

University of Groningen

Human cytochrome c oxidase

Taanman, Jan Willem

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

1991

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Taanman, J. W. (1991). *Human cytochrome c oxidase: aspects of its biogenesis*. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

MENSELIJK CYTOCHROOM *c* OXIDASE

Aspecten van de Biogenese

SAMENVATTING

Mitochondriën zijn onmisbaar voor de energievoorziening van eukaryote cellen. In deze organellen wordt via het proces van oxidatieve fosforylering voeding geoxideerd door overdracht van electronen aan zuurstof waarbij energie vrijkomt. De componenten die een rol spelen in dit proces zijn gerangschikt in vijf eiwitcomplexen en zijn gelegen in het mitochondriële binnenmembraan. Vier van de vijf complexen vormen een elektronentransportketen. De energie die voortkomt uit het elektronentransport wordt geconserveerd in de vorm van een protonengradiënt over het mitochondriële binnenmembraan. De aldus opgebouwde protonengradiënt wordt gebruikt door het vijfde complex (ATP-synthase) voor de vorming van ATP. ATP is de universele drager van energie in biologische systemen. In zoogdieren is het oxidatieve fosforyleringssysteem opgebouwd uit minstens 68 eiwitten. De genen voor 13 van deze eiwitten zijn gelegen op het betrekkelijk klein DNA molecuul dat zich in het mitochondrion bevindt. Deze 13 eiwitten worden in het mitochondrion gesynthetiseerd. De genen voor de overige eiwitten zijn gelokaliseerd op het DNA dat in de celkern aanwezig is. Deze eiwitten worden gesynthetiseerd in het cytosol en vervolgens geïmporteerd in het mitochondrion. Bij deze import dient over het algemeen een aan één van de uiteinden (N-terminaal) gelegen gedeelte van het eiwit als adresseringssignaal. Deze zogenaamde presequentie wordt afgesplitst tijdens de import. Wanneer de energiebehoefte van een cel verandert, bijvoorbeeld tijdens celvermeerdering of ontwikkeling, dan zal naar alle waarschijnlijkheid ook de capaciteit om ATP te kunnen vormen dienovereenkomstig worden aangepast. Dit kan onder andere bereikt worden door de biosynthese van de eiwitcomponenten van de oxidatieve fosforyleringsenzymen aan te passen. Eén van de fundamentele vraagstellingen in de moleculaire celbiologie is hoe de biosynthetische activiteit van het nucleaire en het mitochondriële genetische systeem

wordt gecordineerd om aan de cellulaire energiebehoefte te voldoen.

In dit proefschrift is de biogenese (vorming) van het enzym cytochroom *c* oxidase gekozen als model voor onderzoek aan de relaties tussen de celkern en het mitochondrion. Cytochroom *c* oxidase is de laatste component van de electronentransportketen. Dit enzymcomplex katalyseert de electronenoverdracht van cytochroom *c* naar moleculaire zuurstof en draagt bij aan het ontstaan van de protonengradiënt. Er is gekozen voor het bestuderen van het menselijke enzym zodat de resultaten van dit onderzoek direct toegepast kunnen worden om de moleculair-biologische verschijnselen op te helderen bij patiënten die leiden aan een deficiëntie van cytochroom *c* oxidase.

Cytochroom *c* oxidase is bij zoogdieren samengesteld uit 13 verschillende subeenheden (eiwitten). De drie grootste subeenheden (I, II en III) zijn direct betrokken bij de katalytische functies van het enzym. Deze drie subeenheden liggen gecodeerd op het mitochondriële DNA en worden gesynthetiseerd in het organel. De overige subeenheden (IV, Va, Vb, VIa, VIb, VIc, VIIa, VIIb, VIIc en VIII) worden gecodeerd door het DNA in de celkern en worden, zoals reeds gememoreerd, gesynthetiseerd in de cytosol van waaruit zij getransporteerd worden naar de mitochondriën. De functie(s) van de kerngecodeerde subeenheden is onduidelijk. Mogelijk passen zij de katalytische functies van het enzym aan in overeenstemming met de energiebehoefte van de cel (via allosterische modificatie). Bij de mens komen de subeenheden VIa en VIIa als weefsel-specifieke isovormen voor: de zogenaamde levervorm en spiervorm. De synthese van weefsel-specifieke isovormen zou een extra mogelijkheid kunnen zijn om energieproductie af te stemmen op de energiebehoefte in de verschillende weefsels.

Omdat de genen voor subeenheden van cytochroom *c* oxidase zowel op het nucleaire als het mitochondriële DNA gelokaliseerd zijn, vereist de biogenese van een functioneel cytochroom *c* oxidase complex de gecoördineerde expressie van nucleair en mitochondrieel DNA. De cytochroom *c* oxidase genen op het mitochondriële DNA van de mens zijn volledig gekarakteriseerd. Om de coördinatie tussen de nucleaire en mitochondriële genen die betrokken zijn bij de biogenese van cytochroom *c* oxidase volledig te kunnen evalueren is het noodzakelijk tevens de kerngecodeerde, structurele genen voor cytochroom *c* oxidase subeenheden te karakteriseren. Daarnaast dient ook de expressie van de cytochroom *c* oxidase genen bestudeerd te worden in verschillende biologische systemen. Het in dit proefschrift beschreven onderzoek heeft zich gericht op: (i) het ontwikkelen van moleculair-biologisch gereedschap (antilichaam- en cDNA-probes) voor onderzoek aan de expressie van cytochroom *c* oxidase genen bij de mens, (ii) de karakterisering van een menselijk cytochroom *c*

oxidase-gen en de aanwezigheid van hieraan nauw verwante DNA-volgorden in het menselijke genoom, en tot slot (iii) de transcriptie van cytochroom *c* oxidase genen bij de mens.

Hoofdstuk 2 beschrijft de bereiding van antisera tegen kerngecodeerde subeenheden van cytochroom *c* oxidase uit runderhart. Antisera opgewekt tegen de cluster van subeenheden VIa, b en c zijn gebruikt om uit een menselijke skeletspier cDNA-bank een volledige cDNA-kloon te isoleren die codeert voor subeenheid VIb. (Een cDNA-kloon bevat een DNA kopie van een boodschapper RNA). cDNA-klonen identiek aan deze skeletspier cDNA-kloon zijn geïsoleerd uit een menselijke lever cDNA-bank. Omdat bovendien subeenheid VIb-gentranscripten van overeenkomstige lengte aangetoond konden worden in verschillende menselijke weefsels en cellen, komen er waarschijnlijk geen weefselspecifieke isovormen voor van subeenheid VIb bij de mens. Een potentiële ribosoombindingsplaats juist stroomopwaarts gelegen van een startcodon maakt het waarschijnlijk dat subeenheid VIb gesynthetiseerd wordt zonder afsplitsbare presequentie. Hoe deze subeenheid het mitochondrion binnenkomt is dan ook een raadsel. De kerngecodeerde subeenheden van cytochroom *c* oxidase zijn moeilijk van elkaar te scheiden en geschikt menselijk materiaal is niet gemakkelijk te verkrijgen. Om deze problemen bij het opwekken van subeenheidspecifieke antisera te omzeilen zijn antisera opgewekt tegen een chimaere bacterieel eiwit dat het produkt was van een bacterieel gen (*lacZ*) gefuseerd met het cDNA voor de menselijke cytochroom *c* oxidase subeenheid VIb. Het produkt van dit fusiegen kan betrekkelijk eenvoudig geïsoleerd worden.

In hoofdstuk 3 is de aanwezigheid van de aan cytochroom *c* oxidase subeenheid VIb-gerelateerde DNA-volgorden in het menselijk genoom nagegaan. Daartoe is een menselijke, genomische bank onderzocht op de aanwezigheid van deze DNA-volgorden met behulp van een in hoofdstuk 2 geïsoleerde cDNA-kloon. Hierbij werden drie verschillende pseudogenen geïsoleerd. Alle kenmerken van één van deze pseudogenen wijzen erop dat het gevormd is via omgekeerde ("reverse") transcriptie van een rijp ("mature") transcript voor subeenheid VIb, gevolgd door insertie in een nieuwe chromosomale locus. Dit wil zeggen dat introns ontbreken, een poly(A)⁻sequentie aanwezig is aan het 3'-uiteinde van het pseudogen en het pseudogen omringd wordt door identieke DNA-sequenties ("direct repeats"). Dit ("processed") pseudogen is ontstaan na de divergentie van mens en rund, zo'n 80 miljoen jaar geleden. De sequentie van beide andere pseudogenen wordt geïnterrupteerd door de meest voorkomende, korte, zich herhalende DNA sequentie die in het genoom van primaten en knaagdieren aanwezig is. Deze sequentie wordt gekenmerkt door het voorkomen van twee knipplaatsen voor het restrictie-endonuclease *AluI* op

een onderlinge afstand van ca. 300 basenparen. Door de aanwezigheid van deze sequenties kunnen de pseudogenen niet met zekerheid geïdentificeerd worden.

Naast pseudogenen is uit dezelfde genomische bank ook het meest distale gedeelte van het gen voor subeenheid VIb geïsoleerd (hoofdstuk 4). Met behulp van de sequentiegegevens van deze partiële kloon werd het mogelijk een tweede genomische bank te onderzoeken met een oligodeoxynucleotide dat specifiek de sequentie grenzend aan de 3'-kant van het gen herkent. Hierdoor kon vermeden worden dat opnieuw pseudogenen geïsoleerd werden. Op deze wijze is uit een tweede bank een kloon geïsoleerd die een gedeelte van het laatste intron, het laatste exon en het 3'-aangrenzende gedeelte van het gen bevatte. De partiële isolatie van het cytochroom *c* oxidase VIb-gen heeft het mogelijk gemaakt, via *in situ* hybridisatie van metafase chromosoom-preparaten met deze genomische kloon, het gen te lokaliseren. Het gen ligt op chromosoom 19, band q13.1 (zie omslag).

De afgelopen vijf jaar zijn ook door andere onderzoeksgroepen cDNA-klonen geïsoleerd voor cytochroom *c* oxidase subeenheden van zoogdieren. Op dit moment is een vrijwel volledige set van cDNA-klonen beschikbaar. In hoofdstuk 5 is met behulp van deze cDNA-klonen de verdeling van cytochroom *c* oxidase-gentranscripten (boodschapper RNAs) onderzocht in menselijke lever, skeletspier en verschillende gekweekte celtypen (HeLa, MOLT-4, GLC-4). De onderlinge verhouding van aanwezige transcripten voor subeenheid I, II, IV, Va en VIb blijkt met elkaar overeen te komen in de verschillende weefsels en gekweekte cellen, ondanks het feit dat deze transcripten afkomstig zijn van twee ruimtelijk gescheiden genomen. De hoogste transcriptniveaus worden gevonden in gekweekte cellen, gevolgd door skeletspier en dan lever. De transcriptie van de genen voor de subeenheden VIa en VIIa blijkt weefselspecifiek te zijn; boodschapper RNAs voor de isovormen aangeduid als harttype worden uitsluitend aangetoond in skeletspier, terwijl boodschapper RNAs voor de isovorm van VIa aangeduid als levertype uitsluitend in lever en gekweekte cellen gedetecteerd worden. Boodschapper RNAs voor de isovorm van VIIa aangeduid als levertype zijn, naast in lever en gekweekte cellen, eveneens aanwezig in skeletspier, zij het in beperkte mate. De onderlinge verhouding van aanwezige boodschapper RNAs voor de subeenheden VIc, VIc en VIII in de verschillende weefsels en gekweekte cellen blijkt niet overeen te komen met de onderlinge verhouding van aanwezig boodschapper RNA voor de mitochondrieel gecodeerde subeenheden van cytochroom *c* oxidase. Om een indruk te krijgen van de expressie van mitochondriële eiwitten is de enzymatische activiteit van cytochroom *c* oxidase en citraat synthase bepaald. Beide zijn relatief hoog

in skeletspier, gevolgd door lever en gekweekte cellen. Tezamen doen deze waarnemingen vermoeden dat de transcriptniveaus van nucleaire en mitochondriële genen voor subeenheden van cytochroom *c* oxidase gecoördineerd gereguleerd worden. Dit regulatiemechanisme wordt echter tenietgedaan door cellulaire differentiatie en geldt niet voor alle genen voor cytochroom *c* oxidase-subeenheden. In weefsels lijken de cytochroom *c* oxidase-genen onderworpen te zijn aan een mechanisme dat hun transcriptie controleert. In gekweekte cellen zouden de relatieve grote hoeveelheden transcripten vergeleken met de relatief lage cytochroom *c* oxidase-activiteit kunnen wijzen op een post-transcriptioneel regulatieproces.

In hoofdstuk 6 zijn de relatieve hoeveelheden transcript bepaald van de genen voor de mitochondriële, ribosomale RNAs en van genen voor subeenheden van cytochroom *c* oxidase en ATP-synthase tijdens de *in vitro* differentiatie van menselijke myoblasten (spierstamcellen) naar myotubes (multinucleaire spiervezels). Deze *in vitro* differentiatie dient als model voor de myogenese (spiervorming). De relatieve hoeveelheid mitochondriële transcripten en nucleaire transcripten voor de subeenheden IV, Va, Vb, VIb, VIc, VIIc en VIII van cytochroom *c* oxidase en subeenheid β van ATP-synthase veranderen parallel aan elkaar; de transcriptniveaus nemen toe tijdens de overgang van myoblasten naar myotubes en zijn lager in late myotubes. De transcriptie van de nucleaire genen voor isovormen van de subeenheden VIa en VIIa blijkt celtype-afhankelijk te zijn. De hoeveelheid transcript voor de isovorm van VIa aangeduid als levertype neemt af tijdens de differentiatie, terwijl op het zelfde moment de transcriptie van het gen voor de isovorm van VIa aangeduid als harttype juist geïnduceerd wordt. Transcripten voor beide isovormen subeenheid VIIa zijn aanwezig gedurende de gehele kweek, de hoeveelheid transcript voor de isovorm van VIIa aangeduid als harttype neemt toe tijdens de differentiatie. Deze resultaten maken het waarschijnlijk dat er sprake is van wisseling van subeenheid VIb isovormen en van co-expressie van subeenheid VIIa isovormen tijdens de myogenese. Het mechanisme voor de regulering van de transcriptie blijkt onder controle te staan van de celdifferentiatie in dit systeem. Er worden van elkaar verschillende veranderingen in hoeveelheid van de transcripten voor de isovormen VIa en VIIa, aangeduid als harttype, en van elkaar verschillende veranderingen in hoeveelheid van de transcripten voor de isovormen VIa en VIIa, aangeduid als levertype, gevonden. Dit geeft aan dat er verschillende mechanismen voor transcriptie-regulatie aanwezig zijn voor zowel de genen voor de beide isovormen aangeduid als harttype, als voor de genen voor beide isovormen aangeduid als levertype.

Hoofdstuk 7 gaat in op zeer recente ontwikkelingen op het gebied van gecoördineerde expressie van genen die van belang zijn voor de biogenese van mitochondriën. Bij de isolering en karakterisering van een aantal nucleaire genen voor mitochondriële eiwitten zijn in het 5'-aangrenzende gedeelte van deze genen verschillende, gemeenschappelijke DNA-sequentie-elementen geïdentificeerd die verondersteld worden een rol spelen bij de gecoördineerde expressie. Opvallend is dat geen van deze sequentie-elementen gemeenschappelijk voorkomt in alle nucleaire genen voor mitochondriële eiwitten of bijvoorbeeld een bepaald complex van de oxidatieve fosforylering. Het huidige beeld wekt de indruk dat er een overlappend mozaïek patroon van gemeenschappelijke, regulerende sequentie-elementen aanwezig is in het 5'-aangrenzende gedeelte van deze genen. Dit beeld geeft aan dat de genen enerzijds onderhevig zijn aan gecoördineerde transcriptie, maar anderzijds ook meer onafhankelijk gereguleerd kunnen worden. Men kan zich afvragen of de transcriptie van mitochondriële eiwitten onder alle omstandigheden gecoördineerd gereguleerd is. Mogelijk vindt gecoördineerde regulering van de transcriptie slechts plaats onder bepaalde omstandigheden en worden slechts bepaalde genen gecoördineerd gereguleerd. Dit sluit goed aan bij de waarnemingen gedaan in hoofdstuk 5 en 6, waarbij voor een gedeelte van de de genen voor subeenheden van cytochroom c oxidase gecoördineerde transcriptniveaus aangetoond worden, terwijl de transcriptniveaus voor een ander gedeelte van de subeenheden een hiervan verschillend patroon volgt onder andere beïnvloed door de differentiatie tijdens de myogenese.