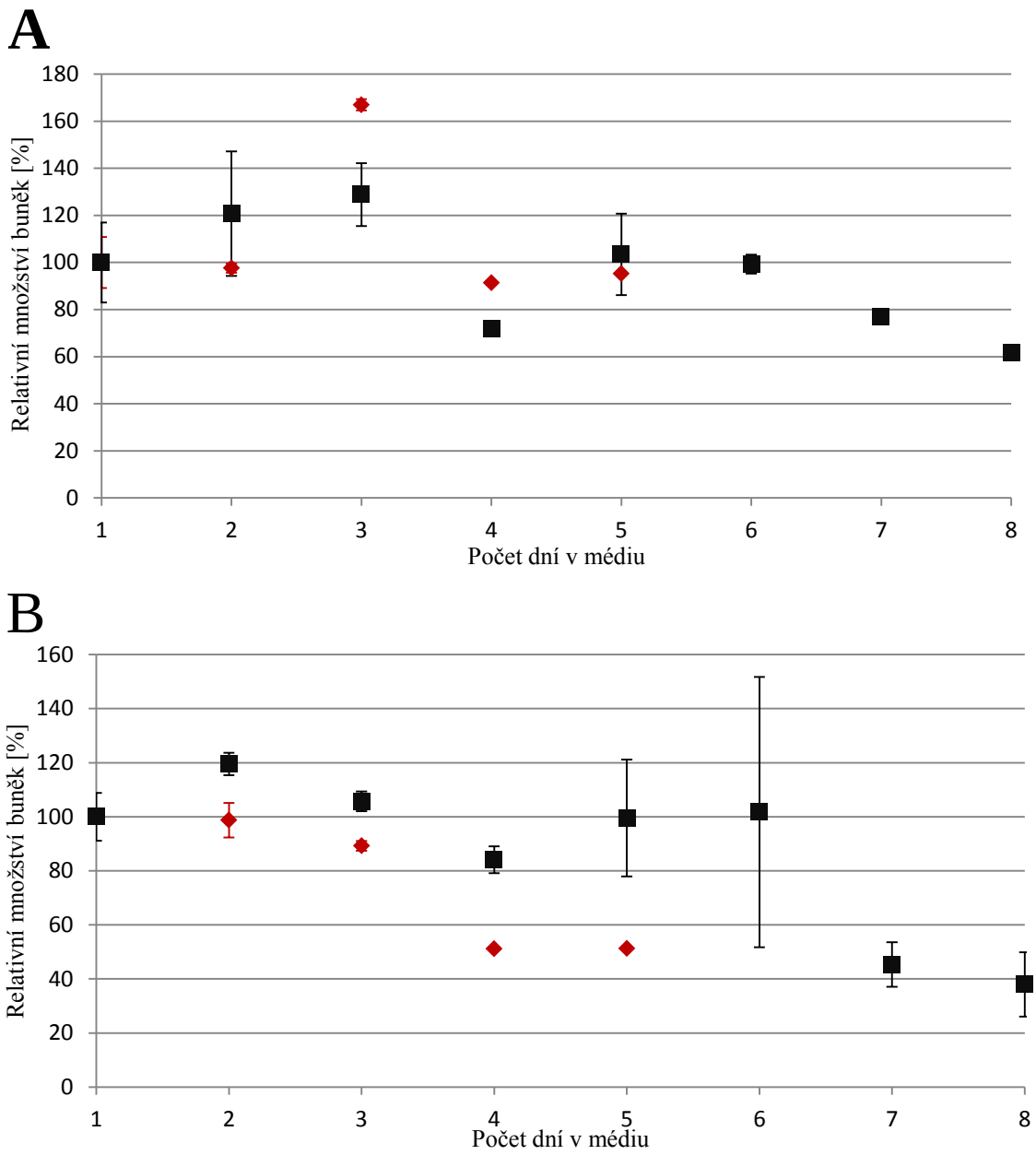
Experimenty byly prováděny za použití primárních kožních fibroblastů, které byly dlouhodobě pěstovány do požadovaného množství v médiu Quantum 333. Následně byly buňky po 6 h hladovění (v médiu DMEM neobsahujícím L-glutamin, sacharidy a sérum), které způsobilo rychlejší reakci buněk na změnu média [112], přemístěny do média určeného ke krátkodobé kultivaci. Buňky nikdy nebyly „pasážovány“ vice jak 12 x.

4.1 Charakterizace růstu a stanovení vlivu délky kultivace na rovnovážné množství vybraných podjednotek komplexů oxidační fosforylace, fumarázy a porinu u primárních kožních fibroblastů s primárním deficitem F_1F_O-ATPsyntázy v médiu Leibovitz obsahujícím a neobsahujícím L-glutamin

V experimentech byla stanovena růstová křivka krátkodobé kultivace v médiu Leibovitz bez glutaminu, obsahujícím jako zdroj sacharidů 2 mM galaktózu, do kterého byl nebo nebyl přidán L-glutamin (v množství 2 mM) u dvou buněčných linií s primárním deficitem F_1F_O-ATPsyntázy (jedné s mutací v genu *TMEM70* a jedné s mutací v genu *MTATP6*) a jedné kontrolní linii. V médiu obsahujícím L-glutamin byla navíc měřena růstová křivka i linie primárních kožních fibroblastů s mutací ve faktoru biogeneze komplexu IV dýchacího řetězce (použité jako pozitivní kontrola). Viz obrázky 4.1-4.2.



Obrázek 4.1: ***Růstová křivka kontrolních primárních kožních fibroblastů v médiu Leibovitz obsahujícím (značeno ■) a neobsahujícím (značeno ◆) L-glutamin a primárních kožních fibroblastů pacienta s mutací ve faktoru biogeneze komplexu IV dýchacího řetězce v médiu Leibovitz obsahujícím L-glutamin (značeno ▲).*** *Hodnoty byly získány jako průměr ze dvou měření a chybové úsečky mají hodnotu rozdílu mezi průměrem a zjištěnými hodnotami.*



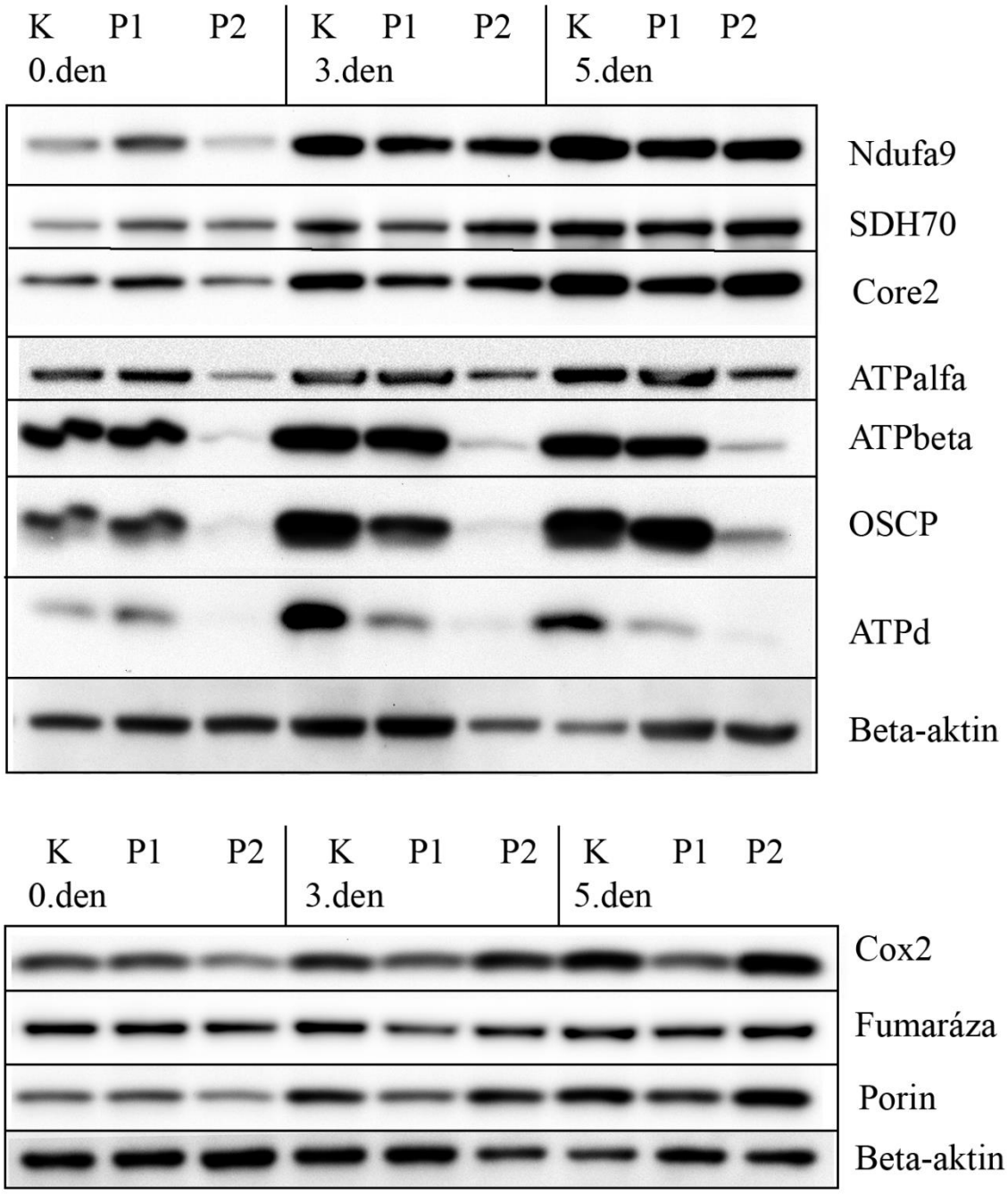
Obrázek 4.2: ***Růstová křivka primárních kožních fibroblastů pacienta s mutací v genu MTATP6 (A) a v genu TMEM70 (B) v médiu Leibovitz obsahujícím (značeno ■) a neobsahujícím (značeno ◆) L-glutamin.*** *Hodnoty byly získány jako průměr ze dvou měření a chybové úsečky mají hodnotu rozdílu mezi průměrem a zjištěnými hodnotami.*

Rozdíl v růstu u kontrolní linie v těchto vybraných médií patrný nebyl a linie vykazovala po celou dobu měření schopnost růstu. U linie s mutací ve faktoru biogeneze komplexu IV dýchacího řetězce docházelo k poklesu množství buněk již v prvních dnech kultivace a 3. den byl jejich počet již minimální, buňky tedy nevykazovaly schopnost růstu ani přežití v těchto podmínkách.

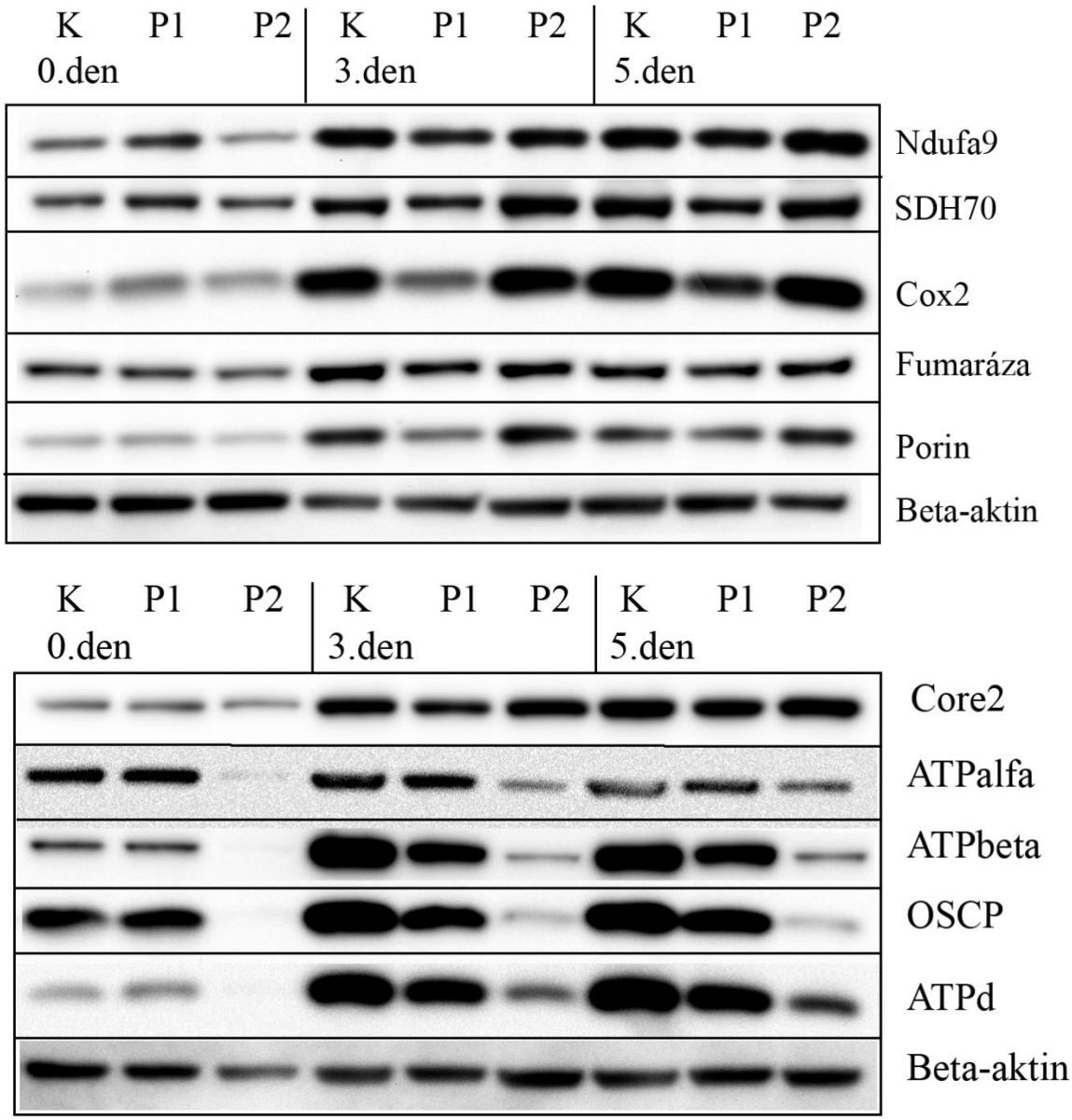
U linie s mutací v genu *MTATP6* bylo pozorováno zastavení růstu této linie okolo 4. a 5. dne kultivace v obou vybraných médií. U linie s mutaví v genu *TMEM70* nebyla pozorována výrazná schopnost růstu a k vysokému poklesu množství buněk (nejméně o 40%) dochází v kultuře v médiu neobsahujícím L-glutamin 4. den a v médiu obsahujícím L-glutamin 7. den.

Déle bylo stanovováno množství vybraných podjednotek komplexů dýchacího řetězce včetně F_1F_O-ATPsyntázy, fumarázy (jako ukazatele množství enzymů citrátového cyklu) a porinu (jako ukazatele množství mitochondrií) v těchto buněčných liniích. Primární kožní fibroblasty, byly pomocí dlouhodobé kultivace v médiu Quantum 333 „namnoženy“ do požadovaného množství (viz kapitola 3.2.2.1), část buněk byla izolována (značeno jako 0. den) a zbytek buněk byl po 6 h hladovění přemístěn do média Leibovitz obsahujícího a neobsahujícího L-glutamin. Buňky byly sklízeny po 3. a 5. dnech kultivace v těchto médiích. Viz kapitola 3.2.1. Práce s tkáňovými kulturami.

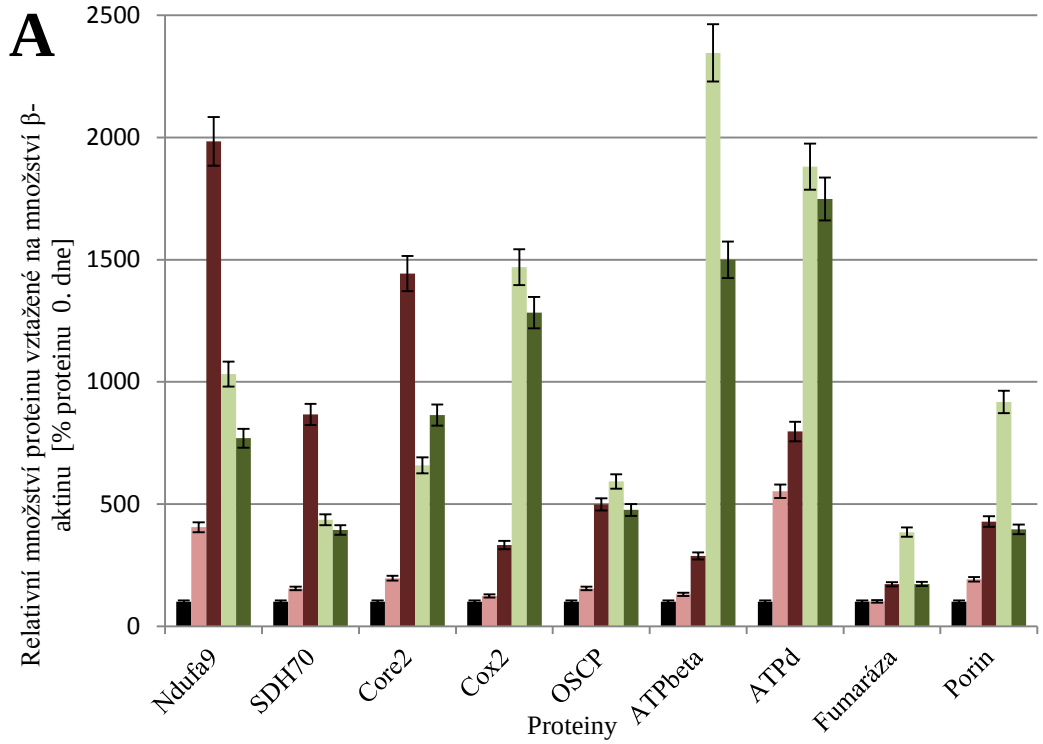
15 μg buněčného lyzátu takto kultivovaných primárních kožních fibroblastů bylo separováno pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE), vybrané proteiny byly detekovány pomocí „Western blotu“ s následnou imunodetekcí. Jako 0. den na obou sériích „blotů“ byl použit stejný buněčný lyzát připravený z buněk před kultivací v obou médiích Leibovitz. Jako kontrola množství nanášeného proteinu na gel byl použit protein β-aktin (viz obrázky 4.3 a 4.4). Pro vyhodnocení intenzity signálu byl použit program Qantity one (Alpha Innotech). Intenzita signálu jednotlivých proteinů byla vztažena na intenzitu signálu β-aktinu. Následně byly jednotlivé hodnoty signálů vztaženy na hodnoty signálů před začátkem kultivace v médiu Leibovitz, tzv. 0. den. (graficky znázorněno na obrázku 4.5).

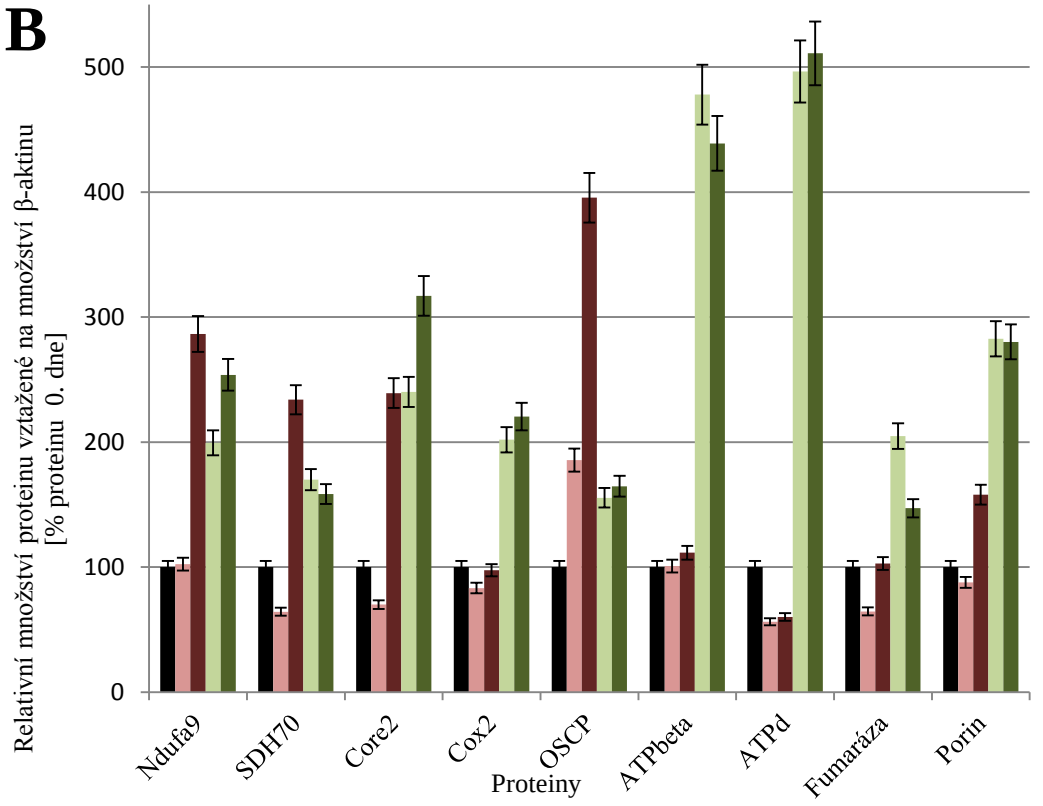


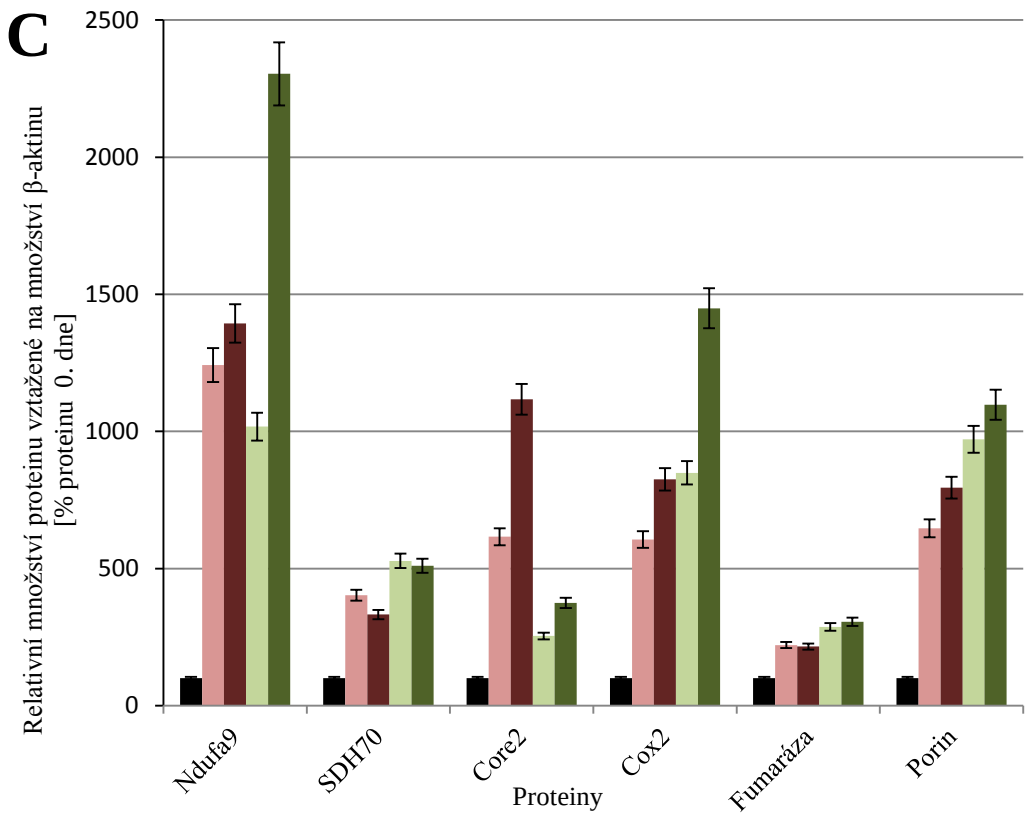
Obrázek 4.3. ***Stanovení množství vybraných proteinů pomocí „SDS-PAGE“ elektroforézy a “Western blotu“ s následnou imunodetekcí v primárních kožních fibroblastech po 3 a 5 dnech kultivace v médiu Leibovitz neobsahujícím L-glutamin.*** *Na obrázcích jsou vzorky pacienta s mutací v MTATP6 značeny jako P1 a pacienta s mutací v TMEM70 značeny jako P2. Kontrolní linie je na obrázcích vyznačena jako K. Jako 0. den jsou značeny buňky před kultivací v médiu Leibovitz bez glutaminu dále 3. den jsou buňky kultivované 3 dny a 5 dní v tomto médiu. Detekovanými podjednotkami komplexů dýchacího řetězce byly jedna podjednotka komplexu I (Ndufa9), komplexu II (SDH70), komplexu III (Core2), komplexu IV (Cox2) a čtyři podjednotky F_1F_O-ATPsyntázy (OSCP, ATPalfa, ATPbeta, ATPd). Dále byla sledována hladina fumarázy a porinu. Jako kontrola množství nanášeného vzorku na gel byl použit β-aktin.*



Obrázek 4.4. ***Stanovení množství vybraných proteinů pomocí „SDS-PAGE“ elektroforézy a “Western blotu“ s následnou imunodetekcí v primárních kožních fibroblastech po 3 a 5 dnech kultivace v médiu Leibovitz obsahujícím 2 mM L-glutaminu.*** *Na obrázcích je kontrolní linie značena jako K, linie s mutací v MTATP6 jako P1 a linie s mutací v TMEM70 jako P2. Jako 0. den jsou značeny buňky před kultivací v médiu Leibovitz bez glutaminu dále 3. den jsou buňky kultivované 3 dny a 5 dní v tomto médiu. Detekovanými podjednotkami komplexů dýchacího řetězce byly jedna podjednotka komplexu I (Ndufa9), komplexu II (SDH70), komplexu III (Core2), komplexu IV (Cox2) a čtyři podjednotky F_1F_O-ATPsyntázy (OSCP, ATPalfa, ATPbeta, ATPd). Dále byla sledována hladina fumarázy a porinu. Jako kontrola množství nanášeného vzorku na gel byl použit β-aktin.*


A
Relativní množství proteinu vztažené na množství β-aktinu [% proteinu 0. dne]
2500
2000
1500
1000
500
0
Ndufa9
SDH70
Core2
Cox2
OSCP
ATPbeta
ATPd
Fumaráza
Porin
Proteiny


B
Relativní množství proteinu vztažené na množství β-aktinu [% proteinu 0. dne]
500
400
300
200
100
0
Ndufa9
SDH70
Core2
Cox2
OSCP
ATPbeta
ATPd
Fumaráza
Porin
Proteiny



Obrázek 4.5: ***Kvantifikace rovnovážných hladin sledovaných proteinů 0., 3. a 5. den kultivace v médiu Leibovitz obsahujícím a neobsahujícím L-glutamin u kontrolní linie (A) a liniích s mutací v genu MTATP6 (B) a genu TMEM70 (C).*** *Intenzita signálu proteinu byla vztažena na intenzitu signálu β-aktinu a jednotlivé hodnoty jsou uváděny relativně v procentech signálu proteinů před začátkem kultivace v médiu Leibovitz, tzv. 0.den (značeno ■). Hodnoty po 3 dnech kultivace v médiu Leibovitz neobsahujícím L-glutamin jsou značeny ■ a po 5 dnech kultivace ■. Hodnoty po 3 dnech kultivace v médiu Leibovitz obsahujícím 2 mM L-glutamin jsou značeny ■ a po 5 dnech kultivace ■ . Grafy obsahují chybové úsečky denzitometrického vyhodnocení s hodnotou 5%. Ndufa9 je podjednotkou komplexu I dýchacího řetězce, SDH70 podjednotkou komplexu II, Core2 podjednotkou komplexu III, Cox2 podjednotkou komplexu IV a OSCP, ATPbeta a ATPd jsou podjednotkami F_1F_O-ATPsyntázy.*

U kontrolní linie primárních kožních fibroblastů v médiu Leibovitz bez L-glutaminu byl pozorován nárůst jednotlivých podjednotek komplexů dýchacího řetězce včetně F_1F_O-ATPsyntázy, fumarázy a porinu již 3. den a 5. den byl tento nárůst ještě vyšší (obrázek 4.5A). V médiu obsahujícím L-glutamin bylo 3. den také pozorováno zvýšení množství těchto proteinů, ovšem 5. den se tento nárůst částečně snižuje, kromě podjednotky komplexu III dýchacího řetězce, jejíž množství se ještě zvyšovalo.

U linie s mutací v genu *MTATP6* bylo v médiu Leibovitz bez L-glutaminu pozorováno zvýšení množství jednotlivých proteinů až den 5. V médiu obsahujícím L-glutamin byl pozorován nárůst proteinu již 3. den a u podjednotky komplexů dýchacího řetězce I a III byl tento nárůst 5. den ještě vyšší. Množství ostatních proteinů bylo buď srovnatelné s množstvím pozorovaným den 3., nebo se snižovalo (viz obrázek 4.5B).

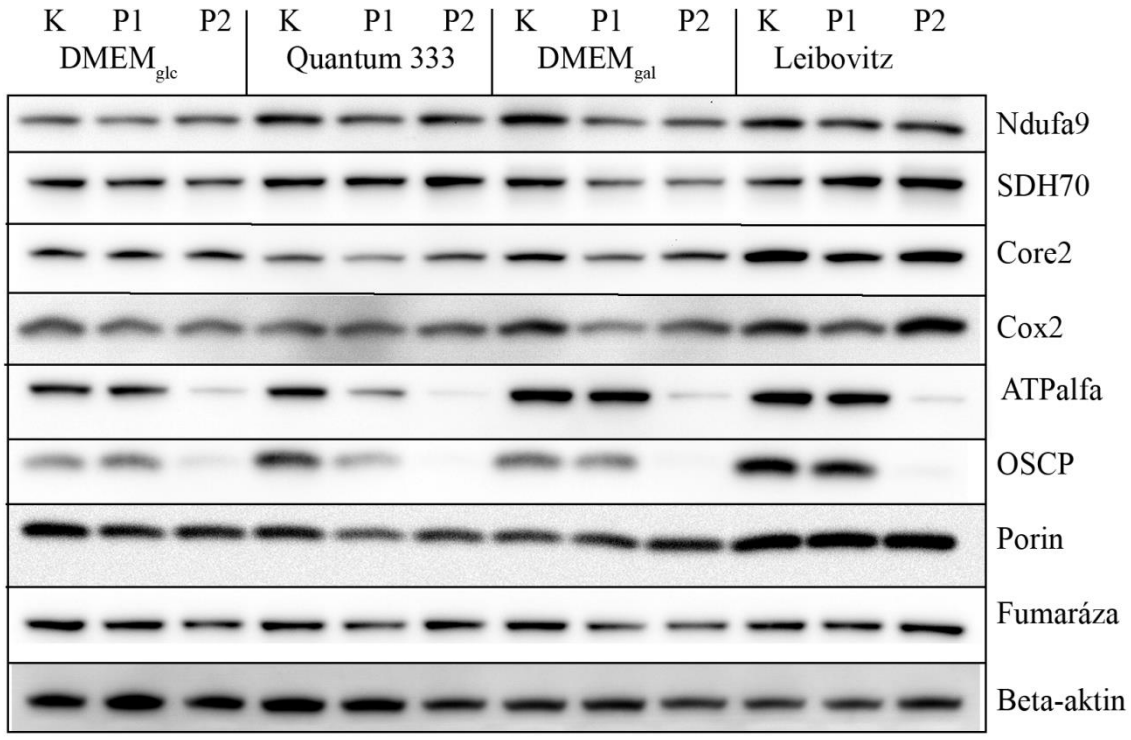
U linie s mutací v genu *TMEM70* byl v médiu Leibovitz bez L-glutaminu 3. den pozorován nárůst vybraných proteinů a tento nárůst byl den 5. ještě vyšší u většiny proteinů, kromě podjednotky komplexu II dýchacího řetězce a fumarázy (viz obrázek 4.5C). V médiu obsahujícím L-glutamin bylo také pozorováno zvýšení množství jednotlivých proteinů již den 3. a den 5. bylo toto zvýšení ještě vyšší, kromě podjednotky komplexu II dýchacího řetězce a fumarázy. Navíc byl v obou médiích s délkou kultivace pozorovaný nárůst množství podjednotek F_1F_O-ATPsyntázy.

Nárůsty množství většiny stanovovaných proteinů byly obecně u pacienta s mutací v genu *MTATP6* nižší, než u pacienta s mutací v genu *TMEM70* a kontroly.

4.2 Stanovení rovnovážného množství vybraných podjednotek komplexů oxidační fosforylace, fumarázy, porinu a podjednotek komplexu pyruvátdehydrogenázy ve 2 liniích primárních kožních fibroblastů s deficitem F_1F_O-ATPsyntázy ve 4 vybraných kultivačních médiích

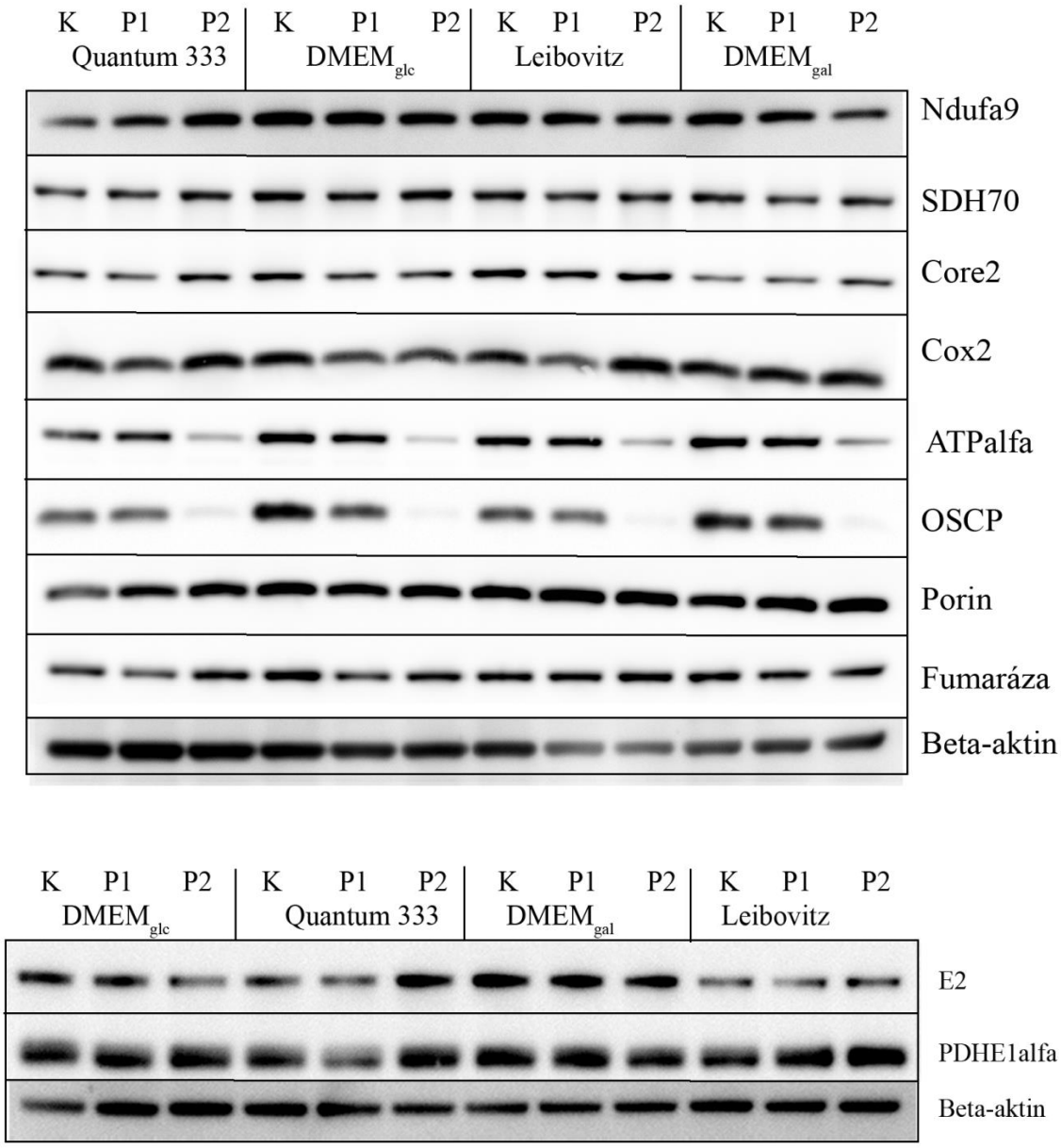
V dalších experimentech bylo stanovováno množství vybraných podjednotek komplexů dýchacího řetězce včetně F_1F_O-ATPsyntázy, fumarázy (jako ukazatele množství enzymů citrátového cyklu) a porinu (jako ukazatele množství mitochondrií) u primárních kožních fibroblastů. Primární kožní fibroblasty, byly pomocí dlouhodobé kultivace v médiu Quantum 333 „namnoženy“ do požadovaného množství buněk (viz kapitola 3.2.2.1) a následně byly buňky po 6 h hladovění přemístěny do 4 vybraných médiích: DMEM obsahující 5 mM glukózu, DMEM obsahující 5 mM galaktózu, Leibovitz obsahující 5 mM galaktózu a „Quantum 333 for fibroblasts“ obsahující 18,8 mM glukózu. Všechna média obsahovala 2 mM L-glutamin. Kompletní složení jednotlivých médií je uvedeno v tabulce 3.3. Buňky byly sklízeny po 3 a 5 dnech kultivace v těchto médiích (viz kapitola 3.2.1.). Po 5 dnech kultivace bylo stanovováno ještě množství podjednotek pyruvátdehydrogenázového komplexu.

15 µg celobuněčného lyzátu primárních kožních fibroblastů bylo separováno pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného („SDS-PAGE“), vybrané proteiny byly detekovány pomocí „Western blotu“ s následnou imunodetekcí. Jako kontrola množství nanášeného proteinu na gel byl použit protein β-aktin (viz obrázek 4.6 a 4.7). Pro vyhodnocení intenzity signálu byl použit program Qantity one (Bio-Rad). Intenzita signálu jednotlivých proteinů byla vztažena na intenzitu signálu β-aktinu. Následně byly jednotlivé hodnoty signálů vztaženy na hodnoty signálů po kultivaci v médiu DMEM obsahujícím 5 mM glukózu. (graficky znázorněno na obrázcích 4.8-4.10), nebo na hodnoty signálů u kontrolní linie (graficky znázorněno na obrázku 4.11).

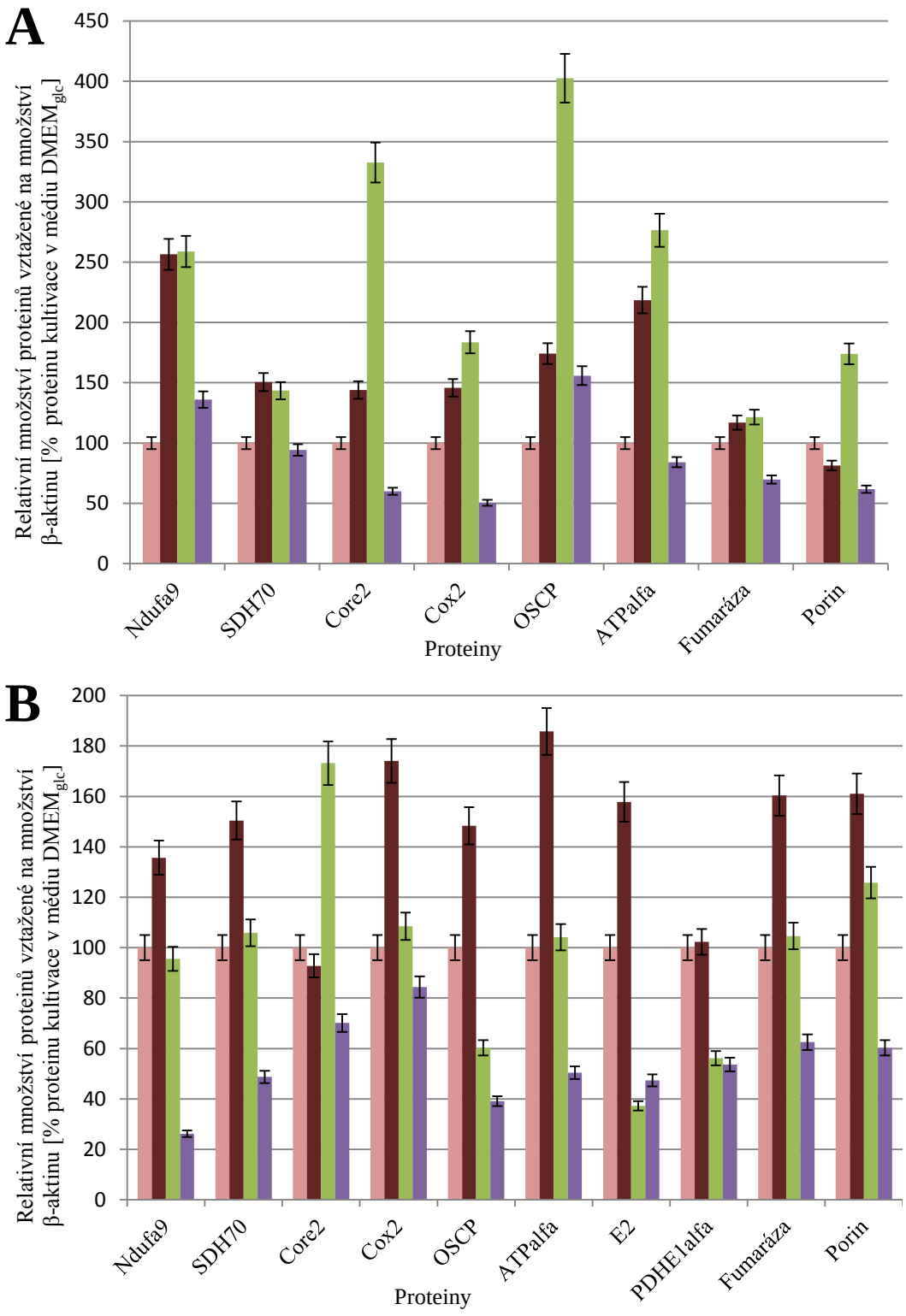


Obrázek 4.6. ***Stanovení množství vybraných mitochondriálních proteinů pomocí „SDS-PAGE“ elektroforézy a “Western blotu“ s následnou imunodetekcí v primárních kožních fibroblastech po 3 dnech kultivace ve vybraných médiích.*** *Vybraná kultivační média byla: DMEM obsahujícím 5 mM glukózu (značeno DMEMglc), DMEM obsahujícím 5 mM galaktózu (značeno DMEMgal), Leibovitz (značeno Leibovitz) a „Quantum 333 for fibroblasts“(značeno: Quantum 333).Všechna média obsahovala 2 mM L-glutamin. Na obrázcích je kontrolní linie značena jako K, linie s mutací v MTATP6 jako P1 a linie s mutací v TMEM70 jako P2. Detekovanými podjednotkami komplexů dýchacího řetězce byly jedna podjednotka komplexu I (Ndufa9), komplexu II (SDH70), komplexu III (Core2), komplexu IV (Cox2) a čtyři podjednotky F_1F_O-ATPsyntázy (OSCP, ATPalfa, ATPbeta,*

ATPd). Dále byla sledována hladina fumarázy a porinu. Jako kontrola množství nanášeného vzorku na gel byl použit β-aktin.

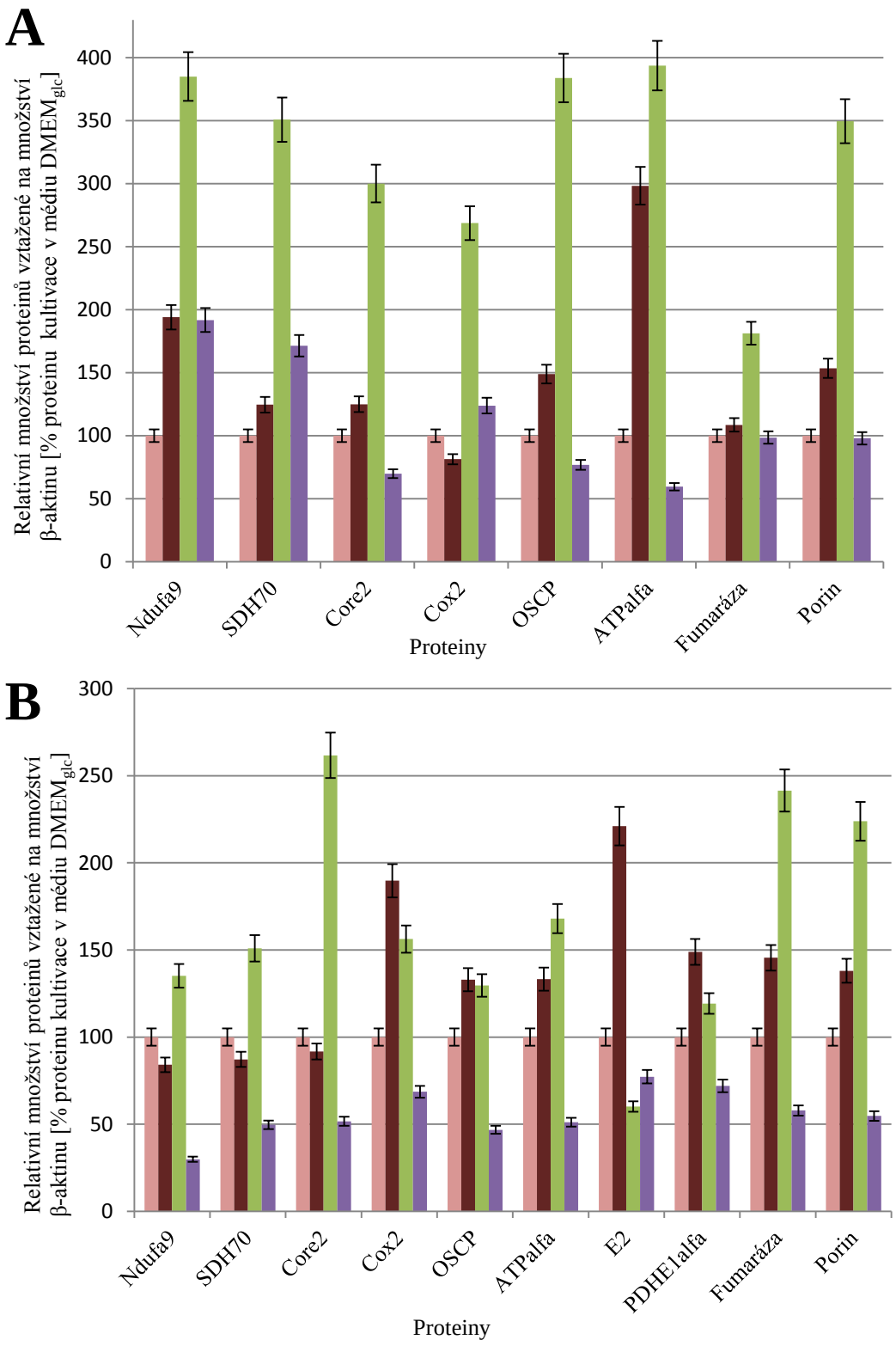


Obrázek 4.7. ***Stanovení množství vybraných mitochondriálních proteinů pomocí „SDS-PAGE“ elektroforézy a “Western blotu“ s následnou imunodetekcí v primárních kožních fibroblastech po 5 dnech kultivace ve vybraných médiích.*** *Vybraná kultivační média byla: DMEM obsahujícím 5 mM glukózu (značeno DMEMglc) DMEM obsahujícím 5 mM glaktózu (značeno DMEMgal), Leibovitz (značeno Leibovitz) a „Quantum 333 for fibroblasts“(značeno: Quantum 333). Všechna média obsahovala 2 mM L-glutamin. Kontrolní linie je na obrázcích značena jako K, linie s mutací v MTATP6 jako P1 a linie s mutací v TMEM70 jako P2. Detekovanými podjednotkami komplexů dýchacího řetězce byly jedna podjednotka komplexu I (Ndufa9), komplexu II (SDH70), komplexu III (Core2), komplexu IV (Cox2) a čtyři podjednotky F_1F_O-ATPsyntázy (OSCP, ATPalfa, ATPbeta, ATPd). Dále byla sledována hladina dvou podjednotek pyruvátdehydrogenázového komplexu (E2 a PDHE1alfa), fumarázy a porinu. Jako kontrola množství nanášeného vzorku na gel byl použit β-aktin.*



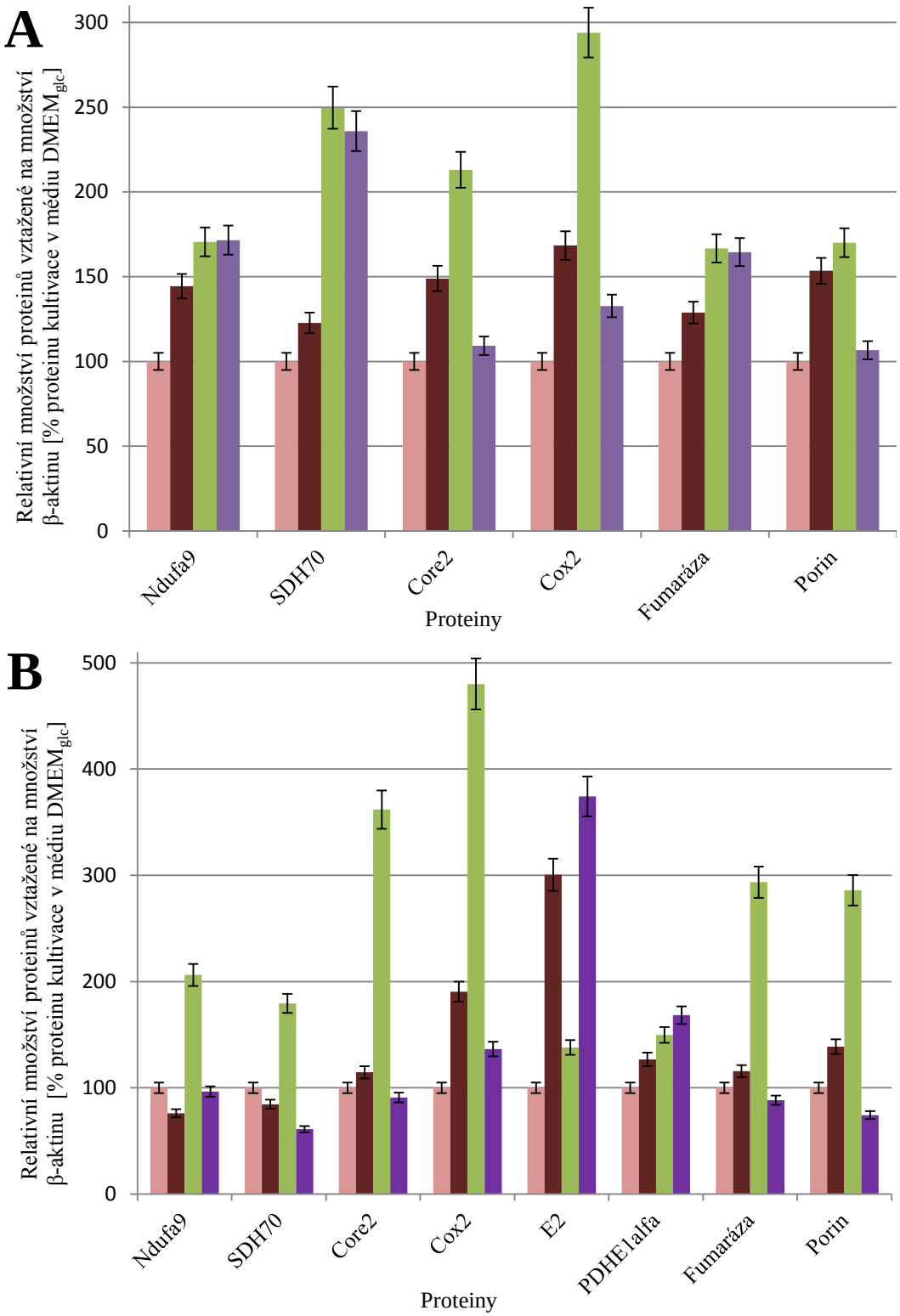
Obrázek 4.8: ***Kvantifikace rovnovážných hladin sledovaných mitochondriálních proteinů po 3(A) a 5(B) dnech kultivace ve vybraných médiích u kontrolní linie primárních kožních fibroblastů.*** *Intenzita signálu proteinů byla vztažena na intenzitu signálu β-aktinu a jednotlivé hodnoty jsou uváděny relativně v procentech signálu proteinů po kultivaci v médiu DMEM obsahujícím 5 mM glukózu (značeno ■, DMEMglc). Dalšími kultivačními médii byly: DMEM obsahující 5 mM galaktózu (značeno ■, DMEMgal), Leibovitz*

(značeno ■, Leibovitz) a „Quantum 333 for fibroblasts“(značeno ■, Quantum 333). Všechna média obsahovala 2 mM L-glutamin. Kompletní složení médií je uvedeno v tabulce 3.3. Grafy obsahují chybové úsečky denzitometrického vyhodnocení s hodnotou 5%. Ndufa9 je podjednotkou komplexu I dýchacího řetězce, SDH70 podjednotkou komplexu II, Core2 podjednotkou komplexu III, Cox2 podjednotkou komplexu IV, OSCP a ATPalfa jsou podjednotkami F_1F_O-ATPsyntázy a E2 a PDHE1alfa jsou podjednotkami pyruvátdehydrogenázového komplexu.



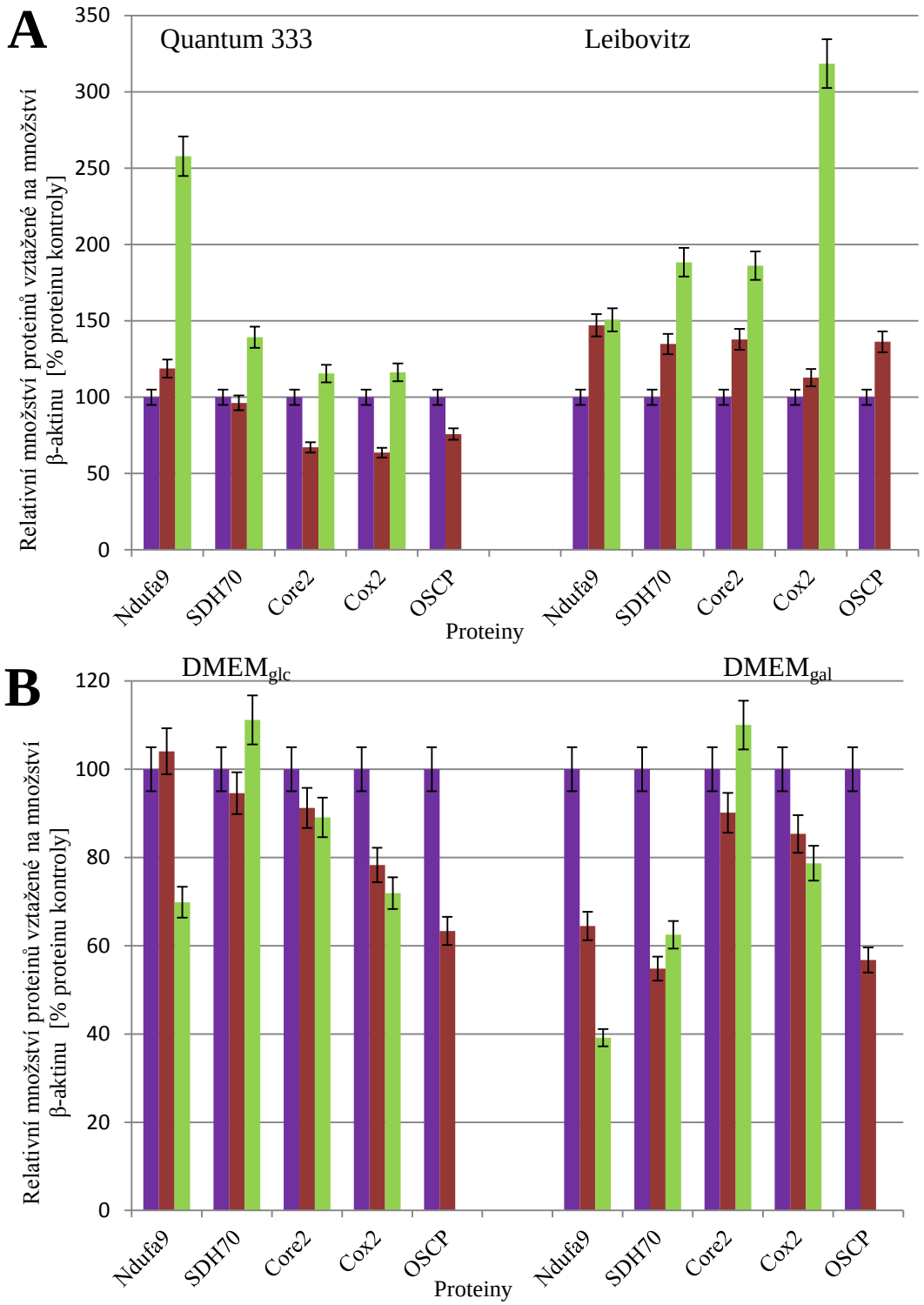
Obrázek 4.9: ***Kvantifikace rovnovážných hladin sledovaných mitochondriálních proteinů po 3(A) a 5(B) dnech kultivace ve vybraných médiích u linie primárních kožních fibroblastů s mutací v MTATP6.*** *Intenzita signálu proteinů byla vztažena na intenzitu signálu β-aktinu a jednotlivé hodnoty jsou uváděny relativně v procentech signálu proteinů*

po kultivaci v médiu DMEM obsahujícím 5 mM glukózu (značeno ■, DMEMglc). Dalšími kultivačními médii byly: DMEM obsahující 5 mM galaktózu (značeno ■, DMEMgal), Leibovitz (značeno ■, Leibovitz) a „Quantum 333 for fibroblasts“(značeno ■,Quantum 333). Všechna média obsahovala 2 mM L-glutamin. Kompletní složení médií je uvedeno v tabulce 3.3. Grafy obsahují chybové úsečky denzitometrického vyhodnocení s hodnotou 5%. Ndufa9 je podjednotkou komplexu I dýchacího řetězce, SDH70 podjednotkou komplexu II, Core2 podjednotkou komplexu III, Cox2 podjednotkou komplexu IV, OSCP a ATPalfa jsou podjednotkami F_1F_O-ATPsyntázy a E2 a PDHE1alfa jsou podjednotkami pyruvátdehydrogenázového komplexu.



Obrázek 4.10: ***Kvantifikace rovnovážných hladin sledovaných mitochondriálních proteinů po 3(A) a 5(B) dnech kultivace ve vybraných médiích u linie primárních kožních fibroblastů s mutací v TMEM70.*** *Intenzita signálu proteinů byla vztažena na intenzitu signálu β-aktinu a jednotlivé hodnoty jsou uváděny relativně v procentech signálu proteinů po kultivaci v médiu DMEM obsahujícím 5 mM glukózu (značeno ■, DMEMglc). Dalšími kultivačními médii byly: DMEM obsahující 5 mM galaktózu (značeno ■, DMEMgal), Leibovitz (značeno ■, Leibovitz) a „Quantum 333 for fibroblasts“(značeno ■*

‚Quantum 333). Všechna média obsahovala 2 mM L-glutamin. Kompletní složení médií je uvedeno v tabulce 3.3. Grafy obsahují chybové úsečky denzitometrického vyhodnocení s hodnotou 5%. Ndufa9 je podjednotkou komplexu I dýchacího řetězce, SDH70 podjednotkou komplexu II, Core2 podjednotkou komplexu III, Cox2 podjednotkou komplexu IV, OSCP a ATPalfa jsou podjednotkami F_1F_O-ATPsyntázy a E2 a PDHE1alfa jsou podjednotkami pyruvátdehydrogenázového komplexu.



Obrázek 4.11: ***Kvantifikace rovnovážných hladin sledovaných proteinů po 5 dnech kultivace ve vybraných médiích u kontrolní linie (značeno ■) a liniích s mutací v MTATP6 (značeno ■) a TMEM70 (značeno ■).*** *Na obrázku A jsou znázorněny hladiny sledovaných proteinů v kožních fibroblastech po kultivaci v médiu "quantum 333 for fibroblasts" (vlevo, , značeno Quantum 333) a Leibovitz (vpravo, značeno Leibovitz). Na obrázku B jsou znázorněny hladiny sledovaných proteinů v kožních fibroblastech po kultivaci v médiu DMEM obsahujícím 5 mM glukózu (vlevo, značeno $DMEM_{glc}$) nebo*

galaktózu (vpravo, značeno $DMEM_{gal}$). Intenzita signálu proteinů byla vztažena na intenzitu signálu β-aktinu a jednotlivé hodnoty *jsou uváděny relativně v procentech signálu proteinů u kontrolní linie. Kompletní složení médií je uvedeno v tabulce 3.3. Grafy obsahují chybové úsečky denzitometrického vyhodnocení s hodnotou 5%. Ndufa9 je podjednotkou komplexu I dýchacího řetězce, SDH70 podjednotkou komplexu II, Core2 podjednotkou komplexu III, Cox2 podjednotkou komplexu IV a OSCP a ATPalfa jsou podjednotkami F_1F_O-ATPsyntázy.*

U kontrolní linie primárních kožních fibroblastů bylo v médiu DMEM obsahujícím jako zdroj sacharidů galaktózu oproti médiu DMEM obsahující jako zdroj sacharidů glukózu po 3 dnech kultivace pozorováno zvýšené množství většiny vybraných proteinů (podjednotek všech komplexů dýchacího řetězce a fumarázy), kromě porinu. Po kultivaci v médiu Leibovitz, které také obsahuje galaktózu, bylo oproti kultivaci v médiu DMEM obsahujícím glukózu pozorováno zvýšené množství všech vybraných proteinů, včetně porinu. V médiu Quantum 333 bylo množství vyšší než v médiu DMEM obsahujícím glukózu u podjednotky komplexu I a jedné z podjednotek komplexu V (OSCP), množství ostatních proteinů bylo nižší, nebo srovnatelné (viz obrázek 4.8A).

U kontrolní linie bylo po 5. dnech kultivace v médiu DMEM obsahujícím galaktózu oproti médiu DMEM obsahující glukózu pozorované vyšší množství vybraných podjednotech všech komplexů dýchacího řetězce, kromě podjednotky komplexu III. Bylo pozorováno zvýšení podjednotky E2 pyruvátdehydrogenázového komplexu, ale ne podjednotky PDHE1alfa. Dále bylo pozorováno větší množství fumarázy a porinu. Kromě podjednotky komplexu III bylo množství vybraných proteinů v médiu Leibovitz nižší, než v médiu DMEM obsahujícím galaktózu. V médiu „Quantum 333 for fibroblast“ bylo množství vybraných proteinů nejnižší ze všech médií (viz obrázek 4.8B).

U linie s mutací v genu *MTATP6* bylo v médiu DMEM obsahujícím galaktózu oproti médiu DMEM obsahující glukózu po 3 dnech kultivace pozorované zvýšené množství většiny podjednotek komplexů dýchacího řetězce, kromě podjednotky komplexu IV a dále bylo pozorováno zvýšené množství porinu. Po kultivaci v médiu Leibovitz, které také obsahuje galaktózu, bylo oproti kultivaci v médiu DMEM obsahujícím glukózu pozorováno zvýšené množství všech vybraných proteinů a jejich množství bylo v tomto médiu nejvyšší ze všech kultivačních médií. V médiu Quantum 333 bylo množství podjednotek komplexu I, II a IV vyšší, podjednotek III a V nižší a fumarázy a porinu stejné jako po kultivaci v médiu DMEM obsahujícím glukózu (viz obrázek 4.9A).

U této linie byla po 5. dnech kultivace v médiu DMEM obsahujícím galaktózu oproti médiu DMEM obsahující glukózu pozorováno větší množství podjednotek komplexu IV a V, a dále obou podjednotek (E2 a PDHE1alfa) pyruvátdehydrogenázového komplexu, fumarázy a porinu. V médiu Leibovitz bylo množství většiny proteinů vyšší, než v médiu DMEM obsahujícím galaktózu, kromě podjednotky komplexu IV, podjednotky OSCP komplexu V a obou podjednotek pyruvátdehydrogenázového komplexu. V médiu Quantum 333 bylo množství vybraných proteinů, kromě podjednotky E2 pyruvátdehydrogenázového komplexu, nejnižší ze všech médií (viz obrázek 4.9B).

U linie s mutací v genu *TMEM70* bylo po 3 dnech kultivace v médiu DMEM obsahujícím galaktózu oproti médiu DMEM obsahující glukózu pozorováno zvýšené množství všech vybraných proteinů (podjednotek komplexů dýchacího řetězce I-IV, fumarázy a porinu). Po kultivaci v médiu Leibovitz také obsahujícím jako zdroj sacharidů galaktózu, bylo oproti kultivaci v médiu DMEM obsahujícím glukózu také pozorováno zvýšené množství všech vybraných proteinů a jejich množství bylo v tomto médiu vyšší než v médiu DMEM obsahujícím galaktózu (viz obrázek 4.10A).

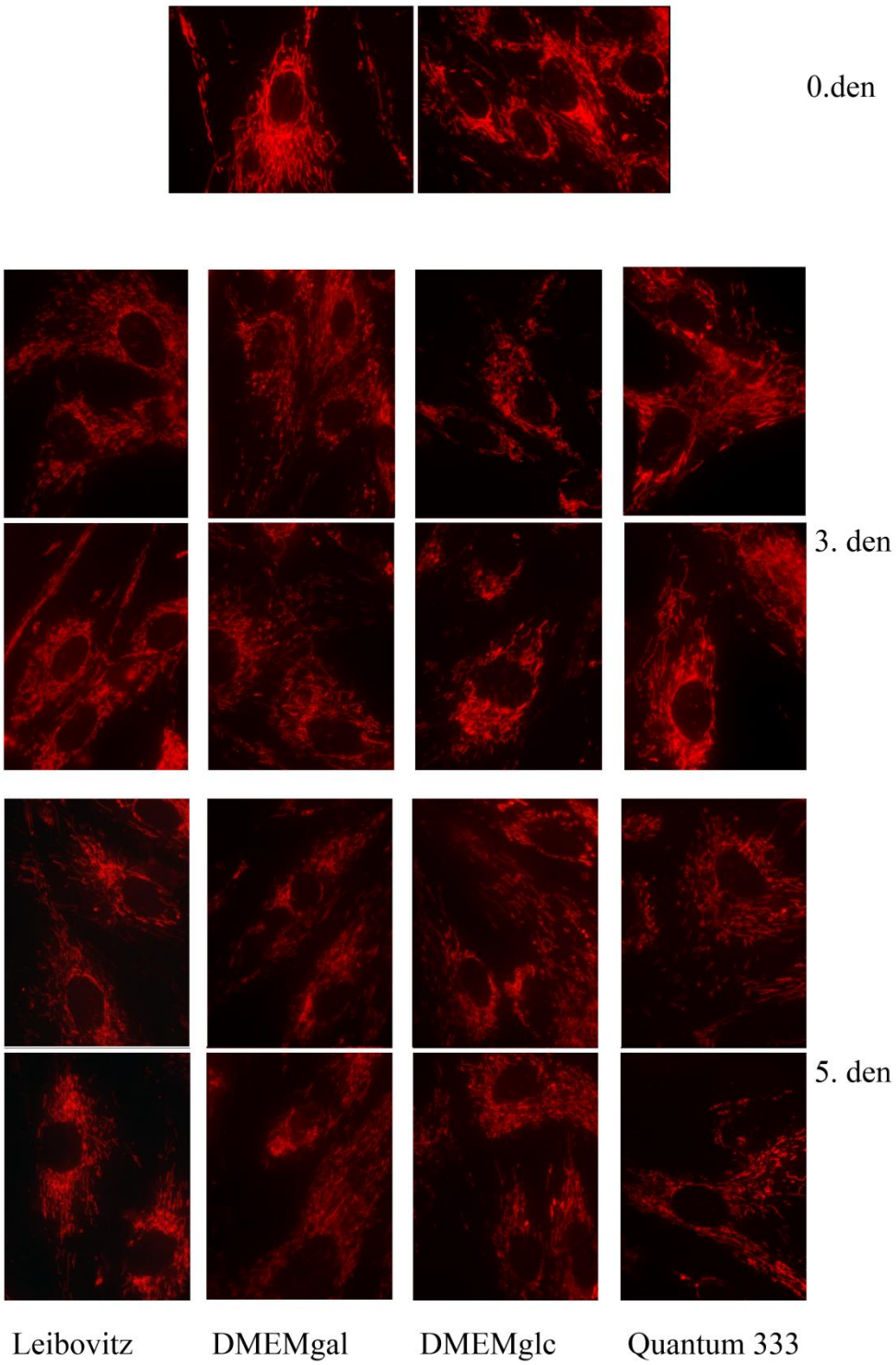
Po 5. dnech kultivace byl v médiu DMEM obsahujícím galaktózu oproti médiu DMEM obsahující glukózu pozorovan nárůst pouze podjednotky komplexu IV. Dále bylo pozorováno zvýšené množství obou podjednotek (E2 a PDHE1alfa) pyruvátdehydrogenázového komplexu, fumarázy a porinu. V médiu Leibovitz bylo množství většiny proteinů vyšší, než v médiu DMEM obsahujícím galaktózu, kromě podjednotek pyruvátdehydrogenázového komplexu (viz obrázek 4.10B).

Po pěti dnech kultivaci v médiu Leibovitz bylo množství podjednotek komplexů I-IV dýchacího řetězce u pacientských liniích vyšší, než u kontroly. Podobný trend nebyl pozorován v médiu DMEM obsahujícím galaktózu nebo glukózu. V médiu Quantum 333 bylo množství podjednotek komplexů I-IV dýchacího řetězce u linie s mutací v genu *TMEM70* vyšší, než u kontroly a u linie s mutací v genu *MTATP6* bylo vyšší množství, než u kontroly, pouze podjednotky komplexu I dýchacího řetězce, množství ostatních podjednotek bylo srovnatelné nebo nižší (viz obrázek 4.11).

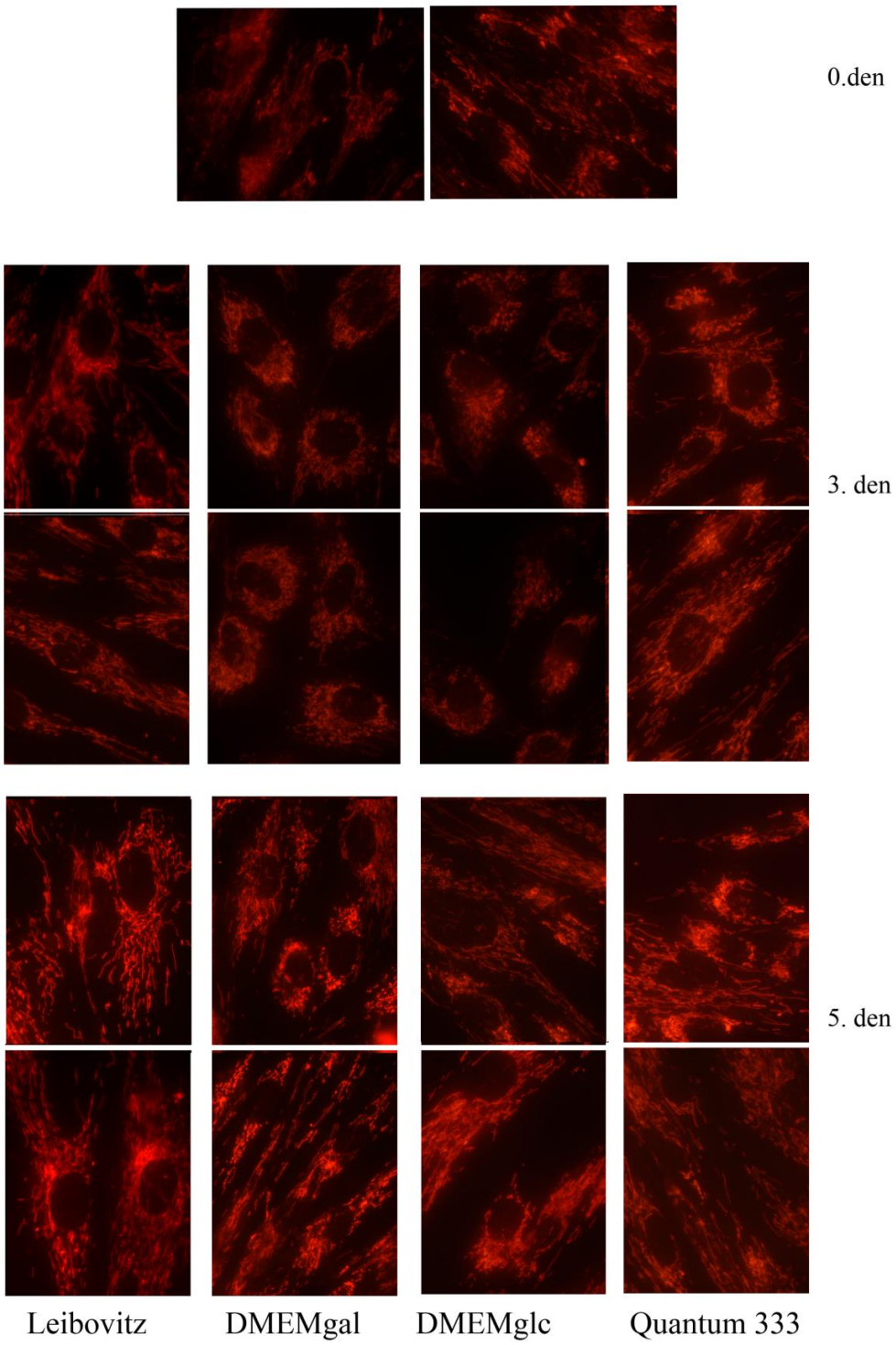
4.3 Analýza mitochondriální sítě ve 2 liniích primárních kožních fibroblastů s deficitem F_1F_O-ATPsyntázy ve 4 vybraných kultivačních médiích

V experimentech byla sledována mitochondriální síť primárních kožních fibroblastů, které byly po kultivaci v médiu Quantum 333 a následném 6 h hladovění přemístěny do 4 vybraných médiích: DMEM obsahující 5 mM glukózu, DMEM obsahující 5 mM galaktózu, Leibovitz obsahující 5 mM galaktózu a „Quantum 333 for fibroblasts“ obsahující 18,8 mM glukózu. Všechna média obsahovala 2 mM L-glutamin. Kompletní složení jednotlivých médií je uvedeno v tabulce 3.3. Mitochondriální síť kultivovaných buněk byla barvena flourescenční sondou MitoTracker Red. Buňky byly následně pozorovány flourescenčním mikroskopem (Nikon Diaphot 200) pod UV světlem za použití filtru UV-2A 330-380 při zvětšení 600x a obraz byl snímán CCD kamerou DP50 (Olympus). Viz kapitola 3.2.1. Práce s tkáňovými kulturami.

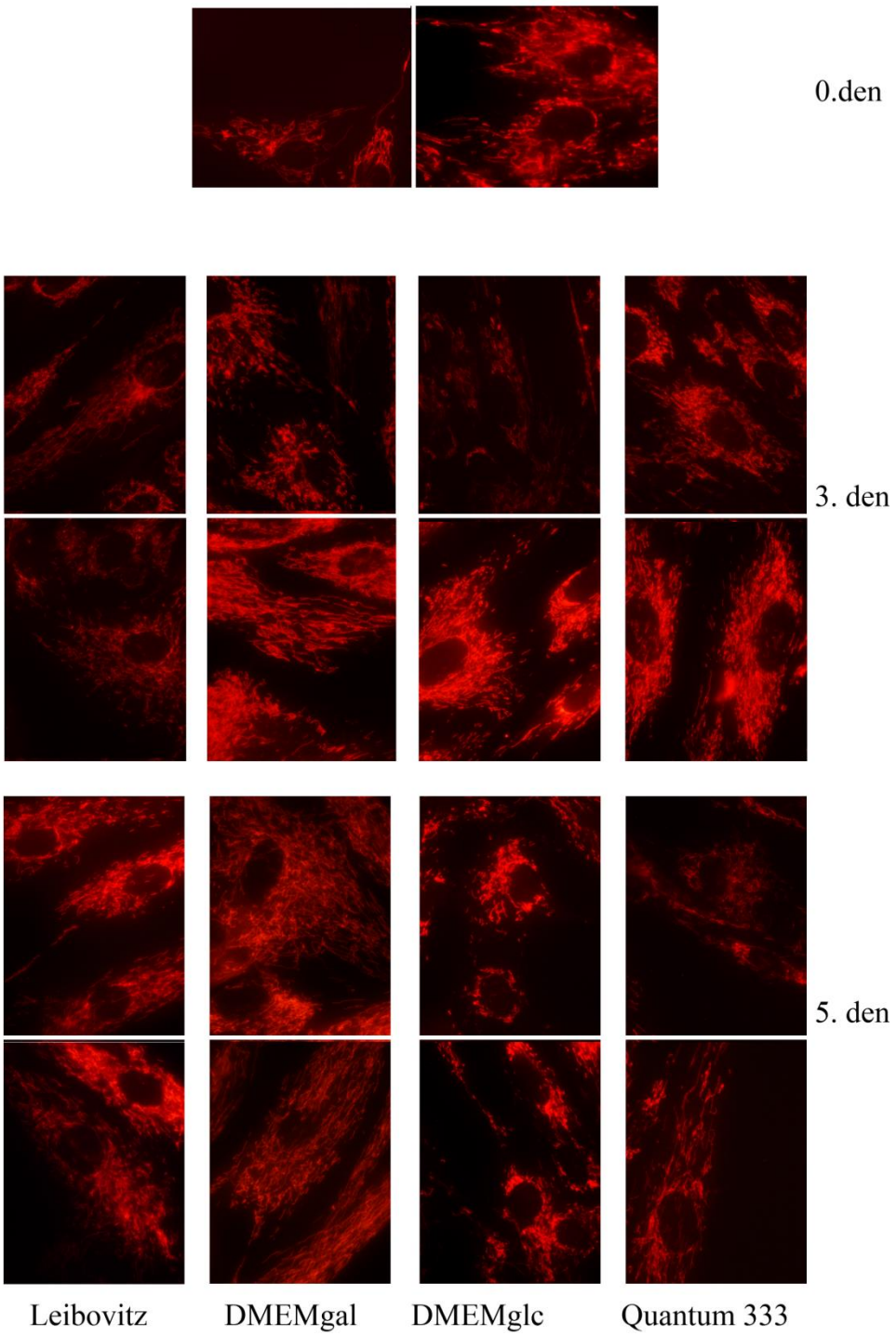
V každém měření bylo snímáno nejméně 15 obrazů, z nichž dvě reprezentativní ukázky jsou uvedeny na obrázcích 4.12-4.14.



Obrázek 4.12: ***Mitochondriální síť kontrolních primárních kožních fibroblastů po krátkodobé kultivaci ve čtyřech vybraných médiích.*** *Mitochondriální síť byla barvena florescenční sondou MitoTracker Red. Vybraná kultivační média byla: DMEM obsahujícím 5 mM glukózu (značeno DMEMglc) DMEM obsahjící 5 mM glaktózu (značeno DMEMgal), Leibovitz (značeno Leibovitz) a „Quantum 333 for fibroblasts"(značeno: Quantum 333). Jako 0. den jsou značeny buňky před kultivací ve zvolených médiích, tedy po dlouhodobé kultivaci v médiu Quantum 333.*



*Obrázek 4.13: **Mitochondriální síť primárních kožních fibroblastů od pacienta s mutací v MTATP6 po krátkodobé kultivaci ve čtyřech vybraných médiích.** Mitochondriální síť byla barvena florescenční sondou MitoTracker Red. Vybraná kultivační média byla: DMEM obsahujícím 5 mM glukózu (značeno DMEMglc) DMEM obsahjící 5 mM glaktózu (značeno DMEMgal), Leibovitz (značeno Leibovitz) a „Quantum 333 for fibroblasts"(značeno: Quantum 333). Jako 0. den jsou značeny buňky před kultivací ve zvolených médiích, tedy po dlouhodobé kultivaci v médiu Quantum 333.*



Obrázek 4.14: ***Mitochondriální síť primárních kožních fibroblastů od pacienta s mutací v TMEM70 po krátkodobé kultivaci ve čtyřech vybraných médiích.*** *Mitochondriální síť byla barvena florescenční sondou MitoTracker Red. Vybraná kultivační média byla: DMEM obsahujícím 5 mM glukózu (značeno DMEMglc) DMEM obsahjící 5 mM glaktózu (značeno DMEMgal), Leibovitz (značeno Leibovitz) a „Quantum 333 for fibroblasts"(značeno: Quantum 333). Jako 0. den jsou značeny buňky před kultivací ve zvolených médiích, tedy po dlouhodobé kultivaci v médiu Quantum 333.*

U kontrolní linie nebyly patrné žádné významné rozdíly v tvaru množství či umístění mitochondrií v buňce ve vybraných kultivačních médiích (viz obrázek 4.12).

U linie s mutací v *MTATP6* bylo pozorováno po 3 dnech kultivace v médiu DMEM obsahujícím glukózu nebo galaktózu zvýšené množství buněk s mitochondriální sítí zhuštěnou v okolí jádra. Po 5 denní kultivaci v tomto médiu bylo pozorované množství takovýchto buněk výrazně menší (viz obrázek 4.13).

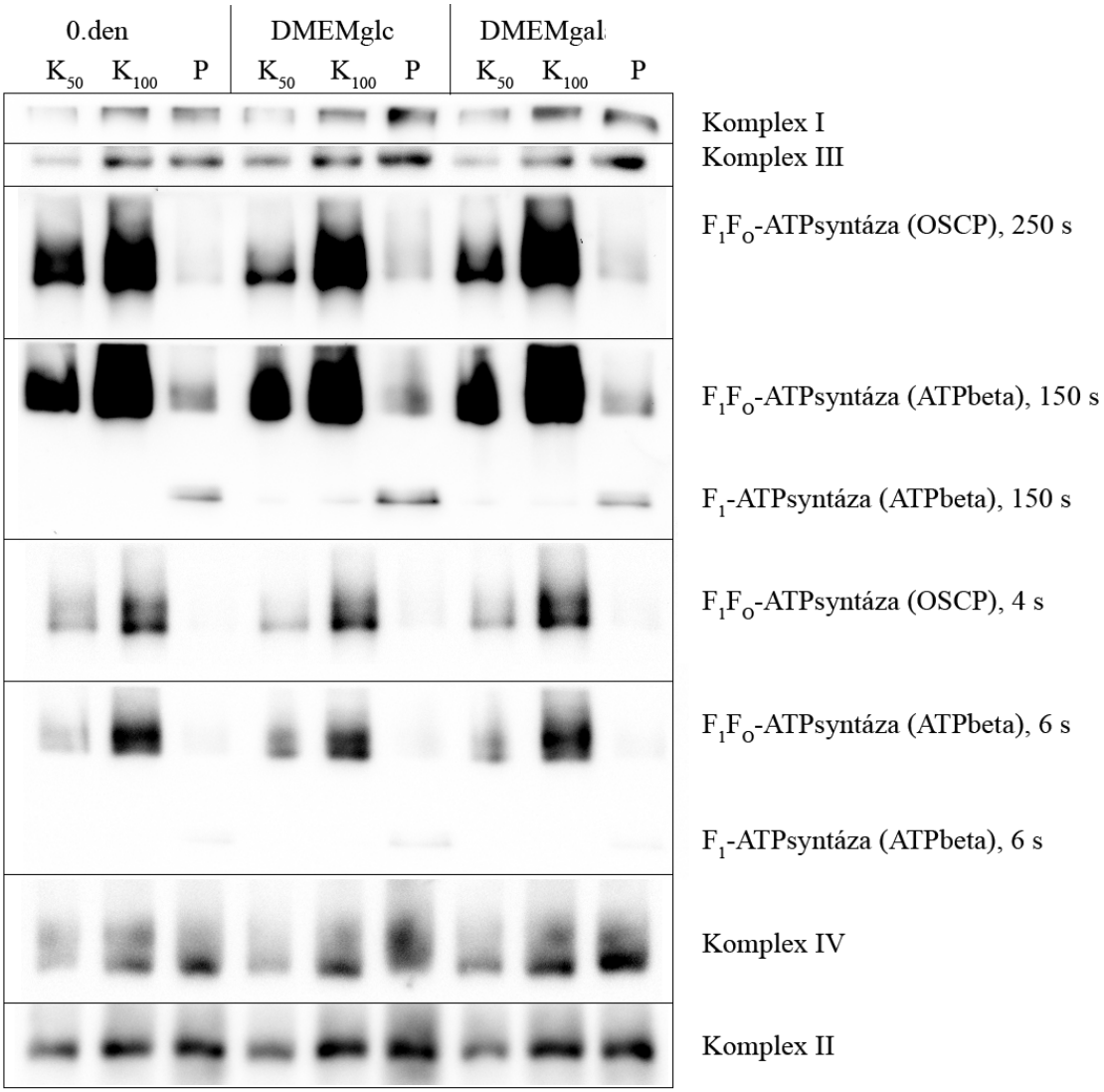
U kontrolní linie a linie s mutací v genu *TMEM70* bylo pozorováno ve všech médiích rozmístění mitochondriální sítě po celém obsahu buňky. U linie s mutací v genu *TMEM70* bylo pozorováno po 5 dnech kultivace zvýšené množství mitochondrií v obou médiích obsahujících jako zdroj sacharidů galaktózu oproti médiím obsahujících jako zdroj sacharidů glukózu (viz obrázek 4.14).

4.4 Stanovení rovnovážného množství komplexů oxidační fosforylace v linii kožních fibroblastů s izolovaným deficitem F_1F_O-ATPsyntázy způsobeným mutací v *TMEM70* po 5 dnech kultivace ve 4 vybraných médiích

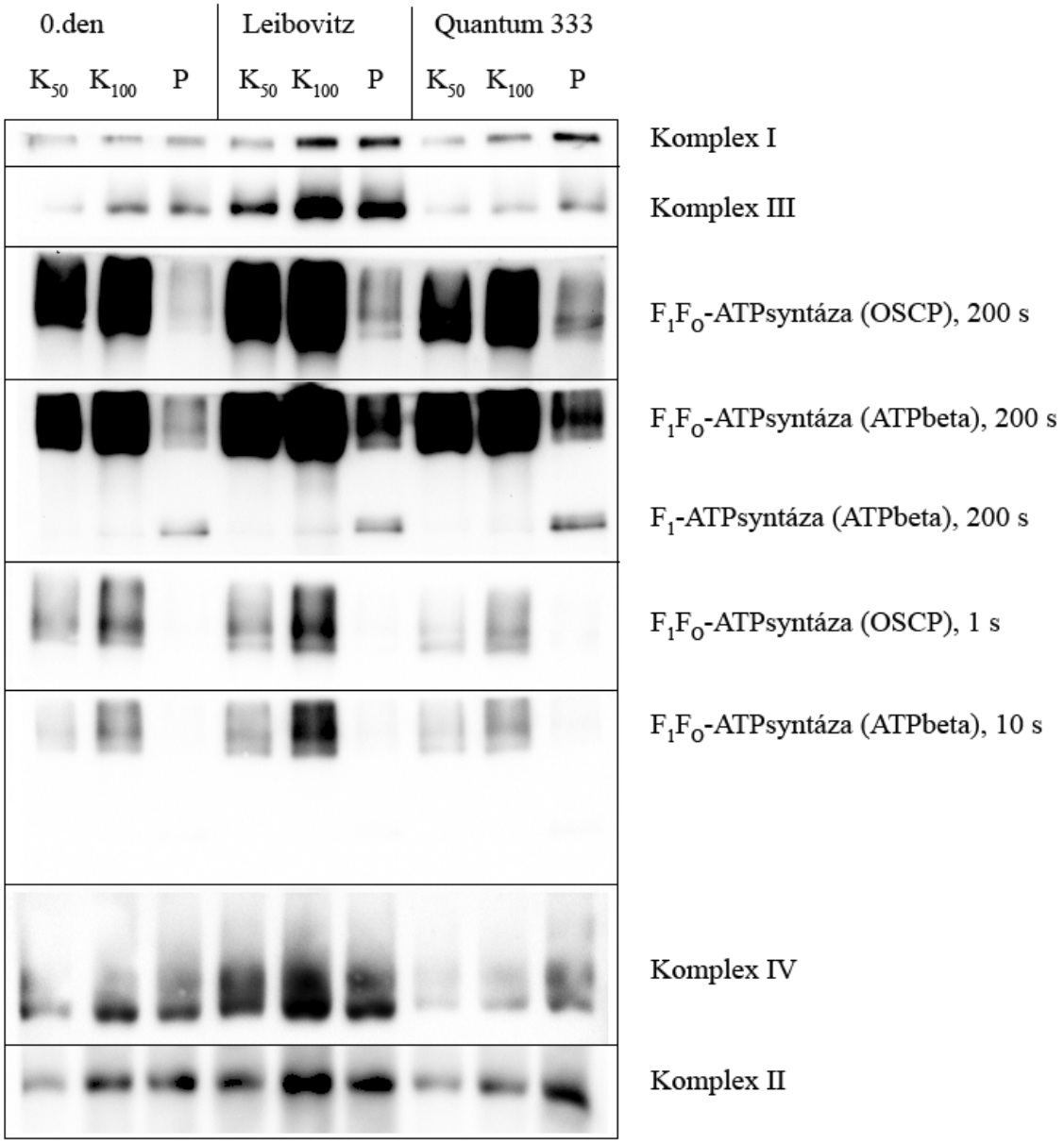
V dalších experimentech bylo stanovováno množství složených komplexů oxidační fosforylace v kontrolní linii a linii s mutací v genu *TMEM70*. Primární kožní fibroblasty byly pomocí dlouhodobé kultivace v médiu Quantum 333 „namnoženy“ do požadovaného množství (viz kapitola 3.2.2.2) část buněk byla izolována (značeno jako 0. den) a zbylé buňky byly po 6 h hladovění přemístěny do média určeného ke krátkodobé kultivaci: DMEM obsahující 5 mM glukózu, nebo galaktózu. Následně byly izolovány po 5. dnech kultivace v těchto médiích. V další části experimentu byly buňky obdobně „namnoženy“ v médiu Quantum 333, část buněk byla izolována (značeno jako 0.den) a zbylé buňky byly po 6 h hladovění přemístěny do média určeného ke krátkodobé kultivaci: „Quantum 333 for fibroblasts“ a Leibovitz.

30 μg buněčného lyzátu primárních kožních fibroblastů bylo separováno pomocí modré nativní elektroforézy („BN-PAGE“), komplexy oxidační fosforylace byly detekovány pomocí „Western blotu“ s následnou imunodetekcí. (viz obrázcích 4.14 a 4.15). Jako 0. den na obou sériích blotů byl použit jiný buněčný lyzát připravený z buněk před kultivací

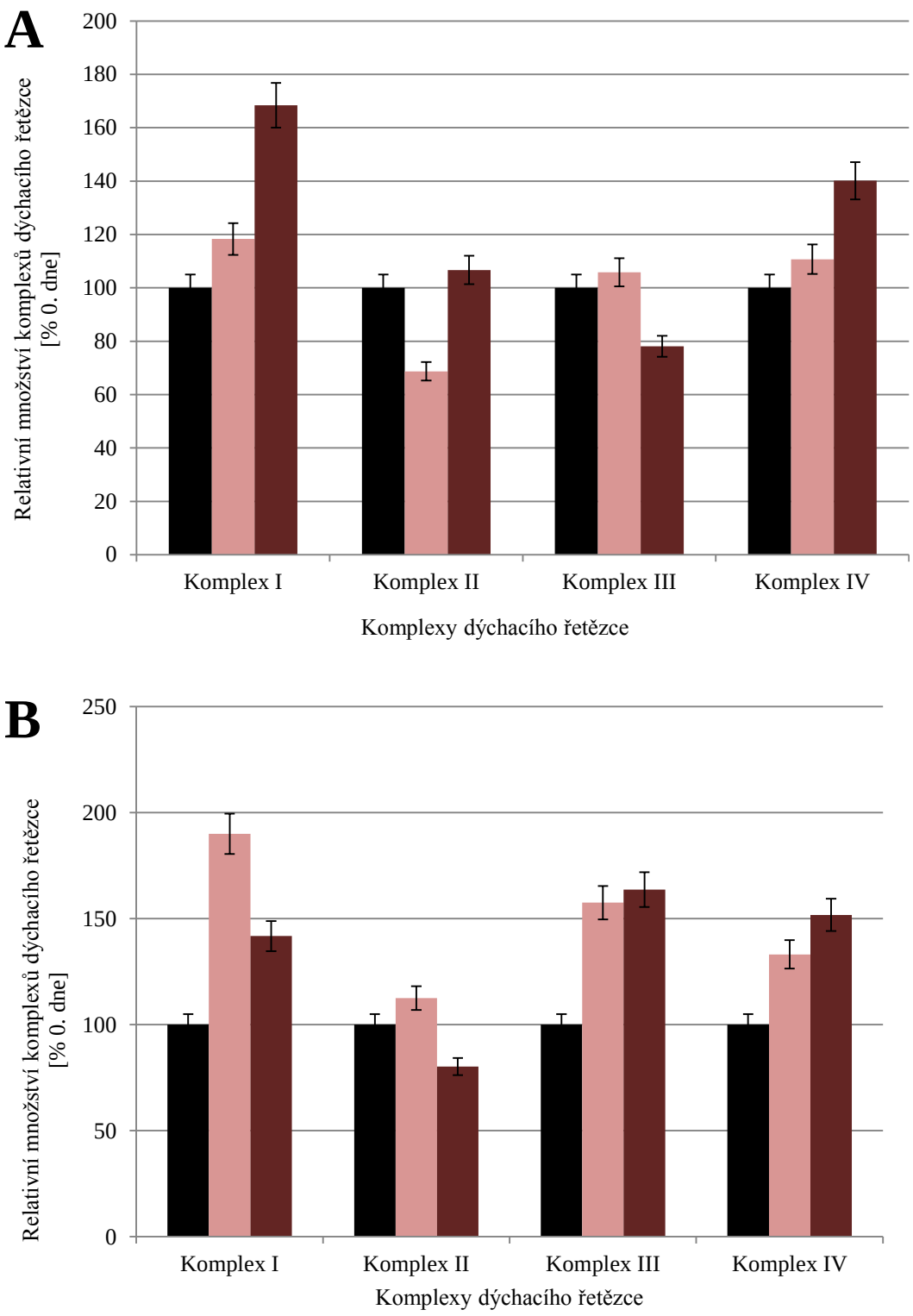
v daných dvou médiích. Pro vyhodnocení intenzity signálu byl použit program Qantity one (Bio-Rad). (graficky znázorněno na obrázku 4.16).



Obrázek 4.14. ***Stanovení množství komplexů dýchacího řetězce pomocí „BN-PAGE“ elektroforézy a “Western blotu“ s následnou imunodetekcí v primárních kožních fibroblastech po 5 dnech kultivace v médiu DMEM obsahujícím 5 mM glukózu (značeno DMEMglc), DMEM obsahující 5 mM galaktózu (značeno DMEMgal).*** *Jako 0.den jsou značeny buňky po dlouhodobé kultivací v médiu Quantum 333, před kultivací ve zvolených médiích. Všechna média obsahovala 2 mM L-glutamin. Kontrolní linie je na obrázcích značena jako K_{50} (15 μg buněčného lyzátu), K_{100} (30 μg buněčného lyzátu) a linie s mutací v genu TMEM70 jako P (30 μg buněčného lyzátu). Obrázky membrány značené protilátkou proti ATPbeta a OSCP jsou detekovány při nízkých expozicích (1-10 s), které umožňují zachytit signál u kontrolní linie, ale signál u linie s mutací v genu TMEM70 je pod hranicí detekce. Dále byly proteiny detekovány při vysokém expozičním čase (150-200 s), který je příliš vysoký na správné zachycení příliš vysokého signálu u kontroly, který je za hranicí detekce, ale umožňuje zachycení slabého signálu u linie s mutací v genu TMEM70.*



Obrázek 4.15. ***Stanovení množství komplexů dýchacího řetězce pomocí „BN-PAGE“ elektroforézy a “Western blotu“ s následnou imunodetekcí v primárních kožních fibroblastech po 5 dnech kultivace v médiu Leibovitz (značeno Leibovitz) a „Quantum 333 for fibroblasts“ (značeno: Quantum 333).*** *Jako 0.den jsou značeny buňky po dlouhodobé kultivací v médiu Quantum 333, před kultivací ve zvolených médiích. Všechna média obsahovala 2 mM L-glutamin. Kontrolní linie je na obrázcích značena jako K_{50} (15 μg buněčného lyzátu,), K_{100} (30 μg buněčného lyzátu) a linie s mutací v genu TMEM70 jako P (30 μg buněčného lyzátu). Obrázky membrány značené protilátkou proti ATPbeta a OSCP jsou detekovány při nízkých expozicích (1-10 s), které umožňují zachytit signál u kontrolní linie, ale signál u linie s mutací v genu TMEM70 je pod hranicí detekce. Dále jsou detekovány při vysokém expozičním čase (150-200 s), který je příliš vysoký na správné zachycení příliš vysokého signálu u kontroly, který je za hranicí detekce, ale umožňuje zachycení slabého signálu u linie s mutací v genu TMEM70.*



Obrázek 4.16: ***Kvantifikace rovnovážných hladin sledovaných komplexů dýchacího řetězce po 5 dnech kultivace ve vybraných médiích u kontrolní linie (A) a linie s mutací v genu TMEM70 (B).*** *Hodnoty jsou uváděny relativně, v procentech signálu proteinů před začátkem kultivace v daných médiích, tzv. 0. den (značeno ■). Vybraná kultivační média byla: DMEM obsahujícím 5 mM glukózu (značeno ■), DMEM obsahující 5 mM galaktózu (značeno ■). Grafy obsahují chybové úsečky denzitometrického vyhodnocení s hodnotou 5%.*

U kontrolní linie bylo pozorováno v médiu DMEM obsahujícím jako zdroj sacharidů galaktózu oproti médiu DMEM obsahující glukózu zvýšené množství komplexů dýchacího řetězce, kromě komplexu III. U linie s mutací v genu *TMEM70* bylo pozorováno v médiu DMEM obsahujícím galaktózu oproti médiu obsahující glukózu snížené množství komplexu I a II a relativně srovnatelné množství komplexů III a IV (viz obrázek 4.16).

Dále bylo pozorováno, že u linie s mutací v genu *TMEM70* dochází k částečnému nárůstu celého složeného komplexu F_1F_O-ATPsyntázy a složené části F_1 ATPsyntázy (která u kontrolní linie nebyla pozorována vůbec) v médiu Leibovitz. Žádné další komplexy obsahující podjednotky ATPbeta nebo OSCP větší než 140 kDa nebyly pozorovány (viz obrázek 4.16).

5 Diskuze

Při studiu mitochondriálních onemocnění jsou často využívány primární kožní fibroblasty od pacientů a standardně jsou tyto buňky kultivovány ve vysoko-glukózových médiích (>15mM glukóza), z důvodu vyšší viability a rychlejšího růstu kultivovaných buněk. Ovšem v důsledku vysoké koncentrace glukózy dochází ke snížení množství komplexů dýchacího řetězce a k syntéze ATP je více využívána glykolýza. [115] Naopak při kultivaci různých typů buněk (např. HeLa buněk, primárních kožních fibroblastů), v médiu DMEM, v němž je glukóza nahrazena galaktózou, dochází k významnému zvýšení spotřeby kyslíku, a tím i množství a aktivity komplexů dýchacího řetězce (kromě komplexu III), z důvodu zvýšení produkce ATP systémem oxidační fosforylace. [116-118]

Kultivace buněk v médiu obsahujícím jako zdroj sacharidů galaktózu se tedy zdá být dobrou metodou za účelem studia poruch oxidační fosforylace, jelikož se některé defekty mohou v těchto kultivačních podmínkách manifestovat odlišným způsobem než ve vysokoglukózových médiích. Dříve byla tato metoda používána i v diagnostice mitochondriálních onemocnění, založené na nízké viabilitě primárních kožních fibroblastů od některých pacientů (např. s deficitem komplexu I a IV dýchacího řetězce či pyruvátdehydrogenázového komplexu) v médiu obsahujícím jako zdroj sacharidů galaktózu. [119] Neschopnost přežití buněčné linie s poruchou komplexu IV dýchacího řetězce, byla pozorována i v této práci (viz obrázek 4.1.).

Cílem práce bylo studium dopadu izolovaného deficitu F_1F_O-ATPsyntázy způsobeného mutacemi v genech *MTATP6* a *TMEM70* na ostatní komplexy dýchacího řetězce a další mitochondriální proteiny. Obdobné studie byly již provedeny u kožních fibroblastů s mutací v genu *TMEM70* kultivovaných ve vysokoglukózových médiích DMEM a „Quantum 333 for fibroblast“. Pozorováno bylo zvýšené množství některých komplexů dýchacího řetězce. Zjištěný kompenzační efekt je na postranskripční úrovni. [99-100] V této práci byl studován dopad mutace v genech *TMEM70* a *MTATP6* na komplexy dýchacího řetězce v kultivačních podmínkách, kdy je buňka nucena více využívat systém oxidační fosforylace - v médiu obsahujícím jako zdroj sacharidů galaktózu.

Pro první pilotní pokus bylo vybráno komečně dostupné médium obsahující jako zdroj sacharidů galaktózu: Leibovitz neobsahující L-glutamin. Protože bylo pozorováno, že právě aminokyselina L-glutamin je pro kožní fibroblasty významným zdrojem energie

zejména v prostředí, kde je zdrojem sacharidů galaktóza [48], byl pokus proveden s ním i bez něj.

Nejprve byl charakterizován růst buněk pomocí růstové křivky primárních kožních fibroblastů s mutací c.317-2A>G v genu *TMEM70* (linie *TMEM70*) a s mutací m.8851T>C v genu *MTATP6* (linie *MTATP6*) v prvních dnech kultivace v takovémto médiu. Ze získaných výsledků vyplývá, že rozdíl ve schopnosti růstu v médiu Leibovitz s L-glutaminem a bez L-glutaminu u kontrolní linie primárních kožních fibroblastů patrný nebyl. Buněčná kultura nevykazovala problém s životaschopností a růstem. Zatímco u buněčných linií s izolovaným deficitem F_1F_O-ATPsyntázy byla pozorována snížená schopnost růstu. U linie *MTATP6* bylo pozorováno zastavení růstu této linie okolo 4. a 5. dne kultivace a u linie *TMEM70* nebyla pozorována výrazná schopnost růstu vůbec. (viz obrázky 4.1-4.2). Linie *TMEM70* vykazovala i sníženou životaschopnost kultury v těchto podmínkách. K výraznému poklesu množství buněk v kultuře (nejméně o 40%) dochází v médiu neobsahujícím L-glutamin již 4. den, zatímco v médiu obsahujícím L-glutamin až 6. den (viz obrázek 4.2). Navíc bylo u těchto linií s izolovaným deficitem F_1F_O-ATPsyntázy pozorováno vyšší zastoupení mrtvých buněk v kultuře pěstované v médiu bez glutaminu, než v kultuře pěstované s L-glutaminem (neuváděná data). Médium obsahující L-glutamin je tedy vhodnějším médiem pro kultivaci těchto buněk. Je nutné mít na paměti, že médium obshující jako zdroj sacharidů galaktózu není vhodné pro dlouhodobou kultivaci linie *MTATP6* a linie *TMEM70*, protože nejsou schopny dlouhodobého přežití a růstu v těchto podmínkách a navíc by u linie *MTATP6* mohlo docházet k selekci buněk s vyšším zastoupením nemutované („wild type“) mtDNA. [108] Podobně bylo i u dalších buněčných linií s izolovaným deficitem F_1F_O-ATPsyntázy způsobeným mutacemi v genech *MTATP6* a *TMEM70* pozorováno, při dlouhodobé kultivaci v médiu obsahujícím jako zdroj sacharidů galaktózu, snížení životaschopnosti a růstu buněk [96, 99]. Nižší schopnost přežití a růstu v těchto podmínkách linie *TMEM70* než linie *MTATP6* je zřejmě způsobena nižším množství funkční F_1F_O-ATPsyntázy než u linie *MTATP6*, což činí tuto mutaci závažnější.

Dále bylo sledováno množství vybraných podjednotek komplexů dýchacího řetězce, fumarázy (jako ukazatele množství enzymů citrátového cyklu) a porinu (jako ukazatele množství mitochondrií) po 3 a 5 dnech kultivace v těchto kultivačních podmínkách. U všech linií byl skutečně pozorován nárůst množství vybraných podjednotek komplexů

dýchacího řetězce a buňky ke svému energetickému metabolismu využívají systém oxidační fosforylace více.

U kontrolní linie primárních kožních fibroblastů v médiu Leibovitz s L-glutaminem bylo třetí den pozorováno zvýšení množství těchto proteinů, ovšem 5. den se nárůst částečně snižuje (kromě podjednotky komplexu III dýchacího řetězce, jejíž množství se ještě zvyšuje, viz obrázek 4.5). Předpokládáme, že v prvních dnech kultivace dochází ke vzniku silného signálu způsobujícího nárůst množství podjednotek komplexů dýchacího řetězce, který se s další kultivací snižuje a dochází k ustálení metabolismu buněk s nižším množstvím komplexů dýchacího řetězce, než v prvních dnech. U linie *MTATP6* byl obdobně jako u kontroly pozorován 3. den nárůst jednotlivých proteinů a k dalšímu zvyšování dochází pouze u podjednotek komplexu I a III dýchacího řetězce, množství ostatních proteinů bylo buď srovnatelné s množstvím pozorovaným 3. den nebo se snižovalo. Nárůsty množství proteinu byly obecně u linie *MTATP6* nižší než u linie *TMEM70* a kontroly (viz obrázek 4.5). U linie *TMEM70* byl pozorován nárůst vybraných proteinů 3. den a tento nárůst byl 5. den ještě vyšší u většiny proteinů, kromě podjednotky komplexu II dýchacího řetězce a fumarázy (viz obrázek 4.5).

V médiu Leibovitz pravděpodobně dochází u linie *TMEM70* ke vzniku silnějšího signálu, v porovnání s linií *MTATP6* a kontrolou. Tento signál spolu s dobou kultivace může vést k nárůstu komplexů oxidační fosforylace, což by mohlo souviset s nižší viabilitou a schopností růstu této linie. Zvýšení množství podjednotek komplexů dýchacího řetězce může být u linie *TMEM70* částečně způsobeno i použitou metodou. Při změně média určeného k dlouhodobé kultivaci za médium určené ke krátkodobé kultivaci (Leibovitz) byly buňky nechány 6 h hladovět v médiu neobsahujícím žádný sacharid, L-glutamin ani sérum. Hladovění u linie *TMEM70* způsobuje částečný nárůst podjednotek komplexů dýchacího řetězce (viz obrázek 4.15).

Navíc byl u linie *TMEM70*, nesoucí poruchu biogeneze komplexu F_1F_O-ATPsyntázy v důsledku ztráty proteinu Tmem70, jehož funkce není doposud známa, pozorován nárůst podjednotek F_1F_O-ATPsyntázy s dobou kultivace, jejichž množství bylo 0. den touto metodou nedetekovatelné (viz obrázky 4.3 a 4.4). Pomocí modré nativní elektroférézy bylo zjištěno, že dochází k částečnému nárůstu i celého složeného komplexu F_1F_O-ATPsyntázy a složené části F_1 ATPsyntázy (která u kontrolní linie nebyla pozorována vůbec). Žádné další komplexy obsahující podjednotky ATPbeta nebo OSCP větší než 140 kDa nebyly

pozorovány (viz obrázek 4.13). Zdá se tedy, že k biogenezi nízkého množství plně sestaveného komplexu F_1F_O-ATPsyntázy může docházet i bez přítomnosti proteinu Tmem70, a že Tmem70 nehraje roli v tvorbě části F_1 ATPsyntázy, jelikož k jejímu sestavení dochází i v buňkách, které Tmem70 neobsahují. Složená postranní stopka ATPsyntázy obsahující protein OSCP nebyla pozorována, což ale nemusí znamenat, že k její tvorbě nedochází, může být pouze degradována mitochondriálním systémem proteáz. [99]

Dále byl porovnáván rozdíl v množství vybraných podjednotek komplexů dýchacího řetězce, fumarázy (jako ukazatele množství enzymů citrátového cyklu), porinu (jako ukazatele množství mitochondrií) a podjednotek komplexu pyruvátdehydrogenázy po kultivaci buněčných linií ve dvou médiích lišících se pouze zdrojem sacharidu: v médiu DMEM obsahujícím jako zdroj sacharidů 5 mM glukózu, nebo 5 mM galaktózu. Pozorovaná množství proteinů byla dále srovnávána s kultivací v médiu Leibovitz, které obsahuje jako zdroj sacharidů 5 mM galaktózu. Všechna média obsahovala stejné množství aminokyseliny L-glutamin (2 mM).

U kontrolní linie primárních kožních fibroblastů kultivovaných v médiu DMEM obsahujícím galaktózu oproti kultivaci v médiu DMEM obsahujícím glukózu byl pozorovaný stejný rozdíl při námi použité krátkodobé kultivaci jako u dlouhodobé kultivace [117] až po 5 dnech kultivace (viz obrázek 4.8). K ustálení metabolismu buňky dochází tedy zřejmě až 5. den kultivace, kdy bylo pozorováno zvýšené množství vybraných podjednotek i celých komplexů dýchacího řetězce včetně F_1F_O-ATPsyntázy, kromě celého komplexu III a jeho studované podjednotky. Proč nedochází také ke zvyšování komplexu III dýchacího řetězce, souvisí pravděpodobně s tvorbou superkomplexů dýchacího řetězce. [6] Dále jsme po 5 dnech kultivace stanovili zvýšené množství porinu, ale ne podjednotky PDHE1alfa pyruvátdehydrogenázového komplexu, podobně jako bylo stanoveno u dlouhodobé kultivace. [117] Nicméně množství podjednotky E2 pyruvátdehydrogenázového komplexu bylo detekováno zvýšené. Také bylo nalezeno zvýšené množství fumarázy, jako ukazatele množství proteinů citrátového cyklu, přestože u dlouhodobé kultivace nebylo pozorováno zvýšené množství citrátsyntázy [117]. To může být způsobeno zvýšeným množstvím cytosolární fumarázy účastnící se metabolismu aminokyselin. Vzhledem k tomuto faktu a vzhledem k tomu, že fumaráza

není regulačním enzymem citrátového cyklu, zřejmě není fumaráza vhodným ukazatelem obecného množství enzymů citrátového cyklu v buňce.

U obou linií s izolovaným deficitem F_1F_O-ATPsyntázy nebylo pozorováno zvýšené množství podjednotek komplexu I a II v médiu obsahujícím místo glukózy galaktózu, jako u kontroly (viz obrázky 4.9 a 4.10). To může být způsobeno tím, že 5 mM množství glukózy není pro tyto buňky dostačující a i v těchto kultivačních podmínkách jsou nuceny využívat systém oxidační fosforylace v podobné míře jako v prostředí 5 mM galaktózy. Ale bylo pozorováno zvýšené množství podjednotky komplexu IV dýchacího řetězce a obou měřených podjednotek (E2 a PDHE1alfa) pyruvátdehydrogenázového komplexu. U všech linií dále bylo pozorováno zvýšené množství porinu, což zřejmě naznačuje zvýšené množství mitochondrií.

U kontrolní linie bylo zjištěno množství podjednotek komplexů dýchacího řetězce po pěti dnech kultivace ve dvou vybraných médiích obsahujících jako zdroj sacharidů 5 mM galaktózu: DMEM a Leibovitz, vyšší v médiu DMEM, kromě podjednotky komplexu III dýchacího řetězce (viz obrázek 4.8). Zvýšené množství podjednotky komplexu III dýchacího řetězce pouze v médiu Leibovitz naznačuje odlišnou tvorbou superkomplexů dýchacího řetězce v těchto médiích. V médiu DMEM zřejmě dochází ke zvýšené tvorbě respirazómu obsahujícího komplex I a III dýchacího řetězce, ale dochází ke snížení množství volného komplexu III. Zatímco v médiu Leibovitz dochází ke zvýšení respirazómu obsahující komplex I a III i volného komplexu III dýchacího řetězce. [6] U linií s izolovaným deficitem F_1F_O-ATPsyntázy bylo množství většiny podjednotek komplexů dýchacího řetězce vyšší v médiu Leibovitz, než v médiu DMEM (viz obrázky 4.9 a 4.10). Množství podjednotek pyruvátdehydrogenázového komplexu bylo u všech linií vyšší v médiu DMEM, kromě podjednotky PDHE1alfa u linie s mutací v *TMEM70*.

Na pozorovaný rozdíl v množství proteinů u buněčných linií po kultivaci za zvolených podmínek by mohlo mít vliv zejména množství aminokyselin v médiu, kdy médium Leibovitz obsahuje větší množství většiny aminokyselin. Předpokládáme, že metabolismus aminokyselin je v těchto kultivačních podmínkách významným zdrojem energie pro buňku. Navíc médium Leibovitz obsahuje, na rozdíl od média DMEM, pyruvát, který by jakožto důležitý intermediát energetického metabolismu také mohl mít vliv na rozdílné chování metabolismu buněk v těchto médiích.

Vzhledem k pozorovanému odlišnému chováním kontrolní linie buněk a linií s izolovaným deficitem F_1F_O-ATPsyntázy ve dvou vybraných kultivačních médiích obsahujících jako zdroj sacharidů galaktózu dostaneme odlišné výsledky dopadu izolovaného deficitu F_1F_O-ATPsyntázy na ostatní komplexy dýchacího řetězce v médiu obsahujícím jako zdroj sacharidů galaktózu v závislosti na použitém kultivačním médiu. U obou linií s izolovaným deficitem F_1F_O-ATPsyntázy bylo v médiu Leibovitz vyšší množství podjednotek komplexů dýchacího řetězce, než u kontroly, a naopak v médiu DMEM nižší (kromě podjednotky komplexu III dýchacího řetězce, viz obrázek 4.11.)

V průběhu vypracovávání diplomové práce byla také sledována struktura mitochondriální sítě v jednotlivých buněčných liniích pomocí vitálního barvení buněk a fluorescenční mikroskopie. U linie *MTATP6* bylo pozorováno po 3 dnech kultivace v médiu DMEM obsahujícím glukózu nebo galaktózu zvýšené množství buněk s mitochondriální sítí zhuštěnou v okolí jádra, naznačující energetické strádání buňky v médiu DMEM vedoucí k zmnožení mitochondrií v okolí energeticky nejnáročnějšího kompartmentu buňky - jádra. Po 5 dnech kultivace v tomto médiu se množství takovýchto buněk výrazně snižuje. U linie *TMEM70* takovéto chování pozorováno nebylo, mitochondriální síť byla ve všech médiích rozmístěna po celém obsahu buňky (stejně jako u kontroly, viz obrázky 4.12-1.14). Nicméně v médiích obsahujících jako zdroj sacharidů galaktózu u linie *TMEM70* byly pozorovány změny tvaru buňky a zvýšení hustoty mitochondriální sítě rozmístěné po celém obsahu buňky. Mitochondriální síť buněk se morfologicky podobá mitochondriální síti buněk v replikační senescenci (viz obrázek 4.13). [102] Replikační senescence byla zřejmě způsobena subletálním oxidačním stresem buněk linie *TMEM70* v médiích obsahujících jako zdroj sacharidů galaktózu. [120] U linie *MTATP6* pravděpodobně nedocházelo ke vzniku oxidačního stresu v takovéto míře, aby způsoboval replikační senescenci buněk.

Zvýšená množství proteinů komplexů dýchacího řetězce či pyruvátdehydrogenázového komplexu, případně celých komplexů, nemusí nutně znamenat vyšší množství enzymově aktivních komplexů. Analýza aktivity těchto komplexů, pomocí funkčních studií, prováděna nebyla. Aktivita komplexů dýchacího řetězce je mimo jiné ovlivněna i glykosylací proteinů dýchacího řetězce. V případě pyruvátdehydrogenázového komplexu je jeho aktivita regulována fosforylací. Dalším pokračováním této studie tedy je stanovení aktivit komplexů dýchacího řetězce, pyruvátdehydrogenázového komplexu či citrátsyntázy

(jakožto regulačního enzymu citrátového cyklu), případně analýza posttranslačních modifikacích studovaných enzymů.

Data nalezená v průběhu vypracování diplomové práce nelze zatím zevšeobecnit na všechny linie s mutací v *MTATP6* nebo *TMEM70*, jelikož všechna měření byla prováděna pouze na jedné linii primárních kožních fibroblastů s danou mutací. Chování buněčných linií kožních fibroblastů se stejnou patogenní mutací v různých kultivačních podmínkách může být do jisté míry ovlivněno různým genetickým pozadím konkrétní buněčné linie. [99] Proto by bylo vhodné získaná data potvrdit i v dalších liniích primárních kožních fibroblastů se zde studovanými mutacemi v genech *TMEM70* a *MTATP6*.

6 Souhrn

V diplomové práci byl ve dvou liniích primárních kožních fibroblastů s izolovaným deficitem F_1F_O-ATPsyntázy (mutace v genech *MTATP6* a *TMEM70*) studován dopad tohoto deficitu na systém oxidační fosforylace, vybrané mitochondriální proteiny a mitochondriální síť ve srovnání s kontrolní linií primárních kožních fibroblastů v prvních dnech kultivace v médiu obsahujícím jako zdroj sacharidů galaktózu nebo glukózu.

Získané výsledky lze shrnout následovně:

- Kontrolní linie primárních kožních fibroblastů nevykazovala problém s růstem v médiu Leibovitz, které obsahuje jako zdroj sacharidů 5 mM galaktózu. U linií s izolovaným deficitem F_1F_O-ATPsyntázy byla pozorována snížená schopnost růstu. Schopnost růstu těchto linií byla v médiu obsahujícím L-glutamin větší, než v médiu bez L-glutaminu.

- U kontrolní linie bylo detekováno v médiu DMEM obsahujícím jako zdroj sacharidů galaktózu vyšší množství komplexů dýchacího řetězce včetně F_1F_O-ATPsyntázy, kromě komplexu III, než v médiu DMEM obsahujícím jako zdroj sacharidů glukózu. U linií s izolovaným deficitem F_1F_O-ATPsyntázy bylo pozorováno vyšší množství pouze komplexu IV dýchacího řetězce.

- V kultivačním médiu Leibovitz dochází pravděpodobně u linie s mutací v genu *MTATP6* ke vzniku slabšího signálu vedoucího pouze k mírnému zvýšení tvorby komplexů dýchacího řetězce, než u linie s mutací v genu *TMEM70*.

- Zjištěno bylo, že dopad izolovaného deficitu F_1F_O-ATPsyntázy na množství ostatních komplexů dýchacího řetězce v médiu obsahujícím jako zdroj sacharidů galaktózu je odlišný v závislosti na použitém kultivačním médiu. U obou linií s izolovaným deficitem F_1F_O-ATPsyntázy bylo v médiu Leibovitz vyšší množství podjednotek komplexů dýchacího řetězce, než u kontroly, a naopak v médiu DMEM nižší (kromě podjednotky komplexu III dýchacího řetězce).

- Analýza mitochondriálních sítí ukázala, že u linie s mutací v genu *MTATP6* po 3 dnech kultivace v médiu DMEM obsahujícím glukózu nebo galaktózu v důsledku energetického strádání buňky zvýšené množství buněk s mitochondriální sítí

zhuštěnou v okolí energeticky nejnáročnějšího kompartmentu buňky-jádra. U linie s mutací v genu *TMEM70* bylo pozorováno po 5 dnech kultivace v médiích obsahujících jako zdroj sacharidů galaktózu zvýšené množství mitochondrií morfologicky podobných mitochondriální síti buněk v replikační senescenci.

- U linie s mutací v genu *TMEM70* byl pozorován v médiu Leibovitz částečný nárůst celého složeného komplexu F_1F_O-ATPsyntázy a složené části F1 ATPsyntázy.

Seznam použité literatury

1. Bellance N., Lestienne P.Rossignol R., Mitochondria: from bioenergetics to the metabolic regulation of carcinogenesis, Front Biosci (Landmark Ed), 14: s. 4015-34 (2009).
2. Wallace D.C., A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine, Annu Rev Genet, 39: s. 359-407 (2005).
3. Lenaz G.Genova M.L., Structural and functional organization of the mitochondrial respiratory chain: a dynamic super-assembly, Int J Biochem Cell Biol, 41(10): s. 1750-1772 (2009).
4. Lehninger A.L.N., D.; Cox, M. M., Lehninger Principles of Biochemistry, 3 vydání: W. H. Freeman & Co (2000).
5. Schagger H., Pfeiffer K., The ratio of oxidative phosphorylation complexes I-V in bovine heart mitochondria and the composition of respiratory chain supercomplexes, J Biol Chem, 276(41): s. 37861-7 (2001).
6. 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., Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain, Science, 340(6140): s. 1567-70 (2013).
7. Okuno D., Iino R.Noji H., Rotation and structure of FoF1-ATP synthase, J Biochem, 149(6): s. 655-64 (2011).
8. Watt I.N., Montgomery M.G., Runswick M.J., Leslie A.G.Walker J.E., Bioenergetic cost of making an adenosine triphosphate molecule in animal mitochondria, Proc Natl Acad Sci U S A, 107(39): s. 16823-7 (2010).
9. Jonckheere A.I., Smeitink J.A.Rodenburg R.J., Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology, J Inherit Metab Dis, 35(2): s. 211-25 (2012).
10. Vives-Bauza C., Magrane J., Andreu A.L.Manfredi G., Novel role of ATPase subunit C targeting peptides beyond mitochondrial protein import, Mol Biol Cell, 21(1): s. 131-9 (2010).
11. Kucharczyk R., Zick M., Bietenhader M., Rak M., Couplan E., Blondel M., Caubet S.D.di Rago J.P., Mitochondrial ATP synthase disorders: molecular mechanisms and the quest for curative therapeutic approaches, Biochim Biophys Acta, 1793(1): s. 186-99 (2009).
12. Cabezon E., Butler P.J., Runswick M.J.Walker J.E., Modulation of the oligomerization state of the bovine F1-ATPase inhibitor protein, IF1, by pH, J Biol Chem, 275(33): s. 25460-4 (2000).
13. Van Heeke G., Deforce L., Schnizer R.A., Shaw R., Couton J.M., Shaw G., Song P.S.Schuster S.M., Recombinant bovine heart mitochondrial F1-ATPase inhibitor protein: overproduction in Escherichia coli, purification, and structural studies, Biochemistry, 32(38): s. 10140-9 (1993).
14. Sanchez-Cenizo L., Formentini L., Aldea M., Ortega A.D., Garcia-Huerta P., Sanchez-Arago M.Cuezva J.M., Up-regulation of the ATPase inhibitory factor 1 (IF1) of the mitochondrial H+-ATP synthase in human tumors mediates the metabolic shift of cancer cells to a Warburg phenotype, J Biol Chem, 285(33): s. 25308-13 (2010).

15. Wittig I., Meyer B., Heide H., Steger M., Bleier L., Wumaier Z., Karas M.Schagger H., Assembly and oligomerization of human ATP synthase lacking mitochondrial subunits a and A6L, Biochim Biophys Acta, 1797(6-7): s. 1004-11 (2010).
16. Belogrudov G.I., Recent advances in structure-functional studies of mitochondrial factor B, J Bioenerg Biomembr, 41(2): s. 137-43 (2009).
17. Meyer B., Wittig I., Trifilieff E., Karas M.Schagger H., Identification of two proteins associated with mammalian ATP synthase, Mol Cell Proteomics, 6(10): s. 1690-9 (2007).
18. Neupert W.Herrmann J.M., Translocation of proteins into mitochondria, Annu Rev Biochem, 76: s. 723-49 (2007).
19. Hinton A., Gatti D.L.Ackerman S.H., The molecular chaperone, Atp12p, from Homo sapiens. In vitro studies with purified wild type and mutant (E240K) proteins, J Biol Chem, 279(10): s. 9016-22 (2004).
20. Ackerman S.H., Atp11p and Atp12p are chaperones for F(1)-ATPase biogenesis in mitochondria, Biochim Biophys Acta, 1555(1-3): s. 101-5 (2002).
21. Ludlam A., Brunzelle J., Pribyl T., Xu X., Gatti D.L.Ackerman S.H., Chaperones of F1-ATPase, J Biol Chem, 284(25): s. 17138-46 (2009).
22. Cizkova A., Stranecky V., Mayr J.A., Tesarova M., Havlickova V., Paul J., Ivanek R., Kuss A.W., Hansikova H., Kaplanova V., Vrbacky M., Hartmannova H., Noskova L., Honzik T., Drahota Z., Magner M., Hejzlarova K., Sperl W., Zeman J., Houstek J.Kmoch S., TMEM70 mutations cause isolated ATP synthase deficiency and neonatal mitochondrial encephalocardiomyopathy, Nat Genet, 40(11): s. 1288-90 (2008).
23. Schagger H.Pfeiffer K., Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria, EMBO J, 19(8): s. 1777-83 (2000).
24. Wittig I.Schagger H., Advantages and limitations of clear-native PAGE, Proteomics, 5(17): s. 4338-46 (2005).
25. Bisetto E., Picotti P., Giorgio V., Alverdi V., Mavelli I.Lippe G., Functional and stoichiometric analysis of subunit e in bovine heart mitochondrial F(0)F(1)ATP synthase, J Bioenerg Biomembr, 40(4): s. 257-67 (2008).
26. Wittig I.Schagger H., Structural organization of mitochondrial ATP synthase, Biochim Biophys Acta, 1777(7-8): s. 592-8 (2008).
27. Spannagel C., Vaillier J., Arselin G., Graves P.V., Grandier-Vazeille X.Velours J., Evidence of a subunit 4 (subunit b) dimer in favor of the proximity of ATP synthase complexes in yeast inner mitochondrial membrane, Biochim Biophys Acta, 1414(1-2): s. 260-4 (1998).
28. Arnold I., Pfeiffer K., Neupert W., Stuart R.A.Schagger H., Yeast mitochondrial F1F0-ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits, EMBO J, 17(24): s. 7170-8 (1998).
29. Strauss M., Hofhaus G., Schroder R.R.Kuhlbrandt W., Dimer ribbons of ATP synthase shape the inner mitochondrial membrane, EMBO J, 27(7): s. 1154-60 (2008).
30. Paumard P., Vaillier J., Coulary B., Schaeffer J., Soubannier V., Mueller D.M., Brethes D., di Rago J.P.Velours J., The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology, EMBO J, 21(3): s. 221-30 (2002).
31. Vaillier J., Arselin G., Graves P.V., Camougrand N.Velours J., Isolation of supernumerary yeast ATP synthase subunits e and i. Characterization of subunit i and disruption of its structural gene ATP18, J Biol Chem, 274(1): s. 543-8 (1999).

32. Chen C., Ko Y., Delannoy M., Ludtke S.J., Chiu W.Pedersen P.L., Mitochondrial ATP synthasome: three-dimensional structure by electron microscopy of the ATP synthase in complex formation with carriers for Pi and ADP/ATP, J Biol Chem, 279(30): s. 31761-8 (2004).
33. Vik S.B.Antonio B.J., A mechanism of proton translocation by F1F0 ATP synthases suggested by double mutants of the a subunit, J Biol Chem, 269(48): s. 30364-9 (1994).
34. Mitome N., Ono S., Sato H., Suzuki T., Sone N.Yoshida M., Essential arginine residue of the F(o)-a subunit in F(o)F(1)-ATP synthase has a role to prevent the proton shortcut without c-ring rotation in the F(o) proton channel, Biochem J, 430(1): s. 171-7 (2010).
35. Menz R.I., Walker J.E.Leslie A.G., Structure of bovine mitochondrial F(1)-ATPase with nucleotide bound to all three catalytic sites: implications for the mechanism of rotary catalysis, Cell, 106(3): s. 331-41 (2001).
36. Noji H., Yasuda R., Yoshida M.Kinosita K., Jr., Direct observation of the rotation of F1-ATPase, Nature, 386(6622): s. 299-302 (1997).
37. Abrahams J.P., Leslie A.G., Lutter R.Walker J.E., Structure at 2.8 A resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria, Nature, 370(6491): s. 621-8 (1994).
38. Oster G.Wang H., ATP Synthase: Two rotary molecular motors working together, v knize Encyclopedia of Molecular Biology, T. Creighton, Editor, Wiley, New York (1999).
39. Gao Y.Q., Yang W.Karplus M., A structure-based model for the synthesis and hydrolysis of ATP by F1-ATPase, Cell, 123(2): s. 195-205 (2005).
40. Yasuda R., Noji H., Kinosita K., Jr.Yoshida M., F1-ATPase is a highly efficient molecular motor that rotates with discrete 120 degree steps, Cell, 93(7): s. 1117-24 (1998).
41. Watanabe R., Iino R.Noji H., Phosphate release in F1-ATPase catalytic cycle follows ADP release, Nat Chem Biol, 6(11): s. 814-20 (2010).
42. Ariga T., The concerted nature between three catalytic subunits driving the F1 rotary motor, Biosystems, 93(1-2): s. 68-77 (2008).
43. Ariga T., Muneyuki E.Yoshida M., F1-ATPase rotates by an asymmetric, sequential mechanism using all three catalytic subunits, Nat Struct Mol Biol, 14(9): s. 841-6 (2007).
44. Okuno D., Ikeguchi M.Noji H., Measurement of the conformational state of F(1)-ATPase by single-molecule rotation, Methods Enzymol, 475: s. 279-96 (2010).
45. Sielaff H., Rennekamp H., Engelbrecht S.Junge W., Functional halt positions of rotary FOF1-ATPase correlated with crystal structures, Biophys J, 95(10): s. 4979-87 (2008).
46. Masaike T., Koyama-Horibe F., Oiwa K., Yoshida M.Nishizaka T., Cooperative three-step motions in catalytic subunits of F(1)-ATPase correlate with 80 degrees and 40 degrees substep rotations, Nat Struct Mol Biol, 15(12): s. 1326-33 (2008).
47. D'Alessandro M., Turina P.Melandri B.A., Intrinsic uncoupling in the ATP synthase of Escherichia coli, Biochim Biophys Acta, 1777(12): s. 1518-27 (2008).
48. Sumbilla C.M., Zielke C.L., Reed W.D., Ozand P.T.Zielke H.R., Comparison of the oxidation of glutamine, glucose, ketone bodies and fatty acids by human diploid fibroblasts, Biochim Biophys Acta, 675(2): s. 301-4 (1981).
49. Reitzer L.J., Wice B.M.Kennell D., Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells, J Biol Chem, 254(8): s. 2669-76 (1979).

50. Zielke H.R., Zielke C.L.Ozand P.T., Glutamine: a major energy source for cultured mammalian cells, Fed Proc, 43(1): s. 121-5 (1984).
51. Ernster L., Ikkos D.Luft R., Enzymic activities of human skeletal muscle mitochondria: a tool in clinical metabolic research, Nature, 184: s. 1851-4 (1959).
52. Skladal D., Halliday J.Thorburn D.R., Minimum birth prevalence of mitochondrial respiratory chain disorders in children, Brain, 126(Pt 8): s. 1905-12 (2003).
53. Vafai S.B.Mootha V.K., Mitochondrial disorders as windows into an ancient organelle, Nature, 491(7424): s. 374-83 (2012).
54. Schwartz M.Vissing J., Paternal inheritance of mitochondrial DNA, N Engl J Med, 347(8): s. 576-80 (2002).
55. Houstek J., Pickova A., Vojtiskova A., Mracek T., Pecina P., Jesina P., Mitochondrial diseases and genetic defects of ATP synthase, Biochim Biophys Acta, 1757(9-10): s. 1400-5 (2006).
56. Baracca A., Sgarbi G., Mattiazzi M., Casalena G., Pagnotta E., Valentino M.L., Moggio M., Lenaz G., Carelli V.Solaini G., Biochemical phenotypes associated with the mitochondrial ATP6 gene mutations at nt8993, Biochim Biophys Acta, 1767(7): s. 913-9 (2007).
57. Santorelli F.M., Shanske S., Jain K.D., Tick D., Schon E.A., DiMauro S., A T-->C mutation at nt 8993 of mitochondrial DNA in a child with Leigh syndrome, Neurology, 44(5): s. 972-4 (1994).
58. Baracca A., Barogi S., Carelli V., Lenaz G.Solaini G., Catalytic activities of mitochondrial ATP synthase in patients with mitochondrial DNA T8993G mutation in the ATPase 6 gene encoding subunit a, J Biol Chem, 275(6): s. 4177-82 (2000).
59. Tatuch Y.Robinson B.H., The mitochondrial DNA mutation at 8993 associated with NARP slows the rate of ATP synthesis in isolated lymphoblast mitochondria, Biochem Biophys Res Commun, 192(1): s. 124-8 (1993).
60. Sgarbi G., Baracca A., Lenaz G., Valentino L.M., Carelli V.Solaini G., Inefficient coupling between proton transport and ATP synthesis may be the pathogenic mechanism for NARP and Leigh syndrome resulting from the T8993G mutation in mtDNA, Biochem J, 395(3): s. 493-500 (2006).
61. Dionisi-Vici C., Seneca S., Zeviani M., Fariello G., Rimoldi M., Bertini E.De Meirleir L., Fulminant Leigh syndrome and sudden unexpected death in a family with the T9176C mutation of the mitochondrial ATPase 6 gene, J Inherit Metab Dis, 21(1): s. 2-8 (1998).
62. Jesina P., Tesarova M., Fornuskova D., Vojtiskova A., Pecina P., Kaplanova V., Hansikova H., Zeman J.Houstek J., Diminished synthesis of subunit a (ATP6) and altered function of ATP synthase and cytochrome c oxidase due to the mtDNA 2 bp microdeletion of TA at positions 9205 and 9206, Biochem J, 383(Pt. 3): s. 561-71 (2004).
63. Castagna A.E., Addis J., McInnes R.R., Clarke J.T., Ashby P., Blaser S.Robinson B.H., Late onset Leigh syndrome and ataxia due to a T to C mutation at bp 9,185 of mitochondrial DNA, Am J Med Genet A, 143A(8): s. 808-16 (2007).
64. De Meirleir L., Seneca S., Lissens W., Schoentjes E.Desprechins B., Bilateral striatal necrosis with a novel point mutation in the mitochondrial ATPase 6 gene, Pediatr Neurol, 13(3): s. 242-6 (1995).
65. Moslemi A.R., Darin N., Tulinius M., Oldfors A.Holme E., Two new mutations in the MTATP6 gene associated with Leigh syndrome, Neuropediatrics, 36(5): s. 314-8 (2005).

66. Seneca S., Abramowicz M., Lissens W., Muller M.F., Vamos E.de Meirleir L., A mitochondrial DNA microdeletion in a newborn girl with transient lactic acidosis, J Inherit Metab Dis, 19(2): s. 115-8 (1996).
67. Lamminen T., Majander A., Juvonen V., Wikstrom M., Aula P., Nikoskelainen E.Savontous M.L., A mitochondrial mutation at nt 9101 in the ATP synthase 6 gene associated with deficient oxidative phosphorylation in a family with Leber hereditary optic neuroretinopathy, Am J Hum Genet, 56(5): s. 1238-40 (1995).
68. Campos Y., Martin M.A., Rubio J.C., Solana L.G., Garcia-Benayas C., Terradas J.L.Arenas J., Leigh syndrome associated with the T9176C mutation in the ATPase 6 gene of mitochondrial DNA, Neurology, 49(2): s. 595-7 (1997).
69. Wilson C.J., Wood N.W., Leonard J.V., Surtees R.Rahman S., Mitochondrial DNA point mutation T9176C in Leigh syndrome, J Child Neurol, 15(12): s. 830-3 (2000).
70. Holt I.J., Harding A.E., Petty R.K.Morgan-Hughes J.A., A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy, Am J Hum Genet, 46(3): s. 428-33 (1990).
71. Thyagarajan D., Shanske S., Vazquez-Memije M., De Vivo D.DiMauro S., A novel mitochondrial ATPase 6 point mutation in familial bilateral striatal necrosis, Ann Neurol, 38(3): s. 468-72 (1995).
72. Makela-Bengs P., Suomalainen A., Majander A., Rapola J., Kalimo H., Nuutila A.Pihko H., Correlation between the clinical symptoms and the proportion of mitochondrial DNA carrying the 8993 point mutation in the NARP syndrome, Pediatr Res, 37(5): s. 634-9 (1995).
73. Houstek J., Klement P., Hermanska J., Houstkova H., Hansikova H., Van den Bogert C.Zeman J., Altered properties of mitochondrial ATP-synthase in patients with a T-->G mutation in the ATPase 6 (subunit a) gene at position 8993 of mtDNA, Biochim Biophys Acta, 1271(2-3): s. 349-57 (1995).
74. Carrozzo R., Tessa A., Vazquez-Memije M.E., Piemonte F., Patrono C., Malandrini A., Dionisi-Vici C., Vilarinho L., Villanova M., Schagger H., Federico A., Bertini E.Santorelli F.M., The T9176G mtDNA mutation severely affects ATP production and results in Leigh syndrome, Neurology, 56(5): s. 687-90 (2001).
75. Cortes-Hernandez P., Vazquez-Memije M.E.Garcia J.J., ATP6 homoplasmic mutations inhibit and destabilize the human F1F0-ATP synthase without preventing enzyme assembly and oligomerization, J Biol Chem, 282(2): s. 1051-8 (2007).
76. de Vries D.D., van Engelen B.G., Gabreels F.J., Ruitenbeek W.van Oost B.A., A second missense mutation in the mitochondrial ATPase 6 gene in Leigh's syndrome, Ann Neurol, 34(3): s. 410-2 (1993).
77. Morava E., Rodenburg R.J., Hol F., de Vries M., Janssen A., van den Heuvel L., Nijtmans L.Smeitink J., Clinical and biochemical characteristics in patients with a high mutant load of the mitochondrial T8993G/C mutations, Am J Med Genet A, 140(8): s. 863-8 (2006).
78. Tort F., Del Toro M., Lissens W., Montoya J., Fernandez-Burriel M., Font A., Bujan N., Navarro-Sastre A., Lopez-Gallardo E., Arranz J.A., Riudor E., Briones P.Ribes A., Screening for nuclear genetic defects in the ATP synthase-associated genes TMEM70, ATP12 and ATP5E in patients with 3-methylglutaconic aciduria, Clin Genet, 80(3): s. 297-300 (2011).
79. Shchelochkov O.A., Li F.Y., Wang J., Zhan H., Towbin J.A., Jefferies J.L., Wong L.J., Scaglia F., Milder clinical course of Type IV 3-methylglutaconic aciduria due to a novel mutation in TMEM70, Mol Genet Metab, 101(2-3): s. 282-5 (2010).

80. Honzik T., Tesarova M., Mayr J.A., Hansikova H., Jesina P., Bodamer O., Koch J., Magner M., Freisinger P., Huemer M., Kostkova O., van Coster R., Kmoch S., Houstek J., Sperl W.Zeman J., Mitochondrial encephalocardio-myopathy with early neonatal onset due to TMEM70 mutation, Arch Dis Child, 95(4): s. 296-301 (2010).
81. Cameron J.M., Levandovskiy V., Mackay N., Ackerley C., Chitayat D., Raiman J., Halliday W.H., Schulze A.Robinson B.H., Complex V TMEM70 deficiency results in mitochondrial nucleoid disorganization, Mitochondrion, 11(1): s. 191-9 (2011).
82. Spiegel R., Khayat M., Shalev S.A., Horovitz Y., Mandel H., Hershkovitz E., Barghuti F., Shaag A., Saada A., Korman S.H., Elpeleg O.Yatsiv I., TMEM70 mutations are a common cause of nuclear encoded ATP synthase assembly defect: further delineation of a new syndrome, J Med Genet, 48(3): s. 177-82 (2011).
83. Jonckheere A.I., Huigsloot M., Lammens M., Jansen J., van den Heuvel L.P., Spiekerkoetter U., von Kleist-Retzow J.C., Forkink M., Koopman W.J., Szklarczyk R., Huynen M.A., Fransen J.A., Smeitink J.A.Rodenburg R.J., Restoration of complex V deficiency caused by a novel deletion in the human TMEM70 gene normalizes mitochondrial morphology, Mitochondrion, 11(6): s. 954-63 (2011).
84. Atay Z., Bereket A., Turan S., Haliloglu B., Memisoglu A., Khayat M., Shalev S.A.Spiegel R., A novel homozygous TMEM70 mutation results in congenital cataract and neonatal mitochondrial encephalo-cardiomyopathy, Gene, 515(1): s. 197-9 (2013).
85. Torraco A., Verrigni D., Rizza T., Meschini M.C., Vazquez-Memije M.E., Martinelli D., Bianchi M., Piemonte F., Dionisi-Vici C., Santorelli F.M., Bertini E.Carrozzo R., TMEM70: a mutational hot spot in nuclear ATP synthase deficiency with a pivotal role in complex V biogenesis, Neurogenetics, 13(4): s. 375-86 (2012).
86. Mracek T., Pecina P., Vojtiskova A., Kalous M., Sebesta O.Houstek J., Two components in pathogenic mechanism of mitochondrial ATPase deficiency: energy deprivation and ROS production, Exp Gerontol, 41(7): s. 683-7 (2006).
87. Mayr J.A., Havlickova V., Zimmermann F., Magler I., Kaplanova V., Jesina P., Pecinova A., Nuskova H., Koch J., Sperl W.Houstek J., Mitochondrial ATP synthase deficiency due to a mutation in the ATP5E gene for the F1 epsilon subunit, Hum Mol Genet, 19(17): s. 3430-9 (2010).
88. Jonckheere A.I., Renkema G.H., Bras M., van den Heuvel L.P., Hoischen A., Gilissen C., Nabuurs S.B., Huynen M.A., de Vries M.C., Smeitink J.A.Rodenburg R.J., A complex V ATP5A1 defect causes fatal neonatal mitochondrial encephalopathy, Brain, 136(Pt 5): s. 1544-54 (2013).
89. De Meirleir L., Seneca S., Lissens W., De Clercq I., Eyskens F., Gerlo E., Smet J.Van Coster R., Respiratory chain complex V deficiency due to a mutation in the assembly gene ATP12, J Med Genet, 41(2): s. 120-4 (2004).
90. Jonckheere A.I., Hogeveen M., Nijtmans L., van den Brand M., Janssen A., Diepstra H., van den Brandt F., van den Heuvel B., Hol F., Hofste T., Kapusta L., Dillmann U., Shamdeen M., Smeitink J.Rodenburg R., A novel mitochondrial ATP8 gene mutation in a patient with apical hypertrophic cardiomyopathy and neuropathy, BMJ Case Rep, 2009 (2009).
91. Ware S.M., El-Hassan N., Kahler S.G., Zhang Q., Ma Y.W., Miller E., Wong B., Spicer R.L., Craigen W.J., Kozel B.A., Grange D.K.Wong L.J., Infantile cardiomyopathy caused by a mutation in the overlapping region of mitochondrial ATPase 6 and 8 genes, J Med Genet, 46(5): s. 308-14 (2009).

92. Vazquez-Memije M.E., Shanske S., Santorelli F.M., Kranz-Eble P., Davidson E., DeVivo D.C.DiMauro S., Comparative biochemical studies in fibroblasts from patients with different forms of Leigh syndrome, J Inherit Metab Dis, 19(1): s. 43-50 (1996).
93. Fujii T., Hattori H., Higuchi Y., Tsuji M.Mitsuyoshi I., Phenotypic differences between T-->C and T-->G mutations at nt 8993 of mitochondrial DNA in Leigh syndrome, Pediatr Neurol, 18(3): s. 275-7 (1998).
94. Kucharczyk R., Ezkurdia N., Couplan E., Procaccio V., Ackerman S.H., Blondel M.di Rago J.P., Consequences of the pathogenic T9176C mutation of human mitochondrial DNA on yeast mitochondrial ATP synthase, Biochim Biophys Acta, 1797(6-7): s. 1105-12 (2010).
95. D'Aurelio M., Vives-Bauza C., Davidson M.M.Manfredi G., Mitochondrial DNA background modifies the bioenergetics of NARP/MILS ATP6 mutant cells, Hum Mol Genet, 19(2): s. 374-86 (2010).
96. Mattiazzi M., Vijayvergiya C., Gajewski C.D., DeVivo D.C., Lenaz G., Wiedmann M.Manfredi G., The mtDNA T8993G (NARP) mutation results in an impairment of oxidative phosphorylation that can be improved by antioxidants, Hum Mol Genet, 13(8): s. 869-79 (2004).
97. Wortmann S.B., Rodenburg R.J., Jonckheere A., de Vries M.C., Huizing M., Heldt K., van den Heuvel L.P., Wendel U., Kluijtmans L.A., Engelke U.F., Wevers R.A., Smeitink J.A.Morava E., Biochemical and genetic analysis of 3-methylglutaconic aciduria type IV: a diagnostic strategy, Brain, 132(Pt 1): s. 136-46 (2009).
98. Houstek J., Klement P., Floryk D., Antonicka H., Hermanska J., Kalous M., Hansikova H., Hout'kova H., Chowdhury S.K., Rosipal T., Kmoch S., Stratilova L.Zeman J., A novel deficiency of mitochondrial ATPase of nuclear origin, Hum Mol Genet, 8(11): s. 1967-74 (1999).
99. Havlickova Karbanova V., Cizkova Vrbacka A., Hejzlarova K., Nuskova H., Stranecky V., Potocka A., Kmoch S., Houstek J., Compensatory upregulation of respiratory chain complexes III and IV in isolated deficiency of ATP synthase due to TMEM70 mutation, Biochim Biophys Acta, 1817(7): s. 1037-43 (2012).
100. Suldovská S., dilomová práce: Studium deficitu lidské F1FO-ATPsyntázy, Univerzita Karlova v Praze (2010).
101. Kratochvilova H T.M., Honzik T, Hajkova Z, Hansikova H, Sladkova J, Hulkova H, Elleder M, Zeman J, Impact of mutation in TMEM70 gene on respiratory chain complexes and mitochondrial ultrastructure, 17th European Bioenergetics Conference EBEC, Freiburg Nemecko (2012, POSTER).
102. Sládková J., Laboratoř pro studium mitochondriálních poruch (Klinika dětského a dorostového lékařství 1.LF UK a VFN), 2014.
103. Rodinová M., Diplomová práce: Studium poruch NADH:ubichinon oxidoreduktázy u člověka, Univerzita Karlova v Praze (2012).
104. Hejzlarova K., Tesarova M., Vrbacka-Cizkova A., Vrbacky M., Hartmannova H., Kaplanova V., Noskova L., Kratochvilova H., Buzkova J., Havlickova V., Zeman J., Kmoch S.Houstek J., Expression and processing of the TMEM70 protein, Biochim Biophys Acta, 1807(1): s. 144-9 (2011).
105. Calvo S., Jain M., Xie X., Sheth S.A., Chang B., Goldberger O.A., Spinazzola A., Zeviani M., Carr S.A.Mootha V.K., Systematic identification of human mitochondrial disease genes through integrative genomics, Nat Genet, 38(5): s. 576-82 (2006).

106. Houstek J., Kmoch S., Zeman J., TMEM70 protein - a novel ancillary factor of mammalian ATP synthase, Biochim Biophys Acta, 1787(5): s. 529-32 (2009).
107. Sgarbi G., Casalena G.A., Baracca A., Lenaz G., DiMauro S.Solaini G., Human NARP mitochondrial mutation metabolism corrected with alpha-ketoglutarate/aspartate: a potential new therapy, Arch Neurol, 66(8): s. 951-7 (2009).
108. Manfredi G., Gupta N., Vazquez-Memije M.E., Sadlock J.E., Spinazzola A., De Vivo D.C.Schon E.A., Oligomycin induces a decrease in the cellular content of a pathogenic mutation in the human mitochondrial ATPase 6 gene, J Biol Chem, 274(14): s. 9386-91 (1999).
109. Manfredi G., Fu J., Ojaimi J., Sadlock J.E., Kwong J.Q., Guy J.Schon E.A., Rescue of a deficiency in ATP synthesis by transfer of MTATP6, a mitochondrial DNA-encoded gene, to the nucleus, Nat Genet, 30(4): s. 394-9 (2002).
110. Ojaimi J., Pan J., Santra S., Snell W.J.Schon E.A., An algal nucleus-encoded subunit of mitochondrial ATP synthase rescues a defect in the analogous human mitochondrial-encoded subunit, Mol Biol Cell, 13(11): s. 3836-44 (2002).
111. Craven L., Tuppen H.A., Greggains G.D., Harbottle S.J., Murphy J.L., Cree L.M., Murdoch A.P., Chinnery P.F., Taylor R.W., Lightowlers R.N., Herbert M.Turnbull D.M., Pronuclear transfer in human embryos to prevent transmission of mitochondrial DNA disease, Nature, 465(7294): s. 82-5 (2010).
112. Martineau R., Kohlbacher M., Shaw S.N.Amos H., Enhancement of hexose entry into chick fibroblasts by starvation: differential effect on galactose and glucose, Proc Natl Acad Sci U S A, 69(11): s. 3407-11 (1972).
113. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L.Randall R.J., Protein measurement with the folin phenol reagent, Journal of Biological Chemistry, 193(1): s. 265-275 (1951).
114. Wittig I., Braun H.P.Schagger H., Blue native PAGE, Nat Protoc, 1(1): s. 418-28 (2006).
115. Wojtczak L., The Crabtree effect: a new look at the old problem, Acta Biochim Pol, 43(2): s. 361-8 (1996).
116. Marroquin L.D., Hynes J., Dykens J.A., Jamieson J.D.Will Y., Circumventing the Crabtree effect: replacing media glucose with galactose increases susceptibility of HepG2 cells to mitochondrial toxicants, Toxicol Sci, 97(2): s. 539-47 (2007).
117. Rossignol R., Gilkerson R., Aggeler R., Yamagata K., Remington S.J.Capaldi R.A., Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells, Cancer Res, 64(3): s. 985-93 (2004).
118. Aguer C., Gambarotta D., Mailloux R.J., Moffat C., Dent R., McPherson R.Harper M.E., Galactose enhances oxidative metabolism and reveals mitochondrial dysfunction in human primary muscle cells, PLoS One, 6(12): s. e28536 (2011).
119. Robinson B.H., Petrova-Benedict R., Buncic J.R.Wallace D.C., Nonviability of cells with oxidative defects in galactose medium: a screening test for affected patient fibroblasts, Biochem Med Metab Biol, 48(2): s. 122-6 (1992).
120. Dumont P., Burton M., Chen Q.M., Gonos E.S., Frippiat C., Mazarati J.B., Eliaers F., Remacle J.Toussaint O., Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblast, Free Radic Biol Med, 28(3): s. 361-73 (2000).

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka