

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



STUDIUM ENERGETICKÉHO METABOLISMU U PACIENTŮ S PORUCHOU
MITOCHONDRIÁLNÍ TRANSLACE

The study of energetic metabolism in patients with mitochondrial translation defects

Martin Hýbl

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Hana Hansíková, CSc.

Konzultanti: Mgr. Hana Štufková, Ph.D., Ing. Markéta Tesařová, Ph.D.

Laboratoř pro studium mitochondriálních poruch

Klinika pediatrie a dědičných poruch metabolismu 1. LF UK a VFN

Praha, 2023

PROHLÁŠENÍ

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

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 22. května 2023

Martin Hýbl

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych poděkoval Haně Štufkové, Markétě Tesařové a Haně Hansíkové za profesionální vedení mé bakalářské práce. Také bych chtěl poděkovat všem členům laboratoře za přátelské prostředí. V neposlední řadě patří můj dík také mé rodině, která mě celou dobu při psaní bakalářské práce podporovala.

Tato bakalářská práce byla podpořena grantem AZV MZ ČR NU22-01-00499.

ABSTRAKT

Mitochondrie jsou semiautonomní organely obsahující vlastní DNA. Lidská mitochondriální DNA (mtDNA) kóduje celkem 37 genů: 13 podjednotek komplexů systému oxidační fosforylace (OXPHOS), 22 molekul transferových RNA (tRNA) a 2 molekuly ribosomální RNA (rRNA). Patogenní mutace v genech spojených s mitochondriální translací jsou častou příčinou vzniku mitochondriálních onemocnění. Tyto mutace mohou být nalezeny v mtDNA, nebo v jaderných genech kódujících ribosomální proteiny, iniciační, elongační a terminační faktory, enzymy modifikující mitochondriální tRNA a aminoacyl-tRNAsynthetasy. Mitochondriální aminoacyl-tRNAsynthetasy (mt-aaRS) jsou enzymy katalyzující připojení jednotlivých aminokyselin ke specifickým tRNA.

Cílem bakalářské práce bylo seznámení se s prací v laboratoři tkáňových kultur. V rámci přípravy vzorků pro následující experimenty byly kultivovány kožní fibroblasty od pěti pacientů s poruchou mt-aaRS (*AARS2*, *DARS2*, *NARS2*, *SARS2*) a kontrolních linií v glukosovém a galaktosovém médiu. Následně byl optimalizován postup pro stanovení rovnovážného množství vybraných podjednotek komplexů systému OXPHOS, který byl aplikován při analýze fibroblastů od pěti pacientů s poruchou mt-aaRS. Při kultivaci buněk v glukosovém mediu bylo u čtyř pacientů pozorováno snížení hladin některých podjednotek komplexu I, komplexu III a komplexu IV systému OXPHOS. Pokud byla v médiu, jako zdroj sacharidů, použita galaktosa bylo patrné, že nedochází ve fibroblastech pacientů k redukci podjednotek komplexů systému OXPHOS. Dále byla prokázána nutnost použití věkově kompatibilní kontroly se skupinou pacientů. V rámci bakalářské práce bylo potvrzeno, že fibroblasty od dospělé kontroly nejsou vhodné ke srovnání s fibroblasty pediatrických pacientů od půl roku do třech let věku.

KLÍČOVÁ SLOVA

mitochondrie, mitochondriální translace, mitochondriální aminoacyl-tRNAsynthetasy, kultivované kožní fibroblasty

ABSTRACT

Mitochondria are semi-autonomous organelles that contain their own DNA. Human mitochondrial DNA (mtDNA) encodes a total of 37 genes: 13 subunits of oxidative phosphorylation complexes (OXPHOS), 22 transfer RNA (tRNA) molecules and 2 ribosomal RNA (rRNA) molecules. Pathogenic mutations in genes associated with mitochondrial translation are a common cause of mitochondrial disease. These mutations can be found in mtDNA or in nuclear genes encoding ribosomal proteins, initiation, elongation and termination factors, mitochondrial tRNA-modifying enzymes and aminoacyl-tRNA synthetases. Mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetases (mt-aaRS) are enzymes that catalyse the addition of single amino acids to specific tRNAs.

The aim of the bachelor thesis was an introduction to the work in the tissue culture laboratory. To prepare samples for the following experiments, skin fibroblasts from five patients with mt-aaRS disorders (*AARS2*, *DARS2*, *NARS2*, *SARS2*) and control lines were cultured in glucose and galactose media. Subsequently, the procedure for determining the equilibrium amount of selected subunits of the OXPHOS complexes was optimized and applied to the analysis of fibroblasts from five patients with mt-aaRS disorder. When the cells were cultured in glucose medium, decreased levels of some subunits of complex I, complex III and complex IV of the OXPHOS system were observed in four patients. When galactose was used as a carbohydrate source in the medium, it was evident that there was no reduction of OXPHOS system complex subunits in the fibroblasts of the patients. Furthermore, the necessity of using an age-matched control group of patients was demonstrated. The thesis confirmed that fibroblasts from adult control is not suitable for comparison with fibroblasts from paediatric patients aged half to three years.

KEYWORDS

mitochondria, mitochondrial translation, mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetases, cultured skin fibroblasts

SEZNAM ZKRATEK

μg	mikrogram, jednotka hmotnosti
μl	mikrolitr, jednotka objemu
aa	aminokyselina
<i>AARS2</i>	jaderný gen kódující mitochondriální alanyl-tRNAsynthetasu
ADP	adenosindifosfát
AMP	adenosinmonofosfát
APS	persíran amonný
ATP	adenosintrifosfát
ATPB	podjednotka komplexu V
BCA	kyselina bicinchoninová, z angl. <i>bicinchonic acid</i>
BSA	hovězí sérový albumín, z angl. <i>bovinne serum albumin</i>
cm^2	centimetr čtvereční, jednotka plochy
COX5a	podjednotka komplexu IV
cyt c	cytochrom c
<i>DARS2</i>	jaderný gen kódující mitochondriální aspartyl-tRNAsynthetasu
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina, z angl. <i>deoxyribonucleic acid</i>
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová, z angl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
FADH2	redukováná forma flavinadenindinukleotidu
FBS	fetální hovězí sérum, z angl. <i>fetal bovinne serum</i>
g	jednota zrychlení
Gal	galaktosa
<i>GARS</i>	jaderný gen kódující glycyl-tRNAsynthetasu
Glc	glukosa
H^+	kationt vodíku
IgG	imunoglobulin G
K (1-3)	kontrola (1-3)
<i>KARS</i>	jaderný gen kódující lysil-tRNAsynthetasu
kbp	1000 násobek počtu párů bází, z angl. <i>kilobase pairs</i>
kDa	kilodalton, jednotka molekulové hmotnosti
KI	komplex I

KII	komplex II
KIII	komplex III
KIV	komplex IV
KV	komplex V
MDa	megadalton, jednotka molekulové hmotnosti
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina, z angl. <i>messenger ribonucleic acid</i>
mt	mitochondriální
MTATP6	mitochondriálně kódovaná podjednotka komplexu V
MTCO2	mitochondriálně kódovaná podjednotka komplexu IV
MTCYB	mitochondriálně kódovaná podjednotka komplexu III
mtEFG2	mitochondriální prodlužující faktor G2, z angl. <i>mitochondrial elongation factor G2</i>
mtEFTu	mitochondriální prodlužující faktor teplotně nestabilní, z angl. <i>mitochondrial elongation factor thermo unstable</i>
mtIF	mitochondriální iniciační faktor, z angl. <i>mitochondrial initiation factor</i>
MTND5	mitochondriálně kódovaná podjednotka komplexu I
MTS	mitochondriální zaměřovací sekvence, z angl. <i>mitochondrial target sequence</i>
NADH	redukováná forma nikotinamidadeninindinukleotid
NARS2	jaderný gen kódující mitochondriální asparagyl-tRNAsynthetasu
NDUFA9	podjednotka komplexu I
nm	nanometr, jednotka délky
°C	stupeň celsia, jednotka teploty
OXPHOS	system oxidační fosforylace z angl. <i>oxidative phosphorylation system</i>
P (1-5)	pacient (1-5)
PBS	fosfátový pufr, z angl. <i>phosphate buffer solution</i>
Pi	volný fosfát
PPi	volný pyrofosfát
PIC	koktejl inhibitorů proteas, z angl. <i>protease inhibitor cocktail</i>
PVDF	polysvinylidendifluorid
Q-10	koenzym Q10
RIPA	lyzační roztok, z angl. <i>radioimmunoprecipitation assay</i>
RNA	ribonukleová kyselina, z angl. <i>ribonucleic acid</i>

rRNA	ribosomální ribonukleotidová kyselina, z angl. <i>ribosomal ribonucleic acid</i>
S	svedberg, jednotka sedimentačního koeficientu
SARS2	jaderný gen kódující mitochondriální seryl-tRNA-synthetasu
SDHA	podjednotka komplexu II
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v prostředí dodecylsíranu sodného, z angl. <i>sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis</i>
TARS2	threonyl-tRNA-synthetasy
TBS	trisma fosfátový pufr, z angl. <i>trisma base buffer</i>
TBST	trisma fosfátový pufr s tweenem, z angl. <i>trisma base buffer tween</i>
Temed	N,N,N',N'-tetramethylethan-1,2-diamin
TIM	translokasa na vnitřní membráně membráně z angl. <i>translokase of inner membrane</i>
TOM	translokasa na vnější mitochondriální membráně z angl. <i>translocase of outer membrane</i>
Tris-HCl	trihydroxymethylaminomethan HCl
UDP	uridindifosfát
UQCRC2	podjednotka komplexu III
V	značení objemu
v/v	objemová procenta, z angl. <i>volume/volume</i>
w/v	hmotnostní procenta, z angl. <i>weight/volume</i>

OBSAH

1 TEORETICKÝ ÚVOD.....	11
1.1 MITOCHONDRIE.....	11
1.2 SYSTÉM OXIDAČNÍ FOSFORYLACE	11
1.3 GALAKTOSA JAKO ZDROJ ENERGIE	13
1.4 LIDSKÁ MITOCHONDRIÁLNÍ DNA	14
1.5 MITOCHONDRIÁLNÍ REPLIKACE, TRANSKRIPCE A TRANSLACE.....	15
1.5.1 MITOCHONDRIÁLNÍ AMINOACYL-tRNASYNTHETASY	17
1.5.1.1 MECHANISMUS AMINOACYLACE tRNA.....	18
1.5.1.2 PATOGENNÍ MUTACE MITOCHONDRIÁLNÍCH AMINOACYL-tRNASYNTHETAS.....	20
2 CÍL PRÁCE	22
3 MATERIÁL.....	23
3.1 BIOLOGICKÝ MATERIÁL	23
3.2 CHEMIKÁLIE.....	24
3.3. KULTIVAČNÍ MÉDIA.....	25
3.4 PUFRY A ZÁSOBNÍ ROZTOKY	25
3.5 PŘÍSTROJE A POMŮCKY	26
4 METODY A POSTUPY.....	28
4.1 POSTUP PRO KULTIVACI FIBROBLASTŮ.....	28
4.1.1 PŘÍPRAVA MÉDIA.....	28
4.1.2 KULTIVACE V GLUKOSOVÉM MÉDIU.....	28
4.1.3 KULTIVACE V GALAKTOSOVÉM MÉDIU	29
4.2 PŘÍPRAVA VZORKU NA ELEKTROFORÉZU V POLYAKRYLAMIDOVÉM GELU V PŘÍTOMNOSTI DODECYLSÍRANU SODNÉHO.....	29
4.3 STANOVENÍ KONCENTRACE PROTEINŮ A OPTIMALIZACE NANÁŠKY VZORKU.....	29
4.4 POSTUP PRO PROVEDENÍ ELEKTROFORÉZY	30
4.5 WESTERN BLOT	32
4.6 IMUNODETEKCE.....	32
5 VÝSLEDKY	34
5.1 SEZNÁMENÍ SE S PRACÍ V LABORATOŘI TKÁŇOVÝCH KULTUR	34

5.2 OPTIMALIZACE PODMÍNEK ANALÝZY ROVNOVÁŽNÉHO MNOŽSTVÍ PODJEDNOTEK KOMPLEXŮ SYSTÉMU OXIDAČNÍ FOSFORYLACE.....	35
5.3 STANOVENÍ ROVNOVÁŽNÉHO MNOŽSTVÍ VYBRANÝCH PODJEDNOTEK KOMPLEXŮ OXPHOS U PACIENTŮ S PORUCHOU AMINOACYL- tRNASYNTHETAS.....	37
6 DISKUZE	42
7 ZÁVĚR.....	45
8 POUŽITÁ LITERATURA	46

1 TEORETICKÝ ÚVOD

1.1 MITOCHONDRIE

Mitochondrie jsou semiautonorní organely, ve kterých se odehrává mnoho buněčných procesů (Picard a kol., 2016). Jsou hlavním místem syntézy ATP (Gray 1992; Margulis 1996). Mitochondrie obsahují svůj vlastní genom a neustále procházejí procesem fragmentace a fúze (Chen a Chan, 2005). Podle endosymbiotické teorie jsou mitochondrie přímým potomkem eubakteriálního endosymbionta. Protoeukaryotická hostitelská buňka s anaerobním heterotrofním metabolismem pohltila aerobní bakterii α -proteobakterii v procesu endocytózy. Větší část původního bakteriálního genomu byla přenesena do jádra, čímž se bakterie stala plně závislou na hostitelské buňce. Několik proteinů však unikátně zůstalo kódováno mitochondriální DNA (mtDNA) (Sagan 1967). Mitochondrie je rozdělena pomocí dvou membrán na několik kompartmentů. Vnější mitochondriální membrána odděluje mitochondrii od cytosolu a vnitřní mitochondriální membrána rozděluje vnitřek mitochondrie na mezimembránový prostor a mitochondriální matrix. Vnitřní membrána je uspořádána do krist (Chan 2006). Mitochondrie mají ústřední roli v energetickém metabolismu buňky. Část energie pocházející z oxidace živin je uvnitř mitochondrií přeměněna na ATP. Tento proces je závislý na přísunu kyslíku. Produkce mitochondriálního ATP probíhá pomocí systému oxidační fosforylace (OXPHOS, z angl. *oxidative phosphorylation system*) lokalizovaném na vnitřní mitochondriální membráně (Chan 2006).

1.2 SYSTÉM OXIDAČNÍ FOSFORYLACE

Systém OXPHOS (obrázek 1, str. 13) je složen ze čtyř komplexů dýchacího řetězce (KI–IV), ATP syntasy (KV) a dvou elektronových přenašečů (ubichinon, cytochrom c) (Garone a kol. 2018). Redukované formy NADH a FADH₂ vzniklé při glykolýze, oxidaci mastných kyselin a v Krebsově cyklu jsou energeticky bohaté molekuly, které poskytují elektrony do dýchacího řetězce. Komplexy dýchacího řetězce přenášejí elektrony postupně, až nakonec redukuje kyslík na vodu. Elektrony při migraci skrze komplexy dýchacího řetězce konají elektrickou práci a postupné uvolňování energie během přenosu elektronů se využívá k pumpování protonů (H⁺) do

mezimembránového prostoru (Reid a kol. 1966). Vzniklý protonový gradient je poté využit ATP syntasou k syntéze ATP z ADP a volného fosfátu (Pi) (Boyer 1997).

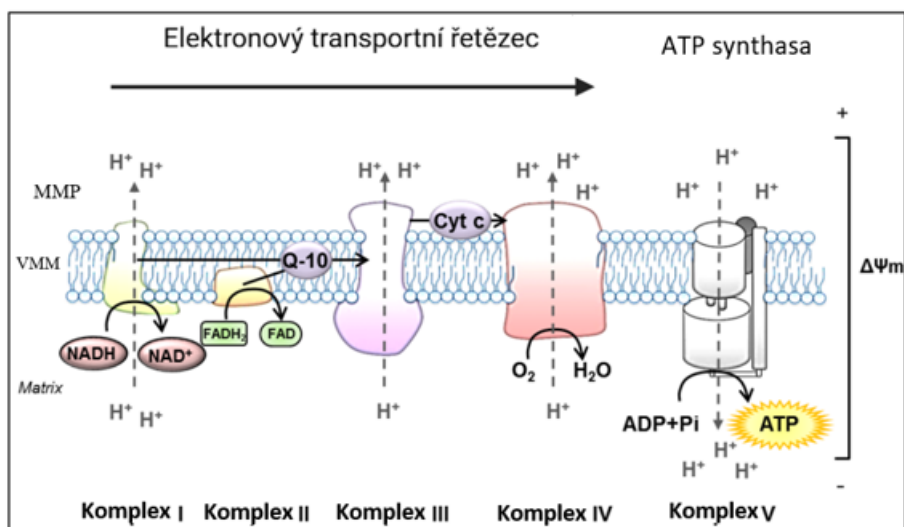
Komplex I (KI) je multiproteinový komplex s celkovou hmotností přibližně 1 MDa. U člověka je složen ze 44 podjednotek, z nichž je 7 kódováno mtDNA (Zhu a kol. 2016). Komplex I přispívá k produkci buněčné energie přenosem elektronů z NADH na ubichinon spojený s translokací protonů přes membránu (Letts a Sazanov 2015).

Komplex II (KII) je přibližně 140 kDa velký proteinový komplex (Whitehouse a Moore 2013), který je součástí Krebsova cyklu i respiračního řetězce. V rámci Krebsova cyklu oxiduje sukcinát na fumarát. KII přenáší elektrony na ubichinon. Je jediný respirační komplex, který nečerpá protony přes vnitřní mitochondriální membránu (Hägerhäll 1997). Všechny 4 podjednotky KII jsou jaderně kódované (Rasheed a Tarjan 2018).

Komplex III (KIII) představuje 240 kDa velký enzymový komplex složený z 11 podjednotek (Lee a kol. 1995) z nichž pouze jedna je kódována mtDNA (Vercellino a Sazanov 2022). KIII přijímá elektrony z ubichinolu generovaných na KI a KII a dále je předává na cytochrom c, dalšímu elektronovému přenašeči v rámci systému OXPHOS, který přivádí elektrony na komplex IV (Lee a kol. 1995).

Komplex IV (KIV) přijímá elektrony dodané cytochromem c (a tím jej oxiduje), aby redukoval kyslík na vodu, navíc přenáší H^+ do mezimembránového prostoru za každou molekulu cytochromu c (Yoshikawa a Shimada 2015). KIV představuje poslední komplex dýchacího řetězce. U člověka je přibližně 200 kDa velký a složen ze 14 různých podjednotek (Zong a kol. 2018). Tři mitochondriálně kódované podjednotky jsou součástí katalytického jádra enzymového komplexu (Vercellino a Sazanov 2022).

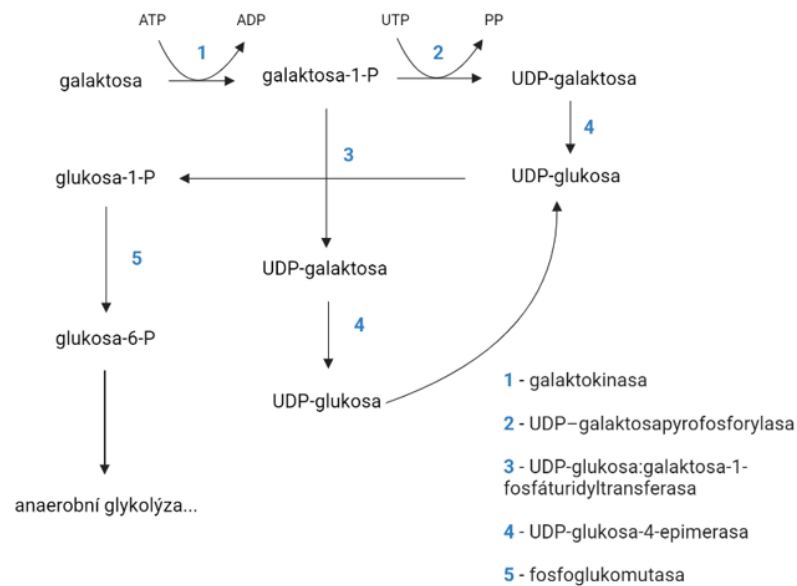
Komplex V (KV), neboli ATP syntasa využívá protonový gradient tvořený komplexy I - IV na vnitřní mitochondriální membráně k tvorbě ATP z ADP a Pi (Stock a kol 2000). Lidská ATP syntasa je přibližně 650 kDa velký komplex tvořen 18 různými podjednotkami, kdy mitochondriálně jsou kódovány dvě z nich a ostatní podjednotky jsou kódovány jadernými geny (von Ballmoos a kol. 2008).



Obrázek 1: Schematické znázornění systému OXPHOS v mitochondriích. Elektrony z NADH a FADH₂ putují elektronovým transportním řetězcem, čímž tvoří protonový gradient na vnitřní mitochondriální membráně, čehož využívá ATP syntasa pro tvorbu ATP z ADP a Pi (Stock a kol. 2000), upraveno (Szabo a kol. 2020). Q-10 (ubichinon/ubichinol) je elektronový přenašeč mezi KI a KIII a mezi KII a KIII. Cyt c – cytochrom c slouží jako elektronový přenašeč mezi KIII a KIV. Zkratky: MMP: mezimembránový prostor, VMM: vnitřní mitochondriální membrána.

1.3 GALAKTOSA JAKO ZDROJ ENERGIE

Galaktosa je jedním z monosacharidů, které jsou součástí sacharidů v potravě. Metabolismus galaktosy v lidských buňkách je složitý proces, který se skládá ze tří hlavních kroků. Prvním krokem je vstup galaktosy do buňky, pomocí specifických galaktosových transportérů (Novotný a kol. 2016). Tyto transportéry se nacházejí na povrchu buněk a přenášejí galaktosu z vnějšího prostředí do nitra buňky. Následně dochází k přeměně galaktosy na glukosu. K této přeměně dochází v několika krocích a účastní se jí několik enzymů. Nejdůležitější z nich jsou galaktokinasa (obrázek 2, str. 14). Glukosa, která vznikla z galaktosy, se dále metabolizuje buňkou jako běžný zdroj energie. Využití glukosy zahrnuje glykolýzu, Krebsův cyklus a oxidační fosforylaci (Holden a kol. 2003).



Obrázek 2: **Schéma metabolismu galaktosy.** Galaktosa je nedřívě, pomocí (1), fosforylována na galaktosa-1-P. Následně dochází ke dvěma možnostem. První možností je vznik UDP-galaktosy pomocí (2). UDP-galaktosa je následně izomerována pomocí (4) na UDP-glukosu. Druhou možností je pomocí (3) za přítomnosti UDP-glukosy vznik opět UDP-galaktosy, která je opět izomerována pomocí (4) na UDP-glukosu. UDP-glukosa předává UDP skupinu na galaktosa-1-P za vzniku glukosa-1-P a UDP-galaktosy. Glukosa-1-P je pomocí (5) přeměněna na glukosa-6-P, která následně směřuje do anaerobní glykolýzy (Holden a kol. 2003). Vytvořeno v programu biorender.com.

1.4 LIDSKÁ MITOCHONDRIÁLNÍ DNA

Mitochondrie jsou jediné orgány, které obsahují vlastní genom. Lidská mtDNA (obrázek 3, str. 15) je kruhová molekula s délkou 16,5 kbp, která se skládá z lehkého a těžkého vlákna. mtDNA se nachází v mitochondriální matrix, kde je lokalizována společně s replikačním DNA aparátem. Aparát genové exprese syntetizuje základní složky dýchacího řetězce kódované mtDNA (Nicholls a Fergusson 2013). Lidská mtDNA kóduje 37 genů: 2 ribosomální ribonukleotidové kyseliny (rRNA), 22 transférových RNA (tRNA) a 11 mediátorových RNA (mRNA) kódujících 13 polypeptidů (Crews a kol. 1979). U savců je mtDNA jednoznačně děděná od matky (Giles a kol. 1980). Kvůli absenci histonů a dalších strukturních proteinů je mtDNA náchylnější k poškození ve srovnání s jadernou DNA (Yakes a Van Houten 1997). D smyčka představuje nekódující oblast mtDNA a je regulačním elementem pro replikaci a transkripci (Chang a Clayton 1985). Každá buňka obsahuje až stovky mitochondrií, kdy každá mitochondrie obsahuje 2-10 molekul mtDNA. Z toho vyplývá, že každá buňka může obsahovat deset až několik tisíc kopií mtDNA, záleží na typu buňky (Burger a kol. 2004).

Zatímco komponenty a mechanismy translace jsou dobře charakterizovány pro bakteriální a eukaryotické cytoplazmatické systémy, o syntéze mitochondriálních proteinů je toho známo mnohem méně (Smits a kol. 2010). Základní mitochondriální translační aparát zahrnuje mitochondriálně kódované rRNA a tRNA, iniciační, elongační a terminační translační faktory, mitochondriální ribosomální proteiny, mitochondriální aminoacyl-tRNAsynthetasy a methionyl-tRNAtransformylasy (Spremulli a kol. 2004).

Mitoribosomy jsou složeny z velké a malé podjednotky (O'Brien 1971). Dosud se předpokládá, že savčí malá podjednotka se skládá z 12 S mt-rRNA a 30 proteinů. Savčí velká podjednotka se skládá z 16 S mt-rRNA a 53 proteinů (Greber a kol. 2015). První krok syntézy proteinu, iniciace, zahrnuje zapojení mitochondriální mRNA, selekci startovacího kodonu a Watson-Crickovo párování s iniciační tRNA. Vývoj translačně kompetentního iniciačního komplexu probíhá tvorbou několika meziproductů. V mitochondriích vyžaduje iniciace asistenci pouze dvou iniciačních faktorů: mtIF2 a mtIF3. Nedostatek mtIF1 v mitochondriích je kompenzován inzercí domény specifické pro mitochondrie do mtIF2, která zabráňuje předčasněmu akomodaci tRNA v místě A během tvorby iniciačního komplexu (Gaur a kol. 2008). Během elongace se mitoribosom přemístí podél transkriptu mRNA a přemění genetickou informaci na aminokyselinovou sekvenci polypeptidu. Proces probíhá ve třech cyklech: dekódování kodonu mRNA pomocí specifické tRNA, tvorba peptidové vazby a translokace modulu mRNA-tRNA. Základní mechanismus elongace zůstává zachován u všech ribosomů (Ott a kol. 2016).

Přechod z iniciační do elongační fáze je spojen s dodáním druhé aminoacyl-tRNA do mitoribosomálního aminoacylačního místa komplexem elongačního termo nestabilního faktoru (mtEFTu, z angl. *mitochondrial elongation factor thermo unstable*) (Larsen a kol. 2005). Správná akomodace aminoacyl-tRNA v aminoacylovém místě umožňuje druhý krok prodlužování reakcí peptidyltransferasy, pro kterou jsou substrátem tRNA nesoucí rostoucí polypeptidový řetězec a aminoacyl-tRNA (Zeviani a Di Donato 2004). Poslední krok procesu prodlužování, jmenovitě translokace, zahrnuje vysoce přesný pohyb mRNA s navázanou tRNA přesně o tři nukleotidy v rámci. Během tohoto procesu se tRNA deacetylovaného peptidylového místa a tRNA aminoacylového místa nesoucí polypeptidový řetězec posunou do exitového místa a peptidylového místa v daném pořadí. Transferová RNA je z exitového místa následně vytlačena. V mitochondriích se vyvinuly dva homology bakteriálního prodlužujícího faktoru

mtEFG1 (z angl. *mitochondrial elongation factor G1*) a mtEFG2 (z angl. *mitochondrial elongation factor G2*). Zatímco mtEFG1 je nutný pro translační elongaci, mtEFG2 iniciuje štěpení mitoribosomálních podjednotek na konci translačního cyklu (Bonawitz a kol. 2006).

1.5.1 MITOCHONDRIÁLNÍ AMINOACYL-tRNASYNTHETASY

Mitochondriální aminoacyl-tRNAsynthetasy (mt-aaRS) jsou skupinou jaderně kódovaných enzymů, které katalyzují konjugaci každé z 20 aminokyselin k jejich specifické molekule tRNA prostřednictvím dvoufázové reakce (Delarue 1995). Dvě lidské mitochondriální aaRS jsou kódovány stejnými geny jako jejich cytosolické analogy (glycyl-tRNAsynthetasa, lysyl-tRNAsynthetasa). Ostatní mitochondriální aaRS mají vlastní gen (Garin a kol. 2020). U lidí existují aaRS specifické pro mitochondrie pro 17 z 20 proteinogenních aminokyselin (Bonfond a kol. 2005). Geny pro tyto proteiny jsou obecně označovány jako *ARS2*. Výjimkou je gen glycyl-tRNAsynthetasy (*GARS*), který používá alternativní startovací sekvenci ke kódování jak cytosolárních, tak mitochondriálních enzymů (Shiba a kol. 1994), a gen lysyl-tRNAsynthetasy (*KARS*), který využívá alternativní sestřih k vytvoření odlišných mRNA (Tolkunova a kol. 2000). V obou případech se cytosolární a mitochondriální enzymy liší především přítomností, nebo nepřítomností N-terminální mitochondriální cílicí sekvence. Mitochondriální glutamin-tRNA vzniká transamidací glutamyl-tRNA pomocí glutamyl-tRNA-dependentní amidotransferasy (Echevarría a kol. 2014). Po úplné translaci jsou jaderně kódované mt-aaRS udržovány v inaktivní formě prostřednictvím asociace s různými chaperony a následně translokovány do mitochondrie. Signál pro transport drtivé většiny proteinů matrix a vnitřní membrány zahrnuje N-terminální presekvenční, která slouží jako mitochondriální cílicí sekvence (MTS, z angl. *mitochondrial target sequence*). MTS se běžně skládá z 20–60 aminokyselin, které tvoří kladně nabitou amfifilní strukturu α -helix s nábojem +3 až +6 (Vögtle a kol. 2009) Tato presekvenční je rozpoznána translokasami na vnější mitochondriální membráně (TOM, z angl. *translocase of outer membrane*) (Bausewein a kol. 2017). Translokasa vnitřní mitochondriální membrány (TIM z angl. *translocase of inner membrane*) tvoří kanál do matrix, kterým prochází prekurzorový protein. Pomocí specifické mitochondriální

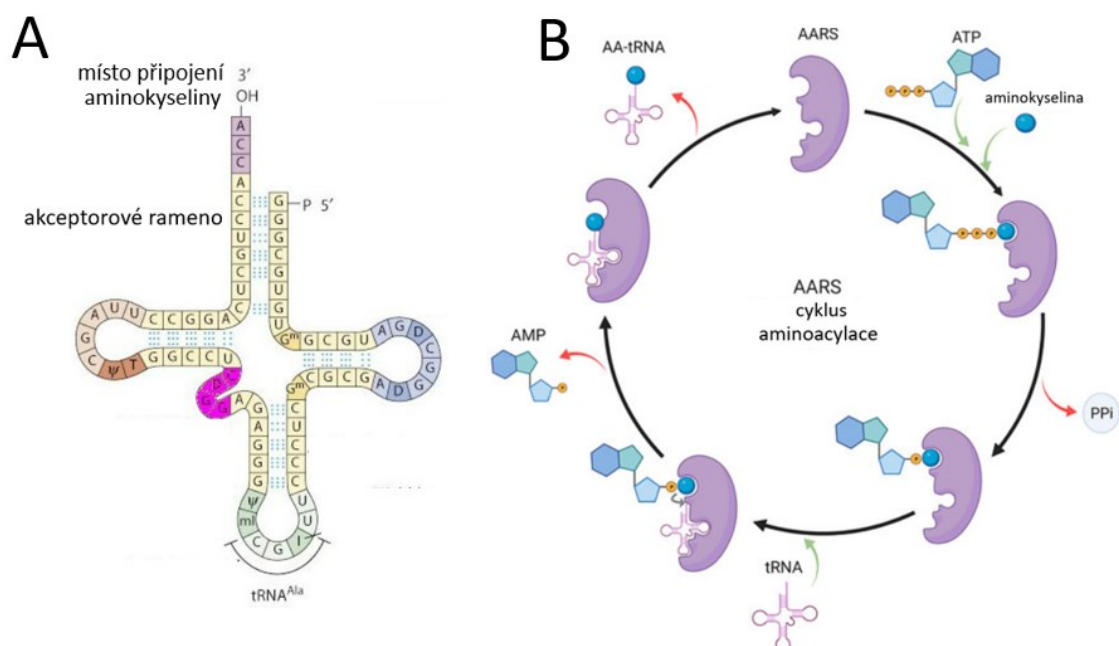
procesní peptidasy nacházejících se v matrici se je odštěpena MTS, čímž se vytváří zralý funkční protein (Mossmann a kol. 2012).

U několika mt-aaRS byly popsány i alternativní funkce. Mitochondriální tryptophanyl-tRNA-synthetasa reguluje hustotu sítě kapilár v srdci potkana. Inhibicí tohoto enzymu dochází k snížení tvorby vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (Wang a kol. 2016). Mitochondriální cysteinyl-tRNA-synthetasa u myších a lidských buněk se kriticky podílí na mitochondriální biogenezi a energetickém metabolismu tím, že její funkce souvisí s tvorbou persíranů (Akaike a kol. 2017).

1.5.1.1 MECHANISMUS AMINOACYLACE tRNA

Transferová RNA (tRNA) je adaptorová molekula složená z RNA (obrázek 4A, str. 19), typicky o délce 76 až 90 nukleotidů (u eukaryot) (Sharp a kol. 1985), která slouží jako fyzické spojení mezi mRNA a aminokyselinovou sekvencí proteinů. CCA konec je konzervovaná sekvence na 3' konci molekuly tRNA. Aminokyselina se připojuje k tRNA pomocí aaRS za vzniku aminoacyl-tRNA kovalentní vazbou k 3'-hydroxylovou skupinu na CCA konci (Ibba a Söll 2000). Tato sekvence je důležitá pro rozpoznání tRNA enzymy a při překlada z sekvence mRNA do sekvence proteinů (Sprinzl a Cramer 1979).

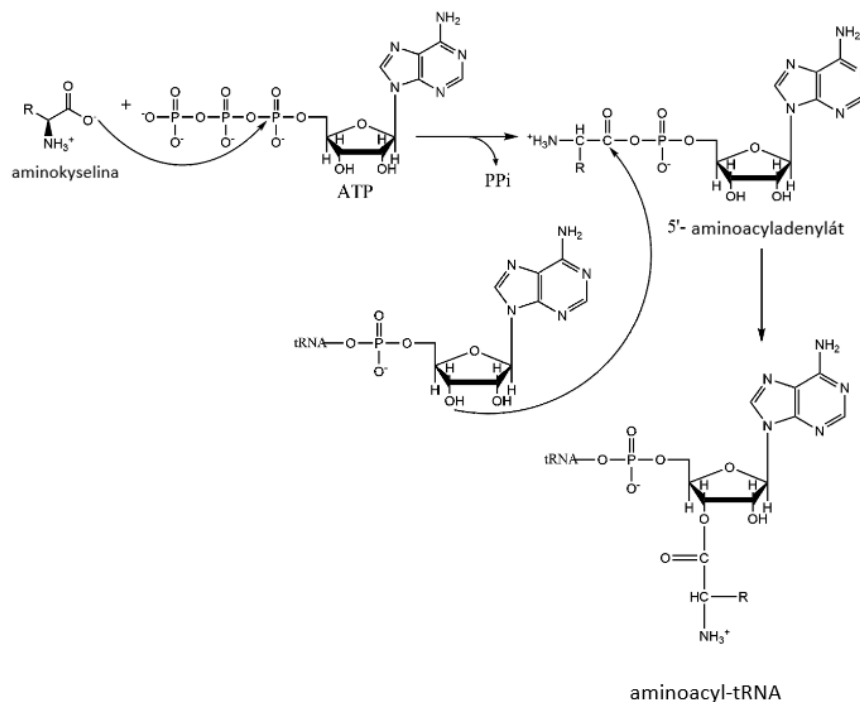
Aminoacylace tRNA je dvoukrokovou reakcí, jejíž průběh znázorňuje obrázek 5 (str. 20). V prvním kroku, se tvoří 5'-aminoacyladenylát. Ve druhém kroku se tvoří „nabitá“ aminoacyl-tRNA. Enzymy aaRS třídy II (př. threonyl-tRNA-synthetasa, fenylalanyl-tRNA-synthetasa a alanyl-tRNA-synthetasa) katalyzují nukleofilní přenos na adenylát pomocí 3'-hydroxyly. Enzymy třídy I (př. leucyl-tRNA-synthetasa, isoleucyl-tRNA-synthetasa a valyl-tRNA-synthetasa) používají 2'-OH pro počáteční reakci před transesterifikací do polohy 3'- (Li a kol. 2015).



Obrázek 4.: **A) Zobrazení molekuly tRNA.** Transferová RNA slouží jako fyzické spojení mezi mRNA a aminokyselinovou sekvencí proteinů. Na 3' konci tRNA se nachází konzervovaná sekvence CCA, pomocí níž se aminokyselina prostřednictvím aaRS připojuje k tRNA za vzniku aminoacyl-tRNA (Ibba a Söll 2000). Převzato a upraveno z (Hardin 2012). **B) Znázornění vazebných míst na aaRS.** V prvním kroku se na aminokyselinové vazebné místo navazuje specifická aminokyselina a ATP, následně se odštěpí pyrofosfát (PPi). Ve druhém kroku se na druhé vazebné místo navazuje specifická tRNA, a odštěpí se AMP, upraveno (Ganesh a Maerkl 2022).

Aminokyseliny mají mnohem menší velikost, než tRNA a tak je obecně pro všechny aaRS k dispozici méně chemických skupin, které by odlišily specifické aminokyseliny od ostatních. Obecně jsou aminokyseliny rozpoznávány na základě jejich velikosti, funkční skupiny a schopnosti vázat se s kovovými ionty přítomnými v aktivním místě enzymu (Banerjee a kol. 2010).

Každá aaRS má specifické vazebné místo pro tRNA (obrázek 4B, str. 19). Výběr specifické tRNA je zásadní pro zajištění funkčnosti translace. Počáteční vazba tRNA na aaRS je rychlá a nespecifická a řídí se elektrostatickou interakcí. Při počáteční vazbě zajišťují specifické interakce mezi tRNA a aaRS rozpoznání správné tRNA. Specifické interakce se tvoří pomaleji, doprovázené konformačními změnami v aktivním místě aaRS. Interakce jsou zprostředkovány prvky identity, jako jsou modifikované nukleotidy, konzervované zbytky, vrstvení bází a různé délky ramen tRNA (McClain a Foss 1988).



Obrázek 5: **Mechanismus aminoacylace tRNA.** V prvním kroku, se tvoří 5'-aminoacyladenylát. Ve druhém kroku se tvoří „nabitá“ aminoacyl-tRNA. AARS třídy II katalyzují nukleofilní atak na adenylát pomocí 3'-hydroxyly. Enzymy třídy I používají 2'-OH pro počáteční reakci před transesterifikací do polohy 3'-. Převzato a přeloženo (Li a kol. 2015).

1.5.1.2 PATOGENNÍ MUTACE MITOCHONDRIÁLNÍCH AMINOACYL-TRNASYNTHETAS

První souvislost mezi mutacemi postihující mt-aaRS a lidským onemocněním se datuje do roku 2007, kdy byla mutace v genu *DARS2*, kódující mitochondriální aspartyl-tRNA synthetasu spojeny s leukoencefalopatií s postižením mozkového kmene, míchy a zvýšenou hladinou laktátu (Scheper a kol. 2007). Od té doby bylo objeveno mnoho dalších patogenních mutací a k dnešku bylo identifikováno v 17 z 19 genů kódujících mt-aaRS. Všechny dosud popsané mutace vedou k autosomálním recesivním poruchám. Nejčastějšími chorobami jsou hluchota, epilepsie, hypotonie, a retinopatie spojená se slepotou. Pacienti jsou buď složenými heterozygoty (s oběma recesivními alelami pro stejný gen mutovanými na různém místě) nebo homozygoty (s oběma recesivními alelami pro stejný gen identicky mutovanými na stejném místě) (Moulinier a kol. 2017).

Mutace ve vazebných místech pro aminokyselinu, ATP, nebo konzervovaného konce CCA na tRNA vede k absenci katalýzy, nebo zhoršené katalýze v závislosti na úrovni konzervace a strukturální roli. Pro specifitu a pevnou vazbu se dostupné oblasti aaRS vážou na specifickou tRNA na více místech na jejím povrchu. Mutace na vazebných rozhraních mohou změnit dynamiku a skládání proteinových zbytků, což vede ke ztrátě specifity vazby. Navíc aaRS často tvoří oligomery a mutace mohou ovlivnit oligomerizaci, což vede k neaktivním formám, špatně složeným, nebo agregovaným proteinům. Mutace na pozicích daleko od známé klíčové funkční oblasti mohou stále vést ke škodlivým účinkům. Mutací zakryté aminokyseliny se může změnit komunikace mezi jednotlivými doménami (např. mezi vazbou prvku identity tRNA a místem katalýzy). Podobně mutace vyskytující se v oblasti, kde se neváže žádný známý substrát, může stále zasahovat prostřednictvím molekulárního přeuspořádání a dynamiky, do vazby k substrátu (Sissler a kol. 2017).

2 CÍL PRÁCE

Cílem bakalářské práce bylo v liniích kožních fibroblastů s poruchou mitochondriálních aminoacyl-tRNA-synthetas (*AARS2*, *DARS2*, *NARS2*, *SARS2*) studovat dopad tohoto defektu na komplexy systému oxidační fosforylace ve srovnání s kontrolními liniemi při kultivaci za různých podmínek.

Specifickými cíli práce bylo:

- 1) Osvojení si práce v laboratoři tkáňových kultur;
- 2) Optimalizace podmínek analýzy rovnovážného množství vybraných podjednotek komplexů systému oxidační fosforylace;
- 3) Stanovení rovnovážného množství vybraných podjednotek komplexů systému oxidační fosforylace v pěti liniích kožních fibroblastů s poruchou mitochondriálních aminoacyl-tRNA-synthetas (*AARS2*, *DARS2*, *NARS2*, *SARS2*) v médiích obsahující jako zdroj sacharidů galaktosu, nebo glukosu.

3 MATERIÁL

3.1 BIOLOGICKÝ MATERIÁL

Biologickým materiálem pro bakalářskou práci bylo 5 linií kožních fibroblastů od pacientů s poruchou v aminoacyl-tRNAsynthetasech (tabulka 1) a 3 kontrolní linie kožních fibroblastů. Tato studie byla provedena v souladu s Helsinskou deklarácí Světové lékařské asociace a byla schválena Etickou komisí pro lékařskou etiku Všeobecné fakultní nemocnice v Praze a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy. Pro všechny kožní biopsie byl získán informovaný souhlas rodičů.

Tabulka 1: **Buněčné linie kožních fibroblastů pěti pacientů s poruchou v genech pro mitochondriální aminoacyl-tRNAsynthetasy.** Tabulka znázorňuje rok narození, věk v době odběru materiálu v měsících, postižený gen a popis jeho mutace u jednotlivých pacientů. Pacient P1 je homozygot, ostatní pacienti P2 – P4 jsou složeni heterozygoti.

pacient	rok narození	věk v době odběru materiálu	postižený gen	varianty
P1	2011	6 m	<i>AARS2</i>	c.[1774C>T];c.[1774C>T],(p.Arg592Trp)
P2	2006	26 m	<i>DARS2</i>	c.[228-10C>A];[1894C>T], (p.Arg76Serfs*5);(p.Arg632*)
P3	2020	9 m	<i>NARS2</i>	c.[523T>A];[749G>A], (p.Phe175Ile);(p.Arg250Gln)
P4	2016	13 m	<i>NARS2</i>	c.[83_84del];[1339A>G], (p.Leu28Glnfs*17);(p.Met447Val)
P5	2011	39 m	<i>SARS2</i>	c.[1204_1204delC];[1292G>A],(p.Arg402Alafs*49); (p.Arg431His)

m:měsíce

kontrolní linie kožních fibroblastů:

- K1: neonatální kontrola ATCC® PCS-201-010™
- K2: komerční kontrola ATCC® CRL-2450™
- K3 zdravá dospělá kontrola (žena, narozena v roce 1986, rok odběru 2014)

3.2 CHEMIKÁLIE

β-mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, USA
Aminopersíran (APS)	Sigma-Aldrich, USA
Akrylamid	Sigma-Aldrich, USA
Antibiotikum + Antimikotikum (ATB)	BIOSERA, Francie
BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, USA
Bisakrylamid	Sigma-Aldrich, USA
Bromethanol	Sigma-Aldrich, USA
Bromfenolová modř	Sigma-Aldrich, USA
Hovězí sérový albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, USA
Coomassie brilliant Blue R-250	Sigma-Aldrich USA
CuSO ₄	Thermo Fisher Scientific, USA
Deoxycholát sodný	Sigma-Aldrich, USA
Denaturovaný ethanol	Fagron, ČR
Dialyzované fetální hovězí sérum (FBS)	PAN TM BIOTECH Německo
Dodecylsíran sodný	Sigma-Aldrich, USA
Fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, USA
Fetální hovězí sérum (FBS)	PAN TM BIOTECH Německo
Galaktosa	Sigma-Aldrich, USA
Glutamin	PAN TM BIOTECH, Německo
Glycin	Sigma-Aldrich, USA
HCl 35%	Penta, ČR
Kyselina octová	Penta, ČR
Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA)	Sigma-Aldrich, USA
Methanol	Penta, ČR
N´N´-Methylen-bis-Akrylamid	Sigma-Aldrich, USA
NaCl	Sigma-Aldrich USA
Pierce TM BCA Protein Assay	Thermo scientific, USA
Primární protilátky: myšší	
anti-NDUFA9, anti-MTND5, anti-SDHA, anti-UQCRC2, anti-MTCYB, anti-MTCO2,	
anti-COX5a, anti-ATPB, anti-MTATP6	Abcam, UK
Primární protilátky: králičí. anti-MTND5, anti-α tubulin, anti-β aktin	Abcam, UK
Primární protilátky: králičí (anti-β-aktin, anti-α-tubulin)	Cell Signaling, USA

Protease inhibitor cocktail	Sigma-Aldrich, USA
See blue Prestained protein marker	Invitrogen, USA
Super Signal West Femto Maximum sensitivity substrate	Thermo Scientific, USA
Sušené mléko Laktino	Promil, ČR
Temed	Serva, Německo
Tricin	Sigma-Aldrich, USA
Trisma base (Tris-HCl)	Sigma-Aldrich, USA
Triton X-100	Sigma-Aldrich, USA
Trypsin-EDTA	Biosera, Francie
Tween20	Sigma-Aldrich, USA

3.3. KULTIVAČNÍ MÉDIA

Galaktosové médium:	PAN TM BIOTECH, Německo
4,5 g/l galaktosa, 200 mmol/l pyruvát sodný, 3,7g/l NaHCO ₃	
Glukosové médium:	PAN TM BIOTECH, Německo
4,5 g/l glukosa, 200 mmol/l pyruvát sodný, 3,7g/l NaHCO ₃	
Medium pro hladovění buněk:	PAN TM BIOTECH, Německo
200 mmol/l Pyruvát sodný, 3,7 g/l NaHCO ₃	

3.4 PUFRY A ZÁSOBNÍ ROZTOKY

APS 10% (v/v)
Akrylamid 49,5% [48% (v/v) akrylamid; 1,5% (v/v) bisakrylamid]
Anodový pufr [100 mM Tris-HCl; pH = 8,9]
Barvicí roztok [0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R 250; 45 % (v/v) methanol; 10 % (v/v) kyselina octová]
Barvicí roztok [0,25% (w/v) Coomassie brilliant Blue R-250; 45% (v/v) Methanol; 10% (v/v) kyselina octová]
BCA (kyselina bicinchoninová) standard [4% BSA – 40 mg rozpuštěno v 1 ml lyzačního pufru (RIPA+PIC)]
Blokovací roztok [2,5 g sušeného mléka Laktino; 50 ml TBS]
Blotovací roztok [0,4 g sušeného mléka Laktino; 20 ml TBS]
CuSO ₄ 4% [4g rozpuštěny ve 100ml dH ₂ O]

EDTA [100 mM; 5 M NaOH; pH = 7,4]

Gelový pufr [3 x koncentrovaný: 3 M Tris-HCl; pH = 8,45; 0,3% (w/v) dodecylsírán sodný]

Katodový pufr [100 mM Tris-HCl; 100mM Tricin; pH = 8,25]

Odbarvovací roztok [25% (v/v) methanol; 10% (v/v) kyselina octová]

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

Fosfátový pufr (PBS) [1,37 M NaCl; 43 mM Na₂HPO₄; 27 mM KCl; 15mM KH₂PO₄]

RIPA [50 mM Tris-HCl; pH=7,4; 150 mM NaCl; 1 mM fenylmethylsulfonyl fluorid; 1 mM kyselina ethylendiamintetraoctová; 1% (v/v) Triton X100; 1% (w/v) deoxycholát sodný; 0,1% (w/v) dodecylsírán sodný; 1% (v/v) PIC]

TBS [20 mM Tris-HCl; 137 mM NaCl; pH = 7,5]

TBST [20 mM Tris-HCl; 137 mM NaCl; pH = 7,5; 0,1% (v/v) Tween]

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

Vzorkový pufr [4 x koncentrovaný: 50 mM Tris-Cl; pH = 6,8; 12% (v/v) glycerol; 4% (w/v) dodecylsírán sodný; 2% (v/v) β-merkptoetanol; 0,01% (w/v) bromfenolová modř; 1% PIC]

3.5 PŘÍSTROJE A POMŮCKY

3D míchačka	Heidolph, Německo
Analytické váhy ABT 220-50M	Kern, Německo
Aparatura pro vertikální elektroforézu Mini-PROTEAN 3 Cell	Bio-Rad, USA
Automatické pipety	Eppendorf, Německo
Centrifuga Biofuge 28RS	Heraeus Sepatech, Německo
Centrifuga Mikro 200	Hettich Zentrifugen, Německo
Centrifuga Universal 32R	Hettich Zentrifugen, Německo
Elektroforetický zdroj PowerPac Basic,	Bio-Rad, USA
ELISA reader Scepter PowerWave	Agilent Technologies, USA
Inkubátor MCO-18 AIC	Sanyo, Japonsko
Laminární box Clean Air	Schoeller, Nizozemsko
Mikroskop Eclipse Ti2	Nikon, Japonsko
Kahan Fuego SCS pro	WLD-TEC, Německo
Odsávačka VHC pro	vacuubrand, Německo
PVDF membrány	Millipore, USA

Spotřební materiál: kultivační lahve 25 cm² a 75 cm², serologické pipety 10 ml, špičky, plastové zkumavky, stříkačky, jehly, 96 jamkové destičky, 0,22 μm filtry

pH metr 774	Metrohm, Švýcarsko
Předvážky	KERN, Německo
Quantity One	Bio-Rad, USA
Sušička gelů	Biometra, Německo
System gelové dokumentace DigiGenius	Syngene, USA
Termoblok	Labnet, USA
Termostat AccuBlock Digital Dry Bath	Labnet, USA
Trans-Blot Turbo	Bio-Rad, USA
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, USA
Whattmanův papír	Millipore, USA

4 METODY A POSTUPY

4.1 POSTUP PRO KULTIVACI FIBROBLASTŮ

4.1.1 PŘÍPRAVA MÉDIA

Před kultivací buněk byla média upravena.

K 500 ml glukosovému médiu bylo přidáno 5 ml ATB a 50 ml FBS (z angl. *fetal bovine serum*).

K 500 ml galaktosového média bylo přidáno 5 ml ATB a 50 ml FBS a 2,25 g galaktózy.

K 500 ml média pro hladovění byly přidány 2 mM glutaminu, 5 ml ATB a 50 ml FBS.

4.1.2 KULTIVACE V GLUKOSOVÉM MÉDIU

Fibroblasty pacientů a kontrol byly rozmrazeny a přidány do 5 ml glukosového média. Následně byly kultivovány v 25 cm² kultivační lahvi. Po 1 dni bylo médium odsáto a buňky byly promyty od zbylého DMSO. Následně bylo přidáno 5 ml nového glukosového média a kultivace buněk probíhala 6 dní. Poté došlo k pasážování z 25 cm² do 75 cm² kultivační lahve tak, že bylo odsáto médium, buňky byly promyty PBS a následně byl přidán 1 ml trypsinu, aby se buňky uvolnily od dna lahve. Buňky byly v trypsinu inkubovány při 37 °C 10 minut. Následně bylo do lahve přidáno 10 ml média, v němž byly buňky rozsuspendovány a celý objem byl přenesen do 75 cm² baňky. Další kultivace probíhaly stejným způsobem. Buňky byly sklízeny při 80 % konfluenci tak, že bylo odsáto médium, buňky byly omyty 5 ml PBS a následně byl přidán 1 ml trypsinu. Buňky v trypsinu byly inkubovány při 37 °C 10 minut. Následně bylo přidáno médium, jímž byly všechny kultivační lahve s trypsinem promyty a médium s buňkami bylo přidáno do plastové zkumavky. Poté byly buňky centrifugovány po dobu 5 minut při 500 g při laboratorní teplotě. Supernatant byl odsán. Peleta buněk v 15 ml plastové zkumavce byla resuspendována v 3 ml PBS a buňky znovu centrifugovány. Následně byla peleta buněk přenesena do 1,5 ml mikrozukavky, znovu zcentrifugována a byl odsán všechn supernatant a peleta buněk zamražena do - 80 °C.

4.1.3 KULTIVACE V GALAKTOSOVÉM MÉDIU

Ve chvíli, kdy byl nakultivováno od každého pacienta i kontroly dvě kultivační lahve 75 cm² fibroblastů, bylo odsáto glukosové médium, fibroblasty byly omyty 2x 5 ml PBS a následně bylo přidáno médium pro hladovění. V tomto médiu byly buňky ponechány 6 hodin. Po 6 hodinách bylo médium pro hladovění odsáto a následně bylo přidáno galaktosové médium. Buňky byly v tomto médiu ponechány 5 dní. Po 5 dnech byly buňky sklizeny a peleta buněk byla zamražena do - 80 °C.

4.2 PŘÍPRAVA VZORKU NA ELEKTROFORÉZU V POLYAKRYLAMIDOVÉM GELU V PŘÍTOMNOSTI DODECYLSÍRANU SODNÉHO

K peletě buněk z 2x 75 cm² kultivačních lahví fibroblastů bylo přidáno 150 µl směsi lyzačního roztoku (RIPA, z angl. *radioimmunoprecipitation assay*) pufru s 1% inhibítorem proteas (PIC, z angl. *protease inhibitor cocktail*) a důkladně zhomogenizováno. Následně byl vzorek inkubován 20 minut na ledu a každých 5 minut intenzivně míchán. Po skončení inkubace byla směs stočena 20 minut při 50 000 g a 4°C. Supernatant byl přenesen do čisté a nachlazené 1,5 ml mikrozkušavky a skladován v - 80 °C.

4.3 STANOVENÍ KONCENTRACE PROTEINŮ A OPTIMALIZACE NANÁŠKY VZORKU

Koncentrace proteinů byla stanovena pomocí metody kyseliny bicinchoninové (BCA, z angl. *bicinchonic acid*) na spektrofotometru ELISA reader Scepter při vlnové délce 562 nm. Pro sestavení kalibrační přímky byla připravena kalibrační řada roztoků hovězího sérového albuminu (BSA, z angl. *bovine serum albumin*) podle tabulky 2 (str. 30).

Tabulka 2: **Kalibrační řada roztoků BSA.**

Koncentrace BSA ($\mu\text{g/ml}$)	objem(μl) Standardu o koncentraci (4000 $\mu\text{g/ml}$)	Objem roztoku RIPA+PIC (μl)
0	0	1600
125	50	1550
250	100	1500
500	200	1400
1000	400	1200
2000	800	800
4000	1600	0

Ve vzorcích kontrol a pacientů byla stanovena koncentrace proteinů metodou BCA. Byl smíchán BCA standard s 4% CuSO_4 v poměru 50:1. Do 96 jamkové destičky byly přidány 2 μl vzorku v tripletu, nebo 2 μl standardu v doubletu a 200 μl roztoku BCA s 4% CuSO_4 . Následně byla provedena spektrofotometrická analýza při vlnové délce 562 nm. Z předpisu funkce kalibrační závislosti byla vypočítána koncentrace proteinů. Podle naměřené koncentrace byl připraven vzorek na elektroforézu v prostředí dodecylsírany sodného (SDS-PAGE, z angl. *sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis*) pro nanášky: 2,5 μg ; 5 μg ; 7,5 μg proteinu na gel. Takto připravený vzorek byl uložen do $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Bezprostředně před nanesením na gel byl inkubován 30 minut v $37\text{ }^\circ\text{C}$ s 4x vzorkovým pufrem.

4.4 POSTUP PRO PROVEDENÍ ELEKTROFORÉZY

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsírany sodného (SDS-PAGE, z angl. *sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis*) byla prováděna za účelem rozdělení proteinů podle jejich molekulové hmotnosti. Byl připraven stojan na nalévání gelu. Na ledu v kádince byla připravena směs na 12% separační gel (tabulka 3, str. 31) a nalita pomocí pipety mezi skla. Následně byla vrstva separačního gelu převrstvena destilovanou vodou. Gel byl ponechán 1 hodinu ztuhnout při laboratorní teplotě. Na ztuhlý separační gel byl nanesen 4% zaostřovací gel (tabulka 4, str. 31) a vložen hřeben a ponechán 30 minut ztuhnout.

Tabulka 3: **Složení 12% separačního gelu.**

12% separační gel, množství pro 2 gely	Objem
ddH ₂ O	4,215 ml
Gelový pufr	3,3 ml
49,5% Akrylamid	2,4 ml
10% APS	50 µl
Temed	5 µl

Tabulka 4: **Složení 4% zaostřovacího gelu.**

4% separační gel, množství pro 2 gely	Objem
ddH ₂ O	5,8 ml
Gelový pufr	3,3 ml
49,5% Akrylamid	0,8 ml
10% APS	120 µl
Temed	12 µl

Byla sestavena aparatura pro vertikální elektroforézu se zatuhnutými gely a hřebenem. Do aparatury byl nalit katodový pufr mezi skla a anodový pufr do elektroforetické vany. Hřeben byl opatrně odstraněn, jamky pod proudem promyty katodovým puffrem pomocí stříkačky a jehly. Do jamek bylo nanášeno 5 µl standardu molekulových hmotností (See blue Prestained protein marker). Následně byly do dalších jamek nanášeny připravené vzorky. Množství proteinu v každé jamce bylo 2,5 µg, 5 µg, nebo 7,5 µg. Aparatura byla uzavřena víkem a připojena ke zdroji. Zdroj byl po dobu 30 minut nastaven na 40 V. Po zaostření vzorků na hraně separačního gelu bylo napětí zvýšeno na 90 V a ponecháno separaci po dobu 1,5 hodiny. Po vyjetí modrého čela byl zdroj vypnut a elektroforéza rozebrána. Pomocí páky byl vyjmut gel ze skel a

označena orientace na levém dolním rohu. Následně byla provedena metoda western blotu.

4.5 WESTERN BLOT

Po dokončení separace pomocí SDS-PAGE byl gel vyjmut, uvolněno krycí sklo, odstraněn 4% zaostřovací gel a v levém dolním rohu byl oříznut kousek gelu, kvůli orientaci. Gel byl ekvilibrován v transferovém pufru po dobu 30 minut na 3D míchačce. Podle velikosti gelu byla nastříhána polyvinylidendifluoridová (PVDF) membrána a 6x Whatmanův papír. PVDF membrána byla aktivována po dobu 15 sekund ve 100 % methanolu, následně byla inkubována 5 minut v destilované vodě a poté ekvilibrována 15 minut v transferovém pufru.

Následně na katodě blotu byl sendvič sestaven tak, že (od spoda nahoru) byl navrstven 3x Whatmanův papír, membrána, gel a opět 3x Whatmanův papír. Každá vrstva sendviče (mimo gel) byla uválena, tak aby mezi jednotlivými vrstvami nezůstaly vzduchové bubliny, a po uválení sendviče, byl sendvič pokapán cca 5 ml transferového pufru. Přebytný transferový pufr byl odsán kapátkem. Elektrody byly zamčeny, vloženy do přístroje a 7 minut blotovány pomocí semi-dry western blot – trans turbo blot, 1,3 A. Po skončení programu byla aparatura a blotovací sendvič rozebrány. Byla označena orientace PVDF membrány ustřížením levého horního rohu a ponechána důkladně vyschnout stranou s proteiny orientované nahoru (přes noc při laboratorní teplotě). Pro kontrolu kvality přenosu byl gel inkubován v barvicím roztoku přes noc na 3D třepačce a následně odbarven odbarvovacím roztokem. Po dostatečném odbarvení byl gel opláchnut 10 minut v destilované vodě a sušen na sušičce gelů 1,5 hodiny při 90 °C.

4.6 IMUNODETEKCE

Usušená PVDF membrána s proteiny byla po dobu 15 sekund aktivována v methanolu. Membrána byla poté ponořena do destilované vody. Destilovaná voda byla odlita a k membráně byl přidán roztok 1x trisma fosfátovém pufru (TBS, z angl. *trisma base buffer*) a ponechán inkubovat 10 minut. Smícháním odtučněného mléka s 1x TBS byl připraven 5% blokovací roztok mléka v TBS. Membrána byla blokována na

míchače 2 hodiny při laboratorní teplotě. Smícháním odtučněného mléka s 1x trisma fosfátovým pufrům tween (TBST, z angl. *trisma base buffer*) byl připraven 2% roztok mléka s TBST. V tomto roztoku byly ředěny primární protilátky podle tabulky 5. Membrána po blokování byla opláchnuta 3x 10 min v 1x TBS. Po opláchnutí byla membrána ponechána inkubovat v roztoku s primární protilátkou po dobu 2 hodin na 3D míchače při laboratorní teplotě. Byl připraven 2% roztok mléka v TBST sekundární protilátky odpovídající ředění sekundární protilátky podle tabulky 5.

Tabulka 5: Ředění primární a sekundární protilátky jednotlivých značených podjednotek komplexů systému OXPPOS.

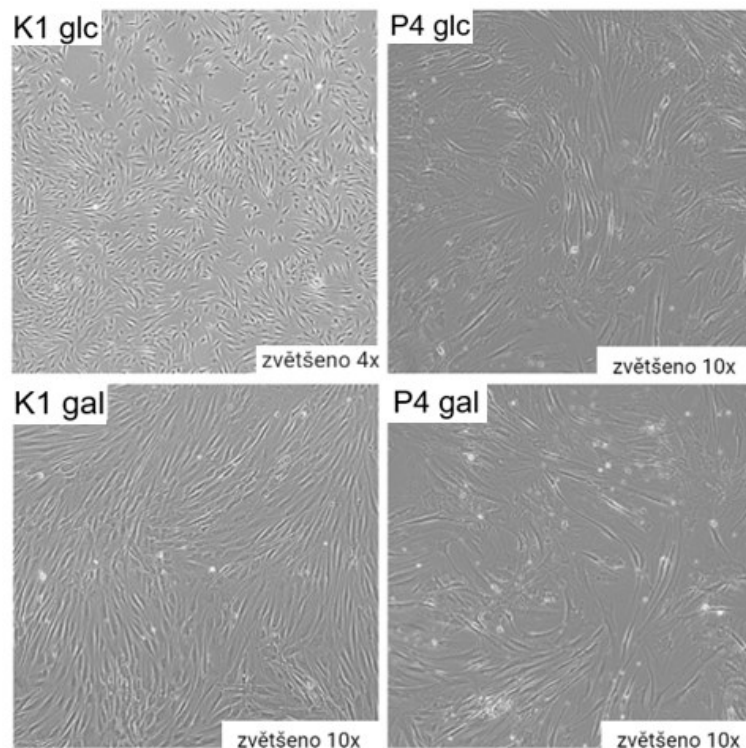
komplex/protilátka	ředění primární protilátky	ředění sekundární protilátky	typ protilátky
KI/anti-NDUFA9	7 : 20000	1 : 2500	myší
KI/anti-MTND5	1 : 2500	1 : 2500	králičí
KII/anti-SDHA	1 : 20000	1 : 2500	myší
KIII/anti-UQCRC2	1 : 20000	1 : 2500	myší
KIII/anti-MTCYB	7 : 20000	1 : 2500	myší
KIV/anti-MTCO2	1 : 4000	1 : 2500	myší
KIV/anti-COX5a	1 : 4000	1 : 2500	myší
KV/anti-ATPB	7 : 20000	1 : 2500	myší
KV/anti-MTATP6	1 : 4000	1 : 2500	myší
anti- β -aktin	1 : 2500	1 : 2500	králičí
anti- α -tubulin	1 : 4000	1 : 2500	králičí

Membrána po skončení inkubace s primární protilátkou byla opláchnuta 3x 10 min v 1x TBST pufru. Následně byla membrána inkubována v roztoku se sekundární protilátkou po dobu 1 hod na 3D míchače při laboratorní teplotě. Po skončení inkubace se sekundární protilátkou byla membrána opláchnuta 3x 10 min v 1x TBST a 1x 10 min v TBS pufru. Na membránu byl nanesen vyvolávací roztok west femto a bylo provedeno vyvolávání na přístroji Syngene. Vyhodnocení intenzity signálu, bylo provedeno pomocí programu Quantity One (BioRad).

5 VÝSLEDKY

5.1 SEZNÁMENÍ SE S PRACÍ V LABORATOŘI TKÁŇOVÝCH KULTUR

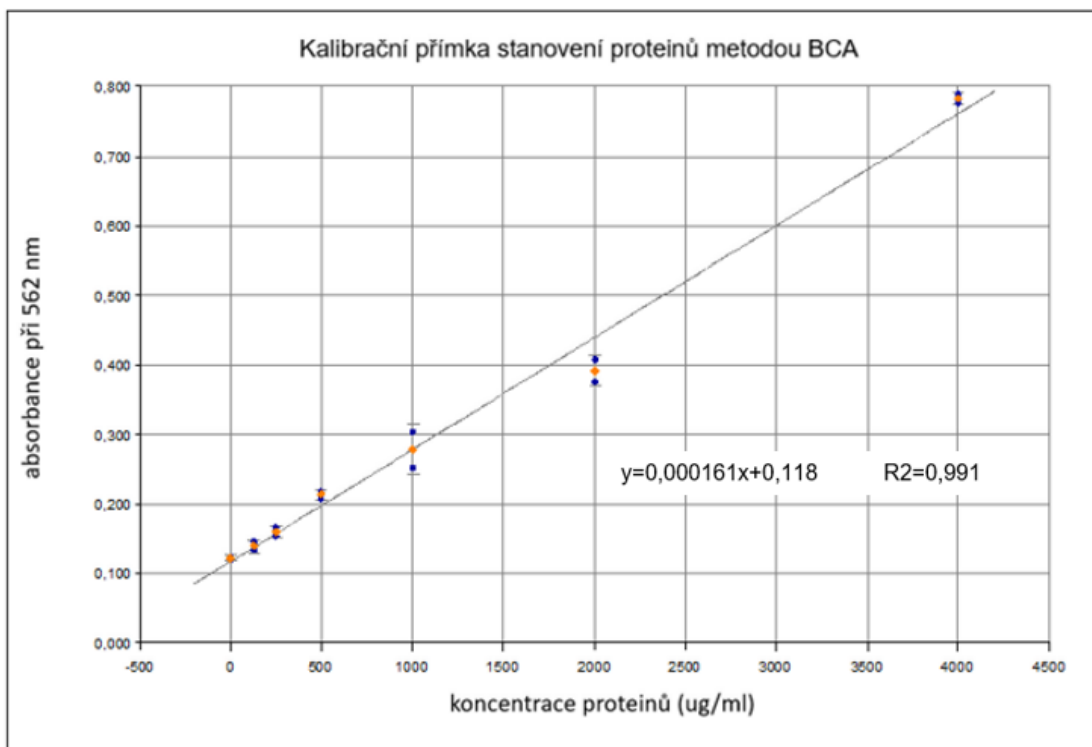
Prvním cílem bakalářské práce bylo seznámení se s prací v laboratoři tkáňových kultur. V rámci přípravy vzorků pro následující experimenty byly pěstovány fibroblasty pěti pacientů a kontrolních linií v glukosovém a galaktosovém médiu. Buňky byly sklizeny při konfluenci přibližně 80 %. Před sklizením byla kultura buněk vyfocena na světelném mikroskopu. Pro zobrazení morfologických odlišností byla vybrána kontrolní buněčná linie fibroblastů K1 a fibroblasty pacienta P4 (obrázek 6, str. 35). Fibroblasty pacienta P4 ve srovnání s kontrolou K1 byly více protáhlé. Ostatních linií patientských fibroblastů vykazovaly podobnou strukturu. Buňky pacientů i kontrol se množovaly v galaktosovém médiu, v porovnání s růstem v glukosovém médiu pomaleji. Největší časová náročnost kultivace fibroblastů byla pozorována u pacienta P4 v glukosovém i galaktosovém médiu. Celkem bylo pro potřeby bakalářské práce napěstováno třicet dva 75 cm² kultivačních lahví, které byly sklizeny do pelet a použity pro následné experimenty.



Obrázek 6: Zobrazení kultivovaných kožních fibroblastů od pacienta P4 a kontroly K1 ve fázovém rozhraní (Mikroskop Eclipse Ti2). Fotografie znázorňuje tvar a množství kultivovaných kožních fibroblastů kontroly K1 a pacienta P4 v glukosovém (glc) a galaktosovém (gal) médiu před sklizením. Fibroblasty P4 ve srovnání s K1 byly více protáhlé.

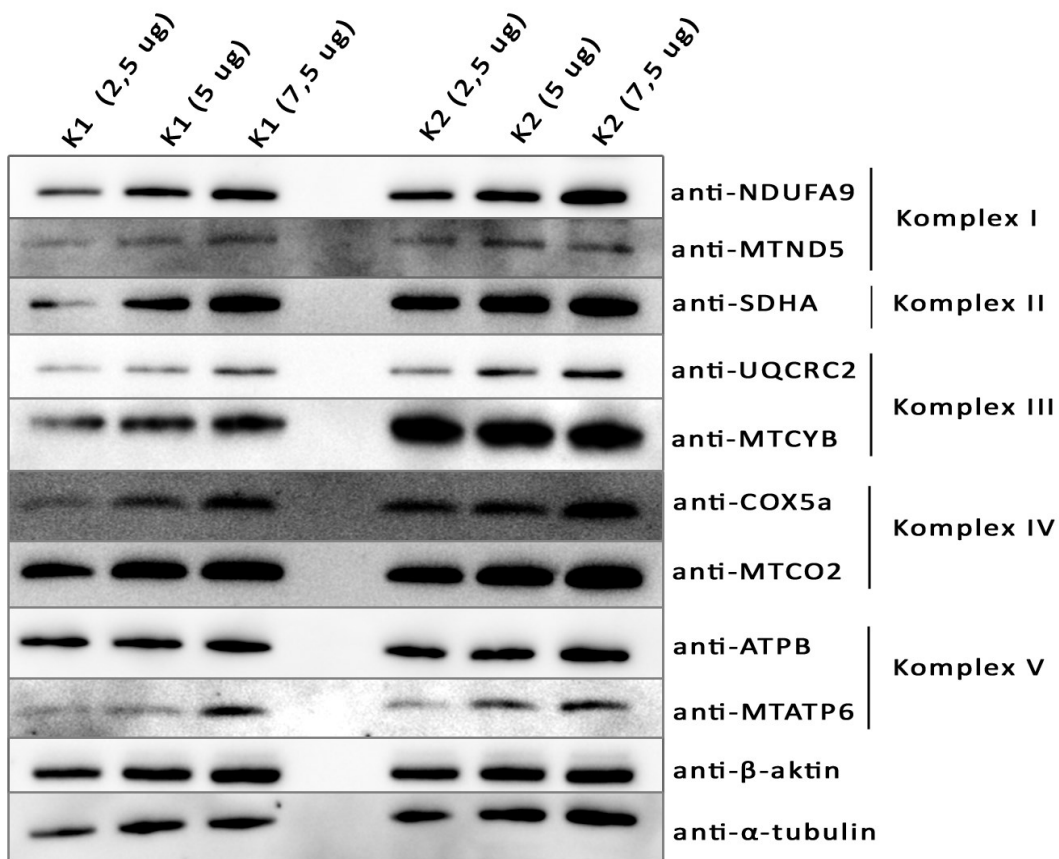
5.2 OPTIMALIZACE PODMÍNEK ANALÝZY ROVNOVÁŽNÉHO MNOŽSTVÍ PODJEDNOTEK KOMPLEXŮ SYSTÉMU OXIDAČNÍ FOSFORYLACE

V rámci druhého cíle bakalářské práce byly optimalizovány podmínky SDS-PAGE elektroforézy, western blotu a imunodetekce pro stanovení rovnovážného množství vybraných podjednotek komplexů systému OXPHOS. Bylo analyzováno množství podjednotek komplexu KI (NDUFA9, MTND5), KII (SDHA), KIII (UQCRC2, MTCYB), KIV (COX5a, MTCO2) a KV (ATPB, MTATP6). Jako kontrola správné nanášky byly značeny β -aktin a α -tubulin (cytoskeletární proteiny). Pomocí metody BCA byla stanovena kalibrační přímka (obrázek 7, str. 36). Z rovnice předpisu regresní přímky (obrázek 7, str 36) byla pak vypočtena koncentrace proteinů ve vzorcích lyzátů kožních fibroblastů kontroly K1 a K2 pěstovaných v glukosovém médiu.



Obrázek 7: **Kalibrační přímka stanovení koncentrace proteinů metodou BCA.** Graf závislosti absorbance na koncentraci BSA. Rovnice znázorňuje předpis regresní přímky. Hodnota R2 značí míru spolehlivosti výsledku.

Podle koncentrace byl vypočítán objem nanesený na gel, aby množství naneseného proteinu odpovídalo 2,5 µg, 5 µg a 7,5 µg. K zaostření jednotlivých nanášek byl zvolen 4% zaostřovací gel. Separace proteinů metodou SDS-PAGE byla provedena v 12 % separačním gelu. Elektroforéza probíhala při napětí 40 V 30 minut a 90 V 90 minut. Pro přenos proteinů z gelu na PVDF membránu byl použit semidry western blot pomocí přístroje Transturbo blot. Čas přenosu byl 7 minut a velikost elektrického proudu byla zvolena 1,3 A/cm². Pro imunodetekci jednotlivých podjednotek komplexů OXPHOS a kontrolních proteinů bylo použito ředění protilátek popsané v tabulce 5 na straně 33. Obrázek 8 představuje detekci rovnovážného množství vybraných podjednotek komplexů systému OXPHOS v kontrolních fibroblastech K1 a K2 kultivovaných v glukosovém médiu při různých množstvích proteinu naneseného na gel (2,5 µg, 5 µg a 7 µg). Jako optimální množství nanášky bylo pro další experimenty zvoleno množství 7,5 µg proteinu. Linearita signálu jednotlivých protilátek byla splněna v dostatečném dobré kvalitě. Protože obě kontroly K1 i K2 byly neonatálního původu pro následující analýzy byla zvolena jen kontrola K1.



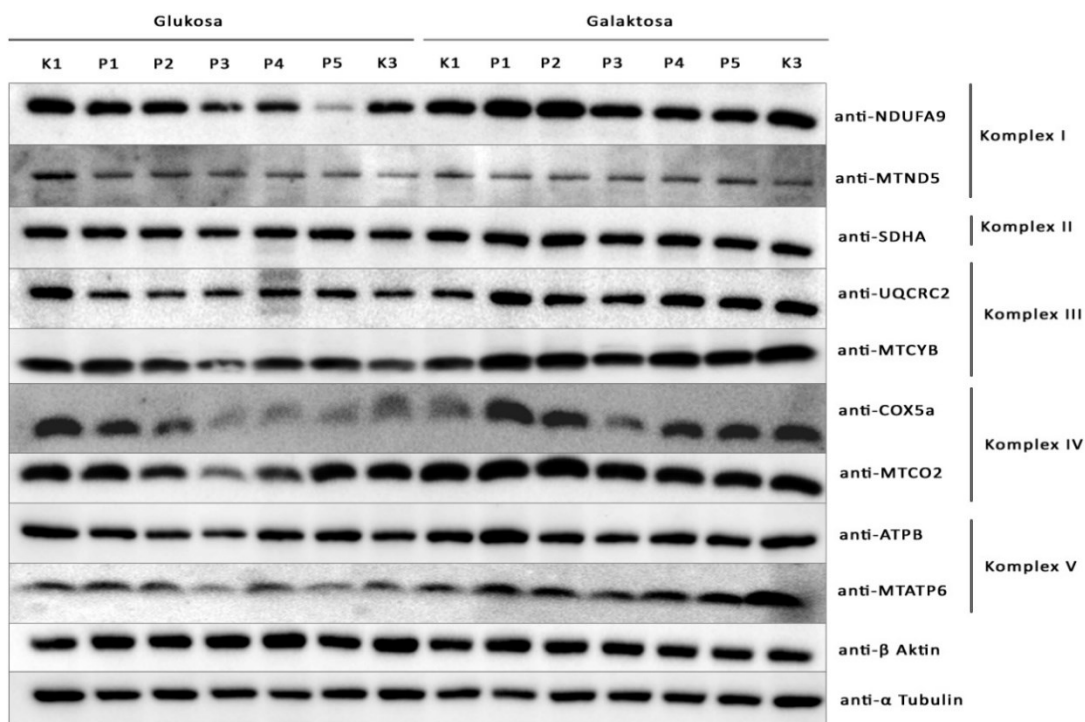
Obrázek 8: Analýza rovnovážného množství vybraných podjednotek komplexů systému OXPHOS v kontrolních fibroblastech K1 a K2 kultivovaných v glukosovém médiu. Separace proteinů byla provedena metodou SDS-PAGE v 12 % gelu následovaná western blotem a imunodetekcí se specifickými protilátkami. Vizualizace byla provedena viz. metodika kapitola 4.6.

5.3 STANOVENÍ ROVNOVÁŽNÉHO MNOŽSTVÍ VYBRANÝCH PODJEDNOTEK KOMPLEXŮ OXPHOS U PACIENTŮ S PORUCHOU AMINOACYL-tRNASYNTHETAS

Třetím cílem bakalářské práce bylo stanovení rovnovážného množství vybraných podjednotek komplexů systému OXPHOS pomocí metody SDS-PAGE (obrázek 9, str. 38) u pěti linií kožních fibroblastů s poruchou mitochondriálních aminoacyl-tRNAsynthetas (*AARS2*, *DARS2*, *NARS2*, *SARS2*) kultivovaných v médiích obsahující jako zdroj sacharidů galaktosu nebo glukosu. Ve vzorcích lyzátů fibroblastů pacientů P(1-5) a kontrol K1 a K3 v kultivovaných v glukosovém a galaktosovém mediu byla z rovnice regresní přímky (obrázek 7, str. 36)

vypočteny koncentrace proteinů. Množství proteinu naneseného na gel bylo u všech vzorků 7,5 µg.

V předešlém cíli bakalářské práce byl optimalizován postup SDS-PAGE, který byl použit i v tomto experimentu. Jako kontroly byly zvoleny linie fibroblastů od komerčně dostupné zdravé neonatální kontroly (K1) a linie fibroblastů získaná od dospělé zdravé ženy (K3). Jako kontrolní proteiny byly využity β -aktin a α -tubulin (obrázek 9, str. 38).



Obrázek 9: Analýza rovnovážného množství vybraných podjednotek komplexů systému OXPHOS u pěti linií kožních fibroblastů pacientů s poruchou mitochondriálních aminoacyl-tRNA-synthetas (*AARS2*, *DARS2*, *NARS2*, *SARS2*) kultivovaných v médiích obsahující jako zdroj sacharidů galaktosu nebo glukosu. Separace proteinů byla provedena metodou SDS-PAGE v 12 % gelu následovaná western blotem a imunodetekcí. Vizualizace byla provedena viz. metodika kapitola 4.6.

Pro vyhodnocení intenzity signálu jednotlivých protilátek byl použit program Quantity One (Bio-Rad). Intenzita signálu byla vztažena na intenzitu signálu anti- α -tubulinu. Tato hodnota pak byla vyjádřena jako procento ve vztahu k 100 % kontroly K1 pěstované v glukose nebo galaktose (tabulka 6 str. 40). Data byla vynesena do tabulky a vizualizována v podmíněném formátování.

Z hodnot z tabulky 6 vyplývá, že při kultivaci v glukosovém mediu dochází u pacientů P3, P4 a P5 k redukcí množství podjednotky komplexu I (NDUFA9) a u pacienta P5 i podjednotky MTND5. U pacientů P1, P2 a P3 pak bylo pozorováno mírné snížení množství podjednotky komplexu III (UQCRC2). U pacienta P3 byla detekována mírná redukce množství podjednotek komplexu IV (MTCO2) a komplexu V (MTATP6). Množství ostatních podjednotek u pacientů při kultivaci v glukosovém mediu bylo v normě, nebo naopak navýšeno. Z kvantifikace také vyplývá, že dochází ke snížení množství podjednotek komplexu I (NDUFA9, MTND5) a komplexu III (UQCRC2) u kontroly K3 ve srovnání s kontrolou K1 při pěstování v glukosovém mediu.

Pokud byla v médiu, jako zdroj sacharidů, použita galaktosa je patrné, že nedochází k takové redukcí podjednotek komplexů systému OXPHOS u pacientů s poruchou mitochondriálních aminoacyl-tRNAsynthetas, jako jsme pozorovali při pěstování v glukosovém mediu. Při srovnání s kontrolou K1 bylo detekováno pouze mírné snížení množství podjednotky komplexu V (ATPB) u pacienta P3 a podjednotky komplexu I (NDUFA9) a komplexu III (MTCYB) u pacienta P5. Trend upregulace množství téměř všech sledovaných podjednotek komplexů OXPHOS byl pozorován u pacienta P1. Je patrné, že při kultivaci v tomto mediu už není rozdíl mezi kontrolou K1 a K3 tak výrazný a dochází pouze k mírné redukcí množství podjednotek komplexu II (SDHA) a podjednotky komplexu III (MTCYTB).

Tabulka 6: **Relativní intenzita signálu jednotlivých protilátek vztažena na intenzitu signálu anti- α -tubulinu vyjádřena jako 100% kontroly K1 v glukosovém nebo galaktosovém mediu.** Linie kožních fibroblastů pacientů (P1-5) s poruchou mitochondriálních aminoacyl-tRNAsynthetas (*AARS2*, *DARS2*, *NARS2*, *SARS2*) a kontrol K1 a K3 kultivovaných v médiích obsahující jako zdroj sacharidů galaktosu nebo glukosu byly analyzovány metodou SDS-PAGE v 12 % gelu následovaná western blotem a imunodetekcí.

	glukosové médium							galaktosové médium						
	K1	P1	P2	P3	P4	P5	K3	K1	P1	P2	P3	P4	P5	K3
anti-NDUFA9/anti- α tubulin (%)	100,0	99,6	90,6	47,4	65,6	19,0	73,7	100,0	137,0	119,5	95,1	81,5	75,9	85,0
anti-MTND5/anti- α -tubulin (%)	100,0	103,7	112,4	103,1	95,9	70,6	40,0	100,0	92,1	94,1	109,3	121,9	139,9	137,7
anti-SDHA/anti- α tubulin (%)	100,0	120,2	89,9	88,2	134,7	95,2	80,6	100,0	122,6	102,6	97,2	103,4	93,3	73,3
anti-UQCRC2/anti- α tubulin (%)	100,0	78,2	63,8	74,4	123,0	90,0	72,7	100,0	145,9	120,6	114,2	135,1	152,6	178,9
anti-MTCYB/anti- α tubulin (%)	100,0	134,4	108,4	83,8	127,6	117,5	87,0	100,0	111,2	98,3	90,2	85,0	77,7	72,2
anti-COX5a/anti- α tubulin (%)	100,0	138,0	113,2	84,4	146,7	104,0	109,7	100,0	153,8	112,7	110,8	136,7	125,6	112,3
anti-MTCO2/anti- α tubulin (%)	100,0	121,6	91,8	61,8	106,2	122,9	114,0	100,0	145,9	124,9	108,2	125,5	121,1	115,6
anti-ATPB/anti- α tubulin (%)	100,0	97,1	79,2	72,2	110,3	103,7	85,0	100,0	125,7	82,9	74,0	89,1	82,7	86,5
anti-MTATP6/anti- α tubulin (%)	100,0	141,8	116,8	86,0	155,6	107,1	116,9	100,0	149,4	124,0	116,4	139,3	143,4	163,7
anti- β -aktin/anti- α tubulin (%)	100,0	144,0	134,6	145,0	178,2	132,4	148,5	100,0	125,1	100,6	100,4	90,6	89,1	79,9

Následně bylo srovnáno množství vybraných podjednotek komplexů OXPPOS u kontrol K1 a K3 při kultivaci v glukosovém a galaktosovém mediu. Intenzita signálu jednotlivých protilátek byla vztažena na intenzitu signálu anti- α -tubulinu. Tato hodnota pak byla vyjádřena jako procento ve vztahu k 100 % příslušné kontroly pěstované v glukose (tabulka 7). Data byla vynesena do tabulky a vizualizována v podmíněném formátování (tabulka 7). Z analýzy vyplývá, že kromě podjednotky komplexu I (MTND5) došlo k navýšení množství všech ostatních sledovaných podjednotek v galaktosovém při srovnání s glukosovým médiem. U kontroly K3 je toto navýšení ještě patrnější zejména pak u podjednotky komplexu I (MTND5), komplexu III (UQCRC2) a komplexu V (MTATP6).

Tabulka 7: **Relativní intenzita signálu jednotlivých protilátek vztažena na intenzitu signálu anti- α -tubulinu vyjádřena jako 100% kontroly K1 v glukosovém nebo galaktosovém mediu.** Linie kožních fibroblastů kontrol K1 a K3 kultivovaných v médiích obsahující jako zdroj sacharidů galaktosu (gal) nebo glukosu (glc) byly analyzovány metodou SDS-PAGE v 12 % gelu následovaná western blotem a imunodetekcí.

	K1 (glc)	K1 (gal)	K3 (glc)	K3 (gal)
anti-NDUFA9 / anti- α tubulin (%)	100,0	125,5	100,0	144,6855
anti-MTND5 / anti- α -tubulin (%)	100,0	73,2	100,0	251,935
anti-SDHA / anti- α tubulin (%)	100,0	128,4	100,0	97,41293
anti-UQCRC2 / anti- α tubulin (%)	100,0	109,5	100,0	269,4233
anti-MTCYB / anti- α tubulin (%)	100,0	173,7	100,0	144,0994
anti-COX5a / anti- α tubulin (%)	100,0	121,8	100,0	124,7104
anti-MTCO2 / anti- α tubulin (%)	100,0	110,1	100,0	111,711
anti-ATPB / anti- α tubulin (%)	100,0	119,6	100,0	121,8107
anti-MTATP6 / anti- α tubulin (%)	100,0	150,4	100,0	210,5832
anti- β -aktin / anti- α tubulin (%)	100,0	134,8	100,0	72,57362

6 DISKUZE

V rámci bakalářské práce byly kultivovány kožní fibroblasty kontrol a pacientů s poruchou aminoacyl-tRNAsynthetas v glukosovém a galaktosovém médiu. V předchozí studentské práci z Laboratoře pro studium mitochondriálních poruch byl optimalizován postup pro pěstování buněk v galaktosovém médiu (Kedrová 2014). Tento postup byl aplikován i při kultivaci fibroblastů našich pacientů. V minulosti byla metoda pěstování patientských buněk v galaktosové médiu využívána při diagnostice mitochondriálních onemocnění. Patientské buňky s poruchou pyruvátdehydrogenasového komplexu, komplexu I a komplexu IV při kultivaci v galaktosovém mediu ztrácí viabilní schopnosti (Robinson a kol. 1992). V případě našich kultivací nebyl tento jev pozorován.

Druhý cíl bakalářské práce byl zaměřen na optimalizaci podmínek pro analýzu rovnovážného množství vybraných podjednotek komplexů systému OXPHOS. V rámci bakalářské práce byla sledována vždy jedna podjednotka z komplexu OXPHOS kódována jaderně a jedna podjednotka kódována mtDNA. U komplexu I byly analyzovány podjednotky NDUFA9 a MTND5. NDUFA9 je jaderně kódovaná podjednotka se strukturální a stabilizační funkcí pro komplex I (Guerrero-Castillo a kol. 2017). Mitochondriálně kódovaná podjednotka MTND5 je součástí kanálu, kterým procházejí H^+ z matrix do mezimembránového prostoru (Kampjut a Sazanov 2020). Z důvodu toho, že žádná z podjednotek komplexu II není kódována mtDNA, byla značena pouze jedna podjednotka SDHA, která společně s podjednotkou SDHB kovalentně váže FAD, které je akceptorem elektronů. Jaderně kódovaná podjednotka UQCRC2 má strukturální funkci a hraje roli při sestavení komplexu III do svého nativního uspořádání (Vercellino a Sazanov 2022). Mitochondriálně kódovaný cytochrom b (MTCYB) (Xia a kol. 2013) je prostetickou skupinou komplexu III a přenáší elektrony z ubichinolu na cytochrom c (Trumpower a Gennis 1994). Mitochondriálně kódovaná podjednotka komplexu IV, MTCO2 obsahuje v centru měď sloužící jako akceptor elektronů z cytochromu c (Shinzawa-Itoh a kol. 2007). Jaderně kódovaná podjednotka COX5A má strukturální funkci a hraje roli při biogenezi komplexu IV (Vercellino a Sazanov 2022). Jaderně kódovaná podjednotka ATPB a mitochondriálně kódovaná podjednotka MTATP6 (Anderson a kol. 1981), jsou součástí katalytické části komplexu V, která slouží pro fosforylaci ADP za vzniku ATP (Abbas a kol. 2020).

Třetím cílem bakalářské práce bylo stanovení rovnovážného množství vybraných podjednotek komplexů systému OXPHOS v pěti liniích kožních fibroblastů s poruchou mitochondriálních aminoacyl-tRNAsynthetas (*AARS2*, *DARS2*, *NARS2*, *SARS2*) v médiích obsahující jako zdroj sacharidů galaktosu, nebo glukosu. Mutace mitochondriálních aaRS mohou vést k celkovému zhoršení rozpoznávání své specifické aminokyseliny, ATP nebo své tRNA, v důsledku toho může docházet k promiskuitě tohoto enzymu, nebo k úplné ztrátě katalytické funkce jako takové (Sissler a kol. 2017). Z toho důvodu podjednotky syntetizované mitochondriálním proteosyntetickým aparátem mohou mít narušenou strukturu. Z kvantifikace signálu jednotlivých protilátek lze pozorovat u našich pacientů jak navýšení, tak i úbytek množství podjednotek komplexů systému OXPHOS v glukosovém médiu ve srovnání s kontrolou pěstované v glukosovém mediu. Při pěstování v galaktosovém mediu se očekávalo prohloubení deficitů vybraných podjednotek komplexů systému OXPHOS, z toho důvodu, že energetický výtěžek galaktosy je nižší, než u glukosy (Holden a kol. 2003). Ovšem naopak bylo detekováno výraznější navýšení a do určité míry i vymizení deficitů jednotlivých podjednotek komplexů systému OXPHOS vzhledem ke kontrole kultivované v galaktosovém mediu. Toto zjištění je například v rozporu s prací autorů z roku 2013, kdy pacient s poruchou threonyl-tRNAsynthetasy měl při pěstování v galaktose sníženou respiraci, zatímco při pěstování v glukosovém médiu byla respirace srovnatelná s kontrolou (Diodato a kol. 2014). Snížení množství podjednotek ve fibroblastech kultivovaných v glukosovém médiu lze vysvětlit tím, že přestože buňka má defekt v energetickém metabolismu, je její příjem energie dostatečný, tudíž nemusí být nutné zvýšení exprese podjednotek. Jakmile má buňka jako zdroj energie galaktosu, dochází k prohloubení energetické nedostatečnosti a navýšení exprese podjednotek. Dalším možným vysvětlením je celkové zmnožení mitochondriální masy při pěstování v galaktosovém médiu a tudíž i navýšení množství jednotlivých podjednotek, aby byly kompenzovány energetické ztráty, které mohou být důsledkem snížené afinity a funkčnosti enzymu.

Z našich zjištění vyplývá, že pravděpodobně u našich pacientů není defekt aminoacyl-tRNAsynthetas pozorovatelný na úrovni kožních fibroblastů. Pro ověření dopadu jednotlivých variant je potřeba doplnit funkční analýzy jako je například spektrofotometrické stanovení aktivit komplexů dýchacího řetězce nebo analýzy

nativního množství jednotlivých komplexů OXPHOS metodou modré nativní elektroforézy.

Jako kontrolní materiál byly zvoleny fibroblasty od jedinců různého věku. Jedna kontrola představovala neonatální linii kožních fibroblastů a druhá byla linie fibroblastů od zdravé dospělé ženy. Bohužel je velmi obtížné získat zdravou dětskou kontrolu batolecího, nebo předškolního věku, která by nejlépe vyhovovala jako věkově kompatibilní k našim pacientům. Proto jsme zvolili danou kombinaci. Z výsledků vyplývá, že pro naši patientskou skupinu je lepší použití neonatální kontroly. Z analýzy je patrné, že dochází ke snížení množství podjednotek komplexů systému OXPHOS (NDUFA9, MTND5, UQCRC2) u kontroly K3 ve srovnání s kontrolou K1 při pěstování v glukosovém mediu. To může poukazovat na rozdílnou expresi podjednotek komplexů I, II a IV dýchacího řetězce během života. Podle studie z roku 2020 dochází k nárůstu proteinové exprese jednotlivých podjednotek OXPHOS systému od dětství do 20. až 59. roku života, přičemž následně dochází k postupnému úbytku (Özsoy a kol. 2020). Proto je nutné ke všem analýzám vždy zvolit věkově vhodnou kontrolu.

7 ZÁVĚR

- Fibroblasty pacientů i kontrolních buněčných linií byly úspěšně kultivovány v glukosovém i galaktosovém médiu. Podle očekávání byla kultivace v galaktosovém médiu obtížnější, jelikož došlo k zvýšenému energetickému stresu ve fibroblastech a zpomalenému růstu.
- Byly optimalizovány podmínky pro stanovení rovnovážného množství vybraných podjednotek komplexů systému OXPHOS pomocí SDS-PAGE, western blotu a následné imunodetekce se specifickými protilátkami.
- Kultivované kožní fibroblasty pacientů s poruchou mt-aaRS vykazovaly snížení hladin vybraných podjednotek komplexů systému OXPHOS při kultivaci v glukosovém médiu. V galaktosovém médiu tato redukce nebyla pozorována. Hladina jednotlivých podjednotek byla vždy vztažena ke kontrole kultivované v příslušném médiu.
- Byla prokázána nutnost použití věkově kompatibilní kontroly se skupinou pacientů.
- Všechny vytyčené cíle bakalářské práce byly splněny.

8 POUŽITÁ LITERATURA

- Abbas, Y.M.; Wu, D.; Bueler, S.A.; Robinson, C.V.; Rubinstein, J.L.: Structure of V-ATPase from the mammalian brain. *Science* 367, 1240–1246 (2020).
- Akaike, T.; Ida, T.; Wei, F.-Y.; Nishida, M.; Kumagai, Y.; Alam, M.M.; Ihara, H.; Sawa, T.; Matsunaga, T.; Kasamatsu, S.; Nishimura, Akiyuki, Morita, M.; Tomizawa, K.; Nishimura, Akira, Watanabe, S.; Inaba, K.; Shima, H.; Tanuma, N.; Jung, M.; Fujii, S.; Watanabe, Y.; Ohmuraya, M.; Nagy, P.; Feelisch, M.; Fukuto, J.M.; Motohashi, H.: Cysteinyl-tRNA synthetase governs cysteine polysulfidation and mitochondrial bioenergetics. *Nat. Commun.* 8, 1177 (2017).
- Anderson, S.; Bankier, A.T.; Barrell, B.G.; de Bruijn, M.H.L.; Coulson, A.R.; Drouin, J.; Eperon, I.C.; Nierlich, D.P.; Roe, B.A.; Sanger, F.; Schreier, P.H.; Smith, A.J.H.; Staden, R.; Young, I.G.: Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290, 457–465 (1981).
- Andrews, B.; Carroll, J.; Ding, S.; Fearnley, I.M.; Walker, J.E.: Assembly factors for the membrane arm of human complex I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 18934–18939 (2013).
- Banerjee, R.; Chen, S.; Dare, K.; Gilreath, M.; Praetorius-Ibba, M.; Raina, M.; Reynolds, N.M.; Rogers, T.; Roy, H.; Yadavalli, S.S.; Ibba, M.: tRNAs: Cellular barcodes for amino acids. *FEBS Lett.* 584, 387–395 (2010).
- Bausewein, T.; Mills, D.J.; Langer, J.D.; Nitschke, B.; Nussberger, S.; Kühlbrandt, W.: Cryo-EM Structure of the TOM Core Complex from *Neurospora crassa*. *Cell* 170, 693–700 (2017).
- Bonawitz, N.D.; Clayton, D.A.; Shadel, G.S.: Initiation and beyond: multiple functions of the human mitochondrial transcription machinery. *Mol. Cell* 24, 813–825 (2006).
- Bonnefond, L.; Fender, A.; Rudinger-Thirion, J.; Giegé, R.; Florentz, C.; Sissler, M.: Toward the full set of human mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetases: characterization of AspRS and TyrRS. *Biochemistry* 44, 4805–4816 (2005).
- Borst, P.: Mitochondrial nucleic acids. *Annu. Rev. Biochem.* 41, 333–376 (1972).
- Boyer, P.D.: The ATP synthase—a splendid molecular machine. *Annu. Rev. Biochem.* 66, 717–749 (1997).

- Burger, G.; Gray, M.; Lang, B.: Mitochondrial genomes: anything goes. *Trends Genet.* 19, 709-716 (2004).
- Cerritelli, S.M.; Frolova, E.G.; Feng, C.; Grinberg, A.; Love, P.E.; Crouch, R.J.: Failure to produce mitochondrial DNA results in embryonic lethality in Rnaseh1 null mice. *Mol. Cell* 11, 807–815 (2003).
- Chan, D.C.: Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22, 79–99 (2006).
- Chang, D.D.; Clayton, D.A.: Priming of human mitochondrial DNA replication occurs at the light-strand promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 351–355 (1985).
- Chen, H.; Chan, D.C.: Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission. *Hum. Mol. Genet.* 14, 283–289 (2005).
- Crews, S.; Ojala, D.; Posakony, J.; Nishiguchi, J.; Attardi, G.: Nucleotide sequence of a region of human mitochondrial DNA containing the precisely identified origin of replication. *Nature* 277, 192–198 (1979).
- Delarue, M.: Aminoacyl-tRNA synthetases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5, 48–55 (1995).
- Diodato, D.; Melchionda, L.; Haack, T.B.; Dallabona, C.; Baruffini, E.; Donnini, C.; Granata, T.; Ragona, F.; Balestri, P.; Margollicci, M.; Lamantea, E.; Nasca, A.; Powell, C.A.; Minczuk, M.; Strom, T.M.; Meitinger, T.; Prokisch, H.; Lamperti, C.; Zeviani, M.; Ghezzi, D.: VARS2 and TARS2 mutations in patients with mitochondrial encephalomyopathies. *Hum. Mutat.* 35, 983–989 (2014).
- Echevarría, L.; Clemente, P.; Hernández-Sierra, R.; Gallardo, M.E.; Fernández-Moreno, M.A.; Garesse, R.: Glutamyl-tRNAGln amidotransferase is essential for mammalian mitochondrial translation in vivo. *Biochem. J.* 460, 91–101 (2014).
- Ganesh, R.B., Maerkl, S.J., 2022. Biochemistry of Aminoacyl tRNA Synthetase and tRNAs and Their Engineering for Cell-Free and Synthetic Cell Applications. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 10 (2022).
- Garin, S.; Levi, O.; Cohen, B.; Golani-Armon, A.; Arava, Y.S.: Localization and RNA Binding of Mitochondrial Aminoacyl tRNA Synthetases. *Genes* 11, 1185 (2020).

- Garone, C.; Minczuk, M.; Signes, A.; Fernandez-Vizarra, E.: Assembly of mammalian oxidative phosphorylation complexes I–V and supercomplexes. *Essays Biochem.* 62, 255–270 (2018).
- Gaur, R.; Grasso, D.; Datta, P.P.; Krishna, P.D.V.; Das, G.; Spencer, A.; Agrawal, R.K.; Spremulli, L.; Varshney, U.: A single mammalian mitochondrial translation initiation factor functionally replaces two bacterial factors. *Mol. Cell* 29, 180–190 (2008).
- Giles, R.E.; Blanc, H.; Cann, H.M.; Wallace, D.C.: Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77, 6715–6719 (1980).
- Gray, M.W.: The endosymbiont hypothesis revisited. *Int. Rev. Cytol.* 141, 233–357 (1992).
- Greber, B.J.; Bieri, P.; Leibundgut, M.; Leitner, A.; Aebersold, R.; Boehringer, D.; Ban, N.: The complete structure of the 55S mammalian mitochondrial ribosome. *Science* 348, 303–308 (2015).
- Guerrero-Castillo, S.; Baertling, F.; Kownatzki, D.; Wessels, H.J.; Arnold, S.; Brandt, U.; Nijtmans, L.: The Assembly Pathway of Mitochondrial Respiratory Chain Complex I. *Cell Metab.* 25, 128–139 (2017).
- Hägerhäll, C.: Succinate: quinone oxidoreductases. Variations on a conserved theme. *Biochim. Biophys. Acta* 1320, 107–141 (1997).
- Hance, N., Ekstrand, M.I., Trifunovic, A.: Mitochondrial DNA polymerase gamma is essential for mammalian embryogenesis. *Hum. Mol. Genet.* 14, 1775–1783 (2005).
- Hardin, J.: Becker’s world of the cell. 8th edition. Boston, Benjamin Cummings, (2012).
- Holden, H.M.; Rayment, I.; Thoden, J.B.: Structure and Function of Enzymes of the Leloir Pathway for Galactose Metabolism. *J. Biol. Chem.* 278, 43885–43888 (2003).
- Ibba, M.; Söll, D.: Aminoacyl-tRNA Synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 617–650 (2000).
- Kampjut, D.; Sazanov, L.A.: The coupling mechanism of mammalian respiratory complex I. *Science* 370, 4209 (2020).

- Kedrová, Kateřina: Dopad izolovaného deficitu F1FO-ATP syntázy na ostatní komplexy oxidační fosforylace v kožních fibroblastech v závislosti na podmínkách kultivace. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra biochemie. Vedoucí práce Stiborová, Marie. Praha, (2014).
- Larsen, N.; Rasmussen, M.; Rasmussen, L.: Nuclear and mitochondrial DNA repair: Similar pathways? *Mitochondrion* 5, 89–108 (2005).
- Lee, J.W.; Chan, M.; Law, T.V.; Kwon, H.J.; Jap, B.K.: Preliminary cryocrystallographic study of the mitochondrial cytochrome bc₁ complex: improved crystallization and flash-cooling of a large membrane protein. *J. Mol. Biol.* 252, 15–19 (1995).
- Letts, J.A.; Sazanov, L.A.: Gaining mass: the structure of respiratory complex I- from bacterial towards mitochondrial versions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 33, 135–145 (2015).
- Li, R.; Macnamara, L.M.; Leuchter, J.D.; Alexander, R.W.; Cho, S.S.: MD Simulations of tRNA and Aminoacyl-tRNA Synthetases: Dynamics, Folding, Binding, and Allostery. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 15872–15902 (2015).
- Margulis, L.: Archaeal-eubacterial mergers in the origin of Eukarya: phylogenetic classification of life. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 1071–1076 (1996).
- McClain, W.H., Foss, K., 1988. Changing the identity of a tRNA by introducing a G-U wobble pair near the 3' acceptor end. *Science* 240, 793–796 (1988).
- Mossmann, D.; Meisinger, C.; Vögtle, F.-N.: Processing of mitochondrial presequences. *Biochim. Biophys. Acta* 1819, 1098–1106 (2012).
- Moulinier, L.; Ripp, R.; Castillo, G.; Poch, O.; Sissler, M.: MiSynPat: An integrated knowledge base linking clinical, genetic, and structural data for disease-causing mutations in human mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetases. *Hum. Mutat.* 38, 1316–1324 (2017).
- Nicholls, D., Fergussan, S.: *Bioenergetics*. San Diego, Academic Press (2013).
- Novotný, J.; Ondrušová, L.; Vojtíšková, J.: Transportery sacharidů u člověka. *Klinická biochemie a metabolismus*, 24(4), 156-164 (2016).
- O'Brien, T.W.: The general occurrence of 55 S ribosomes in mammalian liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 246, 3409–3417 (1971).

- Ott, M.; Amunts, A.; Brown, A.: Organization and Regulation of Mitochondrial Protein Synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 85, 77–101 (2016).
- Özsoy, M.; Zimmermann, F.A.; Feichtinger, R.G.; Mayr, J.A.; Kofler, B.; Neureiter, D.; Klieser, E.; Schütz, S.; Weghuber, D.; Schneider, A.M.: Changes in the expression of oxidative phosphorylation complexes in the aging intestinal mucosa. *Exp. Gerontol.* 135, 110924 (2020).
- Picard, M.; Wallace, D.C.; Burrelle, Y.: The rise of mitochondria in medicine. *Mitochondrion* 30, 105–116. (2016).
- Rackham, O.; Filipovska, A.: Organization and expression of the mammalian mitochondrial genome. *Nat. Rev. Genet.* 23, 606–623 (2022).
- Rasheed, M.R.H.A.; Tarjan, G.: Succinate Dehydrogenase Complex: An Updated Review. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 142, 1564–1570 (2018).
- Reid, R.A.; Moyle, J.; Mitchell, P.: Synthesis of adenosine triphosphate by a protonmotive force in rat liver mitochondria. *Nature* 212, 257–258 (1966).
- 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, 122–126 (1992).
- Sagan, L.: On the origin of mitosing cells. *J. Theor. Biol.* 14, 255–274 (1967).
- Scheper, G.C.; van der Klok, T.; van Andel, R.J.; van Berkel, C.G.M.; Sissler, M.; Smet, J.; Muravina, T.I.; Serkov, S.V.; Uziel, G.; Bugiani, M.; Schiffmann, R.; Krägeloh-Mann, I.; Smeitink, J.A.M.; Florentz, C.; Van Coster, R.; Pronk, J.C.; van der Knaap, M.S.: Mitochondrial aspartyl-tRNA synthetase deficiency causes leukoencephalopathy with brain stem and spinal cord involvement and lactate elevation. *Nat. Genet.* 39, 534–539 (2007).
- Sharp, S.J.; Schaack, J.; Cooley, L.; Burke, D.J.; Soil, D.: Structure and Transcription of Eukaryotic tRNA Gene. *Crit. Rev. Biochem.* 19, 107–144 (1985).
- Shiba, K.; Schimmel, P.; Motegi, H.; Noda, T.: Human glycyl-tRNA synthetase. Wide divergence of primary structure from bacterial counterpart and species-specific aminoacylation. *J. Biol. Chem.* 269, 30049–30055 (1994).
- Shinzawa-Itoh, K.; Aoyama, H.; Muramoto, K.; Terada, H.; Kurauchi, T.; Tadehara, Y.; Yamasaki, A.; Sugimura, T.; Kurono, S.; Tsujimoto, K.; Mizushima, T.; Yamashita, E.; Tsukihara, T.; Yoshikawa, S.: Structures and

physiological roles of 13 integral lipids of bovine heart cytochrome c oxidase. *EMBO J.* 26, 1713–1725 (2007).

- Simsek, D.; Furda, A.; Gao, Y.; Artus, J.; Brunet, E.; Hadjantonakis, A.-K.; Van Houten, B.; Shuman, S.; McKinnon, P.J.; Jasin, M.: Crucial role for DNA ligase III in mitochondria but not in Xrcc1-dependent repair. *Nature* 471, 245–248 (2011).
- Sissler, M.; González-Serrano, L.E.; Westhof, E.: Recent Advances in Mitochondrial Aminoacyl-tRNA Synthetases and Disease. *Trends Mol. Med.* 23, 693–708 (2017).
- Smits, P.; Smeitink, J.; van den Heuvel, L.: Mitochondrial Translation and Beyond: Processes Implicated in Combined Oxidative Phosphorylation Deficiencies. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010, (2010).
- Spremulli, L.; Coursey, A.; Navratil, T.; Hunter, S.: Initiation and Elongation Factors in Mammalian Mitochondrial Protein Biosynthesis. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 77, 211–261 (2004).
- Sprinzl, M.; Cramer, F.: The -C-C-A End of tRNA and Its Role in Protein Biosynthesis, in: Cohn, W.E., *Prog. in Nucl. Ac. Res. and Mol. Biol.*, 1–69 (1979).
- Stock, D.; Gibbons, C.; Arechaga, I.; Leslie, A.G.; Walker, J.E.: The rotary mechanism of ATP synthase. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10, 672–679 (2000).
- Szabo, L.; Eckert, A.; Grimm, A.: Insights into Disease-Associated Tau Impact on Mitochondria. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 6344 (2020).
- Tolkunova, E.; Park, H.; Xia, J.; King, M.P.; Davidson, E.: The human lysyl-tRNA synthetase gene encodes both the cytoplasmic and mitochondrial enzymes by means of an unusual alternative splicing of the primary transcript. *J. Biol. Chem.* 275, 35063–35069 (2000).
- Trumpower, B.L.; Gennis, R.B.: Energy transduction by cytochrome complexes in mitochondrial and bacterial respiration: the enzymology of coupling electron transfer reactions to transmembrane proton translocation. *Annu. Rev. Biochem.* 63, 675–716 (1994).
- Tyynismaa, H.; Sembongi, H.; Bokori-Brown, M.; Granycome, C.; Ashley, N.; Poulton, J.; Jalanko, A.; Spelbrink, J.N.; Holt, I.J.; Suomalainen, A.: Twinkle

helicase is essential for mtDNA maintenance and regulates mtDNA copy number. *Hum. Mol. Genet.* 13, 3219–3227 (2004).

- Vercellino, I.; Sazanov, L.A.: The assembly, regulation and function of the mitochondrial respiratory chain. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 23, 141–161 (2022).
- Vögtle, F.-N.; Wortelkamp, S.; Zahedi, R.P.; Becker, D.; Leidhold, C.; Gevaert, K.; Kellermann, J.; Voos, W.; Sickmann, A.; Pfanner, N.; Meisinger, C.: Global analysis of the mitochondrial N-proteome identifies a processing peptidase critical for protein stability. *Cell* 139, 428–439 (2009).
- von Ballmoos, C.; Cook, G.M.; Dimroth, P.: Unique rotary ATP synthase and its biological diversity. *Annu. Rev. Biophys.* 37, 43–64 (2008).
- Wang, M.; Sips, P.; Khin, E.; Rotival, M.; Sun, X.; Ahmed, R.; Widjaja, A.A.; Schafer, S.; Yusoff, P.; Choksi, P.K.; Ko, N.S.J.; Singh, M.K.; Epstein, D.; Guan, Y.; Houštěk, J.; Mracek, T.; Nuskova, H.; Mikell, B.; Tan, J.; Pesce, F.; Kolar, F.; Bottolo, L.; Mancini, M.; Hubner, N.; Pravenec, M.; Petretto, E.; MacRae, C.; Cook, S.A.: Wars2 is a determinant of angiogenesis. *Nat. Commun.* 7, 12061 (2016).
- Whitehouse, D.G.; Moore, A.L.: *Encyclopedia of Biological Chemistry*. 2nd ed. Waltham ,Academic Press, Waltham, (2013).
- Xia, D.; Esser, L.; Tang, W.-K.; Zhou, F.; Zhou, Y.; Yu, L.; Yu, C.-A.: Structural analysis of cytochrome bc1 complexes: implications to the mechanism of function. *Biochim. Biophys. Acta* 1827, 1278–1294 (2013).
- Yakes, F.M.; Van Houten, B.: Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 514–519 (1997).
- Yoshikawa, S.; Shimada, A.: Reaction mechanism of cytochrome c oxidase. *Chem. Rev.* 115, 1936–1989 (2015).
- Zeviani, M.; Di Donato, S.: Mitochondrial disorders. *Brain J. Neurol.* 127, 2153–2172. (2004).
- Zhu, J.; Vinothkumar, K.R.; Hirst, J.: Structure of mammalian respiratory complex I. *Nature* 536, 354–358 (2016).
- Zong, S.; Wu, M.; Gu, J.; Liu, T.; Guo, R.; Yang, M.: Structure of the intact 14-subunit human cytochrome c oxidase. *Cell Res.* 28, 1026–1034 (2018).