

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BIOCHEMICKÁ DIAGNOSTIKA
MITOCHONDRIÁLNÍCH ONEMOCNĚNÍ VE SVALOVÉ
TKÁNI

Biochemical diagnostics of mitochondrial disorders in muscle tissue

Vedoucí práce: prof. MUDr. Jaroslav Dršata, CSc.

Konzultant: RNDr. Hana Hansíková, CSc.

Praha 2016

Radka Bradová

Prohlášení:

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Praze, 2016

Podpis.....

Poděkování

Děkuji RNDr. Haně Hansíkové, CSc. za odborné vedení při práci v laboratoři a za neocenitelné rady při sepisování této bakalářské práce a také děkuji prof. MUDr. Jaroslavu Dršatovi, CSc. zastupujícímu katedru biochemie FaF UK v Hradci Králové za cenné připomínky při sepisování této bakalářské práce.

Zvláštní poděkování patří paní laborantce Suzaně Knopové za významnou pomoc při vypracování experimentální části práce. Dále bych chtěla poděkovat všem pracovníkům Laboratoře pro studium mitochondriálních poruch (Klinika dětského a dorostového lékařství VFN a 1. LF UK) za vytvoření příjemné atmosféry a celé své rodině a příteli za jejich podporu.

Tato bakalářská práce byla podpořena výzkumnými projekty:

PRVOUK P24/LF1/3 Molekulární, buněčná a patofyziologická podstata nemocí
a RVOVFN64165 Diagnostika a léčba geneticky podmíněných poruch II.

Abstrakt

Mitochondriální onemocnění (MO) patří k závažným dědičným poruchám metabolismu způsobené nedostatečnou energetickou funkcí mitochondrií. Jejich příčinou jsou poruchy biogeneze a struktury oxidačně-fosforylačního aparátu (OXPHOS). MO mají rozsáhlé klinické dopady s velice nepříznivou prognózou. Incidence MO je přibližně 1:5000 a tak se řadí mezi jedny z nejčastějších vrozených metabolických poruch. Vzhledem k tomu, že léčba MO je stále nedostupná, jedinou možností jak pomoci postiženým rodinám, je správně a včas zjistit pravou příčinu MO a zajistit tak možnost genetického poradenství v postižených rodinách. V posledních letech se sice daří odhalovat stále nové geny, které jsou odpovědné za MO, ale většina genů vyvolávajících onemocnění zůstává nadále neznámá. Jedinou možností je pak analýza mitochondriálních funkcí na biochemické úrovni.

Tato bakalářská práce se zabývá analýzou biochemických parametrů mitochondriálních enzymů ve vzorku kosterního svalu. Práce popisuje postup biochemické diagnostiky zahrnující odběr tkáně, izolaci mitochondrií a následně metody analýzy enzymatické aktivity komplexů OXPHOS. Mitochondriální frakce z nativního svalu byla izolována pomocí diferenční centrifugace. Obsah proteinu ve vzorcích byl stanoven metodou dle Lowryho. Aktivity komplexů OXPHOS byly analyzovány spektrofotometricky. Aktivity komplexů OXPHOS v souboru pacientů byly porovnány se souborem kontrol. Patologické nálezy byly zhodnoceny ve vztahu k fenotypovým projevům vyšetřovaných osob.

Klíčová slova: mitochondrie, mitochondriální onemocnění, systém oxidativní fosforylace, spektrofotometrie.

Abstract

Mitochondrial diseases are serious hereditary metabolic disorders caused by insufficient energy function of mitochondrion. The cause of the disorders is biogenesis and structure of oxidative-phosphorylation system (OXPHOS) fault. Mitochondrial diseases have extensive clinical implications with a very poor prognosis. Incidence of these diseases is approximately 1: 5000 and thus they ranks among one of the most common congenital metabolic disorders. Given it that treatment is still unavailable, the only way to help the affected families is properly and early find out the true cause of the mitochondrial diseases to ensure the possibility of genetic counseling in affected families. In recent years, although novel genes that are responsible for the MO are discovered, the majority of the genes causing the disease still remains unknown. The only possibility is the analysis of mitochondrial functions at the biochemical level.

This thesis focuses on the analysis of biochemical parameters of mitochondrial enzymes in skeletal muscle sample. The thesis describes the biochemical diagnosis process involving the collection of tissue, isolation of mitochondria and analyses for enzymatic activity of OXPHOS complexes. Mitochondrial fraction of native muscle was isolated by the differential centrifugation. The protein concentration in the samples was determined by the method according to Lowry. Activities of OXPHOS complexes were analyzed by spectrophotometry. Activities of OXPHOS complexes in the group of patients were compared with a set of control samples. Pathological findings were evaluated in relation to the phenotypic manifestations of patients.

Keywords: mitochondria, mitochondrial diseases, oxidative phosphorylation system, spectrophotometry.

1. Obsah

1. Obsah	6
2. Úvod.....	7
3. Seznam použitých zkratk.....	8
4. Teoretická část	10
4.1 Mitochondrie	10
4.2 Systém oxidační fosforylace (OXPHOS).....	11
4.2.1 Komplex I	12
4.2.2 Komplex II	12
4.2.3 Komplex III.....	14
4.2.4 Komplex IV.....	14
4.2.5 Komplex V	14
4.3 Mitochondriální onemocnění	15
4.4 Diagnostika mitochondriálních onemocnění.....	17
4.4.1 Svalová biopsie jako zdroj informací pro porozumění funkčních defektů OXPHOS.....	17
4.4.2 Funkční analýzy (spektrofotometrie, polarografie, oxidace substrátů KMEM)..	18
4.4.3 Proteinové analýzy (BN, SDS-PAGE elektroforéza) a WB.....	20
4.4.4 Histochemie a cytochemie, elektronová mikroskopie.....	21
5. Cíl práce	23
6. Materiál a Metody	24
6.1 Materiál	24
6.1.1 Biologický materiál.....	24
6.1.2 Chemikálie	25
6.1.3 Použité přístroje a laboratorní vybavení.....	27
6.2 Metody	27
6.2.1 Odběr tkáně	27
6.2.2 Homogenizace a příprava mitochondriální frakce	28
6.2.3 Analýza enzymatických aktivit komplexů dýchacího řetězce	29
6.2.4 Stanovení koncentrace proteinů metodou dle Lowryho.....	33
7. Výsledky	35
8. Diskuze.....	40
9. Závěr	41
10. Použitá literatura	42

2. Úvod

Defekt systému oxidační fosforylace (OXPHOS) vede k velmi závažným metabolickým onemocněním projevujícím se často krátce po narození. S incidencí 1:5000 patří mitochondriální onemocnění (poškození OXPHOS) mezi jedny z nejčastěji se vyskytujících vrozených metabolických poruch.

Systém OXPHOS je hlavním a nepostradatelným zdrojem energie (ATP) eukaryotické buňky. Jedná se o komplexní proces umístěný ve vnitřní mitochondriální membráně, na kterém se podílí 4 enzymy dýchacího řetězce, 2 mobilní přenašeče a ATP syntáza. Narušení jakékoli složky tohoto systému může mít za následek právě mitochondriální onemocnění.

Aby se co nejpřesněji charakterizovala funkce OXPHOS, je zapotřebí využít kombinaci více metod a pokud je to možné, tak i nejlépe analýzu na dvou různých tkáních (většinou kosterní svalovina a kultivované kožní fibroblasty). Tato práce se zaměřuje na vyšetření prováděné ze vzorku kosterního svalu.

V roce 1996 byla poprvé formulována hlavní kritéria k identifikaci mitochondriálního onemocnění (Walker et al., 1996) a dnes se odhaduje, že každý dvoustý člověk nese patogenní mtDNA mutaci (Cree et al., 2009) a až 1500 genů může být zapojeno do správné funkce mitochondriálního energetického metabolismu.

Diagnostika mitochondriálního onemocnění je velmi složitý proces a vyšetření pacientů, u kterých existuje podezření na mitochondriální onemocnění, vyžaduje celé spektrum laboratorních a klinických testů. Vyšetření vysoce energeticky náročné tkáně, jakým je kosterní sval, tak stále zůstává zlatým standardem jak v detailní charakterizaci etiopatogeneze MO, tak i v procesu ověřování molekulárních nálezů.

3. Seznam použitých zkratek

ATP	adenosintrifosfát
bpn	bez patologického nálezu
BSA	hovězí sérový albumin (bovine serum albumin)
CK	kreatinkináza
COX	cytochrom c oxidáza (komplex IV)
CS	citrátsyntáza
DBH ₂	ubichinol (redukovaný decylubichinol)
DCPIP	dichlorfenolindolfenol
DK	dolní končetiny
DTNB	5-5' - dithiobis(2- nitrobenzoát), Ellmanovo reagens
e ⁻	elektron
EC	číselná klasifikace enzymů (Enzyme commission number)
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
KMEM	kapacita mitochondriálního energetického metabolismu (mitochondrial energy generating capacity)
KPi	fosfátový pufr - KH ₂ PO ₄ (složení viz 6.1.2.2. Roztoky a pufrы)
KTEA	„KCl-Tris-EDTA-aprotinin“ pufr (složení viz 6.1.2.2. Roztoky a pufrы)
LHON	syndrom - Leberova Hereditární Optická Neuropatie
LPSMP	Laboratoř pro studium mitochondriálních poruch
MELAS	syndrom - Mitochondriální myopatie, Encefalopatie, Laktátová Acidóza a iktu (Stroke) podobné příhody
MERRF	syndrom - Myoklonická Epilepsie a Ragged-Red Fibres
MM	mitochondriální myopatie
MO	mitochondriální onemocnění
mtDNA	mitochondriální DNA
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
NARP	syndrom - Neurogení svalová slabost s Ataxií a Retinitis Pigmentosa
NCCR	NADH:cytochrom c oxidoreduktáza (rotenon senzitivní; komplex I-III)
ND5	gen pro mitochondriálně kódovanou podjednotku komplexu I
NQR	NADH:koenzym Q oxidoreduktáza (rotenon sensitivní; komplex I)

OXPHOS	system oxidační fosforylace (oxidative phosphorylation)
PDH	pyruvátdehydrogenázový komplex
Pi	anorganický fosfát
PMR	psychomotorická retardace
PMV	psychomotorický vývoj
QCCR	QH ₂ :cytochrom c oxidoreduktáza (komplex III)
RCF	relativní centrifugační zrychlení, též ozn. jako „g“
ROS	volné kyslíkové radikály (reactive oxygen species)
RRF	z angl. „ragged-red fibers“
SA	specifická aktivita
SCCR	sukcinát:cytochrom c oxidoreduktáza (komplex II-III)
SDH	sukcinátdehydrogenáza
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
SQR	sukcinát:koenzymQ oxidoreduktáza (komplex II)
<i>SURF1</i>	gen pro asemblační faktor COX – SURF1
WB	western blot

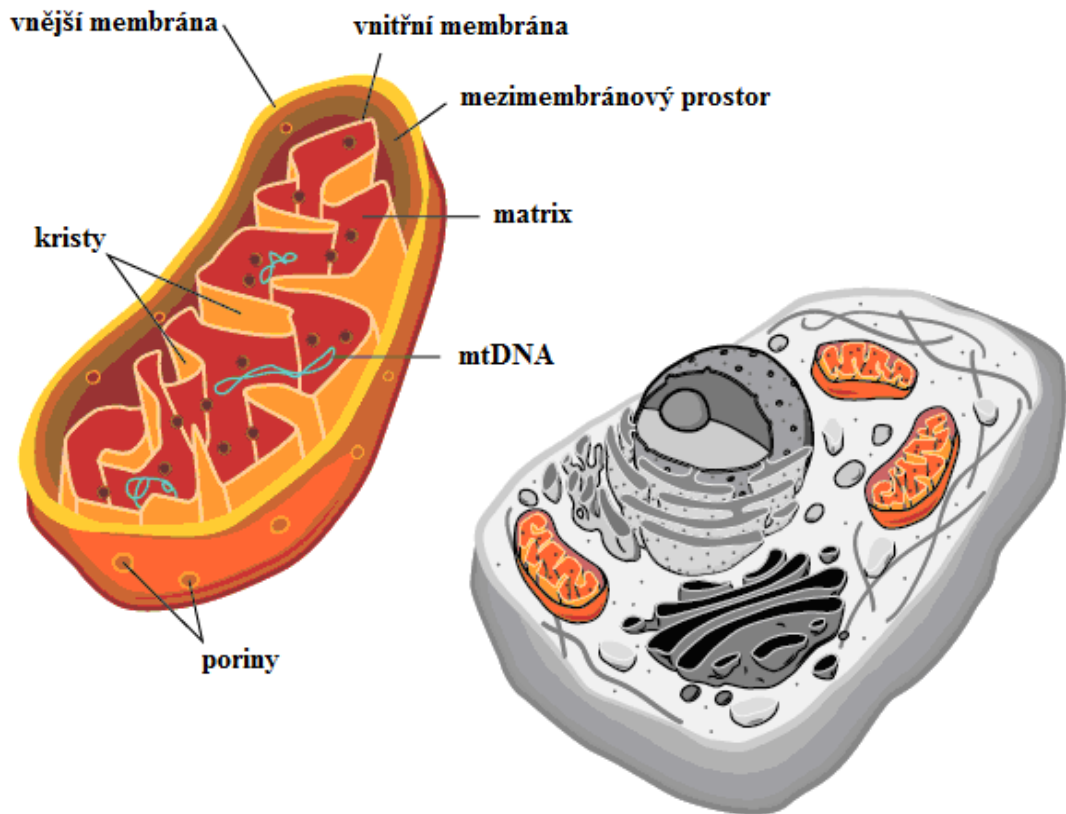
4. Teoretická část

4.1 Mitochondrie

Mitochondrie jsou buněčné organely, které vznikly z α -proteobakterií, přibližně před dvěma miliardami let. V eukaryotických buňkách hrají významnou roli. Nejdůležitější funkcí je jejich schopnost transformovat energii přijímanou živinami do formy ATP. Mitochondrie se účastní dalších důležitých procesů a funkcí jako jsou buněčná signalizace, apoptóza, homeostáze Ca^{2+} , produkce volných kyslíkových radikálů (ROS) (Venditti et al., 2013), termogeneze (Azzu and Brand, 2010), Krebsův cyklus a metabolismus aminokyselin, mastných kyselin a steroidů (DiMauro and Schon, 2003). Přestože mitochondrie mají svůj vlastní vnitřní genom, během evoluce se transportovala většina genů z jejího genomu do genomu jaderného.

Mitochondrie mají dvě membrány, vnější a vnitřní. Vnitřní část mitochondrie se nazývá matrix mitochondrie a zóna mezi vnější a vnitřní membránou je tzv. mezimembránový prostor. Vnitřní membránu tvoří zvrásnění - kristy. Mitochondrie vykazují variabilitu ve velikosti a tvaru v závislosti na tkáni, ve které se nacházejí. Mohou být eliptické, $\sim 0,5\mu\text{m}$ široké a $\sim 1\mu\text{m}$ dlouhé. V buňkách se mitochondrie nevyskytují jako izolované organely, ale tvoří vysoce dynamickou síť - „mitochondriální síť“.

V matrix mitochondrie se nalézají jednak mnoho enzymů (například enzymy Krebsova cyklu nebo proteiny oxidace mastných kyselin), mtDNA a také systém sloužící k syntéze mitochondriálních proteinů: DNA a RNA polymerázy, ribozomy, molekuly tRNA, nukleotidy a aminokyseliny. Vnější membrána obsahuje napěťově řízené aniontové kanály, póry, které propouští malé molekuly jako je ATP a glukóza, zatímco větší (například proteiny) kanálem neprocházejí. Přenos nasyntetizovaného ATP z matrix do mezimembránového prostoru a přenos ADP opačným směrem zprostředkovává ADP/ATP translokátor vnitřní mitochondriální membrány. Kromě ADP/ATP přenašeče obsahuje vnitřní membrána další transportní systémy (přenašeče pro glykogen a další důležité metabolity, kofaktory, anorganické molekuly, atd.) (Goodsell, 2010).



Obrázek 1: Struktura mitochondrie (upraveno podle Shmoop Editorial Team, 2008).

4.2 Systém oxidační fosforylace (OXPHOS)

Systém oxidační fosforylace (OXPHOS - oxidative phosphorylation system) je složen z těchto hlavních komponent: komplexů I-IV. dýchacího řetězce, dvou elektronových přenašečů (koenzymu Q a cytochromu c) a ATP syntázy. Je lokalizován ve vnitřní mitochondriální membráně. Propojením komponent respiračního řetězce tokem elektronů a následnou tvorbou a využitím mitochondriálního membránového potenciálu $\Delta\Psi_m$ je generována většina buněčného ATP. Vzhledem k duálnímu původu OXPHOS je jeho biogeneze složitý děj vyžadující přesnou koordinaci exprese obou genomů (Fontanesi et al., 2006).

Hlavním úkolem systému OXPHOS je oxidace redukovaných koenzymů NADH a $FADH_2$, jenž vznikají během metabolických procesů (glykolýzy a Krebsova cyklu). Elektrony z těchto koenzymů jsou přenášeny přes jednotlivé komplexy až na koncový akceptor elektronů, kterým je kyslík. Komplexy se liší redoxním potenciálem, což zajišťuje správný směr toku elektronů. Současně s přenosem elektronů dochází k pumpování protonů (H^+) do mezimembránového prostoru (komplexy I, III a IV) a tím k

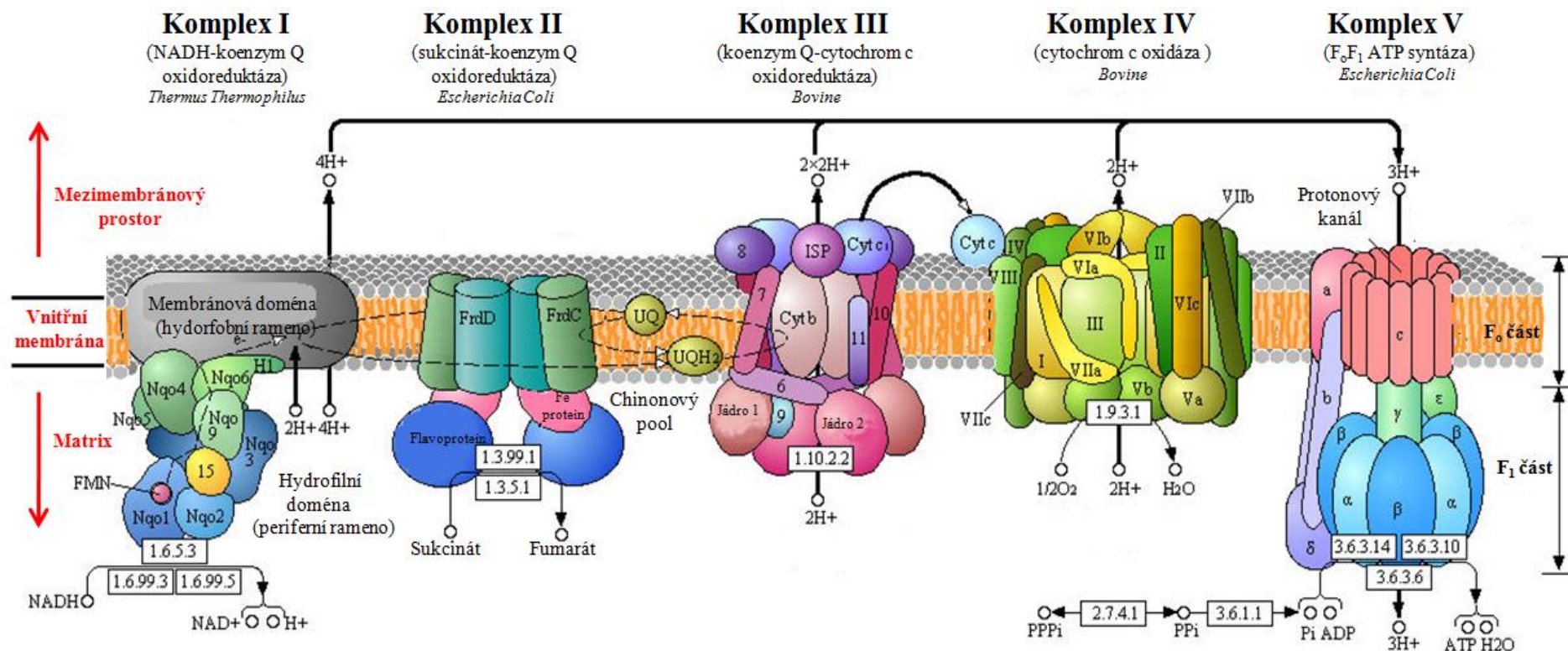
tvorbě protonového gradientu mezi matrix a mezimembránovým prostorem. Vzniklý gradient je následně využit F₀F₁ ATP syntázou (komplexe V) k syntéze ATP z ADP a Pi (Nicholls & Ferguson, 2013).

4.2.1 Komplex I

První komplex systému OXPHOS je systematicky NADH-koenzym Q oxidoreduktáza, která je největším enzymem dýchacího řetězce. Má tvar písmene L a u savců se skládá ze 44 podjednotek, přičemž 7 podjednotek je kódováno mtDNA a zbylé podjednotky jadernou DNA (Vinothkumar et al., 2014). Hlavní role tohoto enzymu spočívá v příjmu elektronů (e^-) od redukovaného koenzymu NADH. První fází jejího fungování je zprostředkování přenosu $2e^-$ z NADH na flavinmononukleotid (FMN). Následně jsou elektrony přeneseny přes 9 železo-sírných (Fe-S) center až na koenzym Q (ubichinon) a přes něj pokračují ve své cestě k dalšímu z komplexů, ke komplexu III. Společně s přenosem $2e^-$ dochází k přesunu $4H^+$ z matrix mitochondrie do mezimembránového prostoru (Baradaran et al., 2013).

4.2.2 Komplex II

Druhý komplex, sukcinát-koenzym Q oxidoreduktáza, zprostředkovává přenos e^- z FADH₂. Tento komplex se skládá ze 4 podjednotek a všechny jsou kódovány nukleárními geny. Sukcinát-koenzym Q oxidoreduktáza se nevyskytuje jen v OXPHOS, ale také v Krebsově cyklu. Jeho význam nacházíme u 2 odlišných chemických reakcí: oxidace sukcinátu na fumarát (v Krebsově cyklu) a redukce koenzymu Q (ubichinonu na ubichinol v dýchacím řetězci). Jeho funkce spočívá v tom, že umožňuje přenos $2e^-$ uvolněných během oxidace sukcinátu na fumarát, které poté redukují kovalentně navázaný flavinadeninukleotid (FAD). Tyto elektrony pak pokračují přes Fe-S centra až na koenzym Q. Z něj jsou následně přeneseny na III. komplex systému OXPHOS. Komplex II je jediným z komplexů dýchacího řetězce, u kterého nedochází s přenosem elektronů k pumpování protonů do mezimembránového prostoru mitochondrií (Iverson, 2013).



Obrázek 2: Schématické znázornění jednotlivých komplexů systému OXPHOS. Na obrázku jsou zobrazeny komplexy systému OXPHOS I-V. Tučnými černými šipkami je znázorněn přenos protonů přes vnitřní mitochondriální membránu do mezimembránového prostoru (komplex I, III a IV), který je poté využit komplexem V k syntéze ATP. Dále jsou zde zobrazeny podjednotky jednotlivých komplexů systému OXPHOS, O₂ jako cílový akceptor elektronů z redukováných koenzymů, elektronové přenašeče (koenzym Q – viz chinonový pool a cytochrom c) a jednotlivé části V. komplexu OXPHOS (F₀ část ve vnitřní membráně a F₁ část tyčící se do matrix), pozn. čísla v rámečku udávají označení enzymu v rámci EC klasifikace, (převzato a upraveno podle Granata et al., 2009).

4.2.3 Komplex III

Přenos elektronů z redukovaných koenzymů zprostředkovaný na komplexech I a II dále pokračuje přes další z komplexů dýchacího řetězce, a to koenzym Q-cytochrom c oxidoreduktázu, která má 11 podjednotek a pouze 1 je kódována mtDNA (konkrétně cytochrom b). Na komplex III jsou přineseny $2e^-$ ve formě redukovaného koenzymu Q, přičemž každý putuje odlišnou dráhou. Jeden z elektronů jde cestou přes Fe-S centra na cytochrom c1 a odtud na cytochrom c (mobilní přenašeč, který je schopný přenášet pouze $1e^-$). Druhý elektron putuje přes cytochrom b na oxidovaný koenzym Q, ze kterého vytvoří radikál a ten se stane plně redukovaným. Během přenosu $2e^-$ dojde k transportu $4H^+$ do mezimembránového prostoru mitochondrie (Crofts et al., 2008).

4.2.4 Komplex IV

Cytochrom c, jenž je na komplexu III redukován, přenáší elektrony (vždy jen 1) na poslední z komplexů dýchacího řetězce, kterým je cytochrom c oxidáza (COX, komplex IV) mající 14 podjednotek, z toho 3 jsou kódovány mtDNA a zbylé jadernými geny. Redukovaný cytochrom c nejdříve předává elektrony měďnatému centru CuA, které pak pokračují přes cytochrom a, cytochrom a3 a druhé měďnaté centrum CuB až k finálnímu akceptoru elektronů O_2 , z něž vzniknou 2 molekuly H_2O . Pro redukci 1 molekuly O_2 jsou potřebné 4 elektrony, které cytochrom c donese postupně. V průběhu redukce molekuly O_2 dochází k přenosu $4H^+$ z matrix do mezimembránového prostoru mitochondrie (Brzezinski & Gennis, 2008).

4.2.5 Komplex V

Díky přenosu elektronů přes jednotlivé komplexy OXPHOS dochází ke zvýšení protonového gradientu mezi matrix a mezimembránovým prostorem. Podle chemiosmotické hypotézy se vzniklý gradient využije posledním z komplexů OXPHOS k syntéze ATP (Mitchell, 1961). Tento komplex se nazývá F₀F₁ ATP syntáza (komplex V), jenž je složena ze 14 podjednotek (2 jsou kódovány mtDNA). Lidskou F₀F₁ ATP syntázu lze rozdělit na 2 funkční celky - F₁ a F₀. První z částí F₁ vyčnívá do matrix, druhá část F₀ je zakotvena ve vnitřní mitochondriální membráně (Boyer, 1997). Přenos protonů z mezimembránového prostoru zpět do matrix prostřednictvím F₀F₁ ATP syntázy je spojen s konformačními změnami jednotlivých podjednotek. Přesný způsob, kterým H^+ prochází dosud nebyl objasněn.

4.3 Mitochondriální onemocnění

Jak již bylo zmíněno, v mitochondriích probíhají důležité metabolické dráhy, jejichž poškození a dysfunkce vedou k mitochondriálním onemocněním (MO). Mezi základní poruchy mitochondriálního energetického metabolismu řadíme poruchy metabolismu pyruvátu, Krebsova cyklu a systému OXPHOS, který zajišťuje více než 90% energetických potřeb buňky a jehož poruchy patří ve skupině mitochondriálních onemocnění k nejčastějším.

MO mohou mít klasický Mendelovský (autosomálně recesivní, autosomálně dominantní či X-vázaná) typ dědičnosti nebo maternální (mitochondriální) typ, protože k mutaci vedoucí k MO může dojít buď v jaderném, nebo mitochondriálním genomu (Metabolic disease, 2016).

MO se projevují závažným multisystémovým postižením s nepříznivou prognózou. Znamky a příznaky mitochondriálních poruch jsou závislé na závažnosti mutací, procentu dysfunkčních mitochondrií a na energetických požadavcích postižených tkání. Nejvíce postižené jsou tkáně s vysokými energetickými nároky, jako jsou kosterní sval, srdeční tkáň, mozek či játra, přičemž MO se mohou projevovat pouze v některých tkáních (tkáňově specifické MO) nebo ve všech tkáních (generalizované MO).

Pacienti často mají biochemické markery svědčící pro MO (například zvýšená hladina laktátu v krvi nebo zvýšené hladiny organických kyselin v moči), avšak u některých pacientů se vyskytuje zcela normální metabolický screening.

Často diagnóza mitochondriálního onemocnění vyžaduje průkaz dysfunkce dýchacího řetězce pomocí měření aktivity komplexů OXPHOS ve svalové tkáni získané z biopsie nebo autopsie.

Tabulka 1: Klinické projevy mitochondriálních onemocnění v různých tkáních při poruše mitochondriálního respiračního řetězce, převzato a upraveno dle Metabolic disease, 2016.

Poruchy mitochondriálního respiračního řetězce	
Zasažený systém/ orgán	Klinické projevy
Nervový systém	nízký svalový tonus, křeče, iktu podobné (stroke-like) příhody, poruchy rovnováhy, periferní nervové poškození, ztráta sluchu
Oči	šedý zákal, pigmentové změny sítnice, abnormální oční pohyby
Kardiovaskulární systém	srdeční selhání; srdeční vada vedení vzruchu; nízký počet bílých krvinek, červených krvinek a krevních destiček; anémie
Gastrointestinální trakt	jaterní dysfunkce a selhání, dysfunkce pankreatu, průjem, gastroenteritida podobná chřipce, opakované zvracení
Ledviny	selhání ledvin, renální tubulární poruchy, křivice
Endokrinní systém	diabetes mellitus, malý vzrůst, hypoparatyreóza, hypotyreóza
Kůže	vyrážky, skvrnitá pigmentace, šupinaté vyrážky

4.4 Diagnostika mitochondriálních onemocnění

Vzhledem k rozmanitosti klinických příznaků a různému dopadu MO v různých tkáních je diagnostika MO velmi obtížná. MO mají velmi nepříznivou prognózu a stanovení včasné a správné diagnózy je zásadní pro genetické poradenství v postižených rodinách.

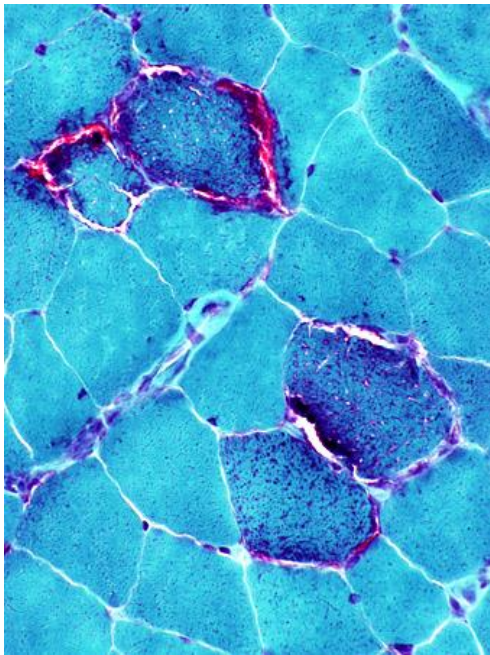
Pro správné nasměrování laboratorního vyšetřovacího postupu v případě podezření na MO je důležitá podrobná klinická anamnéza pacienta a rodiny spolu se základním metabolickým skríníngem. Následuje vyšetření mitochondriálních parametrů v dostupných tkáních, nejdříve neinvazivním vyšetřením např. buněk bukalního stěru, izolovaných lymfocytů nebo trombocytů z periferní krve a nebo kultivovaných fibroblastů. Nejhodnotnějším vyšetřením však stále zůstává analýza nativního svalu ze svalové biopsie, jejíž výsledky často pomohou zacílit vyšetřovací program na molekulárně-genetickou analýzu konkrétních kausálních genů.

4.4.1 Svalová biopsie jako zdroj informací pro porozumění funkčních defektů OXPHOS

Zlatým standardem pro vyšetření a diagnózu MO je svalová biopsie. Jedná se o nejvíce užitečnou proceduru pro vyhodnocení mitochondriopatií (Fadic & Johns, 1996; Mc Farland et al., 2002). Přes její rutinní provádění právě pro diagnostické účely zůstává invazivním nástrojem. Faktem je, že umožňuje zkoumat in vitro jen malou část tkáně, nicméně i to může přinést další hodnotné informace o závažnosti biochemických dopadů MO a díky nedávno vyvinutým laboratorním technikám také o patobiochemických mechanismech v buňce. Pro komplexní analýzu svalové tkáně se využívá kombinace funkčních, proteinových a ultrastrukturálních analýz. Kromě toho, v některých studiích, bylo využito výsledku opakované biopsie ke studiu metabolických změn v kosterním svalu po terapeutickém režimu.

Navíc, svalová tkáň může být rutinně vyšetřena světelnou mikroskopií zahrnující trichromové barvení dle Gomori, které může ukázat nepravidelná, svalová vlákna, tzv. „ragged-red fibers“ (RRF) (viz obrázek 3) a /nebo, i sukcinátdehydrogenázové barvení jako charakteristický marker mitochondriální cytopatie. Ty obsahují nakumulované zvětšené abnormální mitochondrie s ultrastrukturálně hustými kristami a

parakrystalickými inkluzemi (Rollins et al., 2001). Mitochondriální proliferace s RRF je typická pro pacienty s delecemi, deplecemi nebo bodovými mutacemi v tRNA genech (MELAS, MERRF) (DiMauro, 1996). Naproti tomu, RRF nejsou znatelné skoro nikdy u pacientů s mtDNA bodovými mutacemi na strukturálních genech (LHON, NARP, Leigh) (Walker et al., 1996).



Obrázek 3: Histologický preparát kosterního svalu s RRF (ragged-red fibers), trichrom barvení dle Gomori (převzato z Neuromuscular disease center, 2015).

4.4.2 Funkční analýzy (spektrofotometrie, polarografie, oxidace substrátů KMEM)

Mezi funkční analýzy mitochondriálních funkcí řadíme měření aktivit komplexů dýchacího řetězce a ATPázy pomocí spektrofotometrie, analýzu spotřeby kyslíku pomocí vysoce citlivé polarografie a analýzu kapacity mitochondriálního energetického metabolismu pomocí oxidace značených substrátů. Uvedené metody většinou vyžadují nativní tkáň.

Spektrofotometrie je analytická metoda pro měření vlastností vzorku (např. koncentrace určité látky v roztoku - substrát/ produkt) na základě pohlcování světla různých vlnových délek spektra. Roztok v kyvetě je

ozařován monochromatickým světlem (vybraná oblast elektromagnetického spektra) a světelné záření je molekulou analytu absorbováno. Detektor záření měří intenzitu dopadajícího světla (zářivý tok) neabsorbovaného roztokem. Při analýze je spektrofotometrem porovnávána intenzita zdrojem vysílaného záření s intenzitou záření dopadajícího na detektor - část energie světelného záření je roztokem a rozpuštěnými látkami absorbována. Množství absorbovaného záření je pak úměrné koncentraci látky ve studovaném roztoku.

Biochemické vyšetření pomocí spektrofotometrie může být prováděno ve svalovém homogenátu anebo v izolovaných mitochondriích. Je vhodné vyšetření provádět v obou subfrakcích. Spektrofotometrické studie mohou zahrnovat jednotlivé nebo skupinové analýzy aktivit komplexů dýchacího řetězce, stejně jako β -oxidace mastných kyselin či kapacity karnitinových a acyl-karnitinových transportérů.

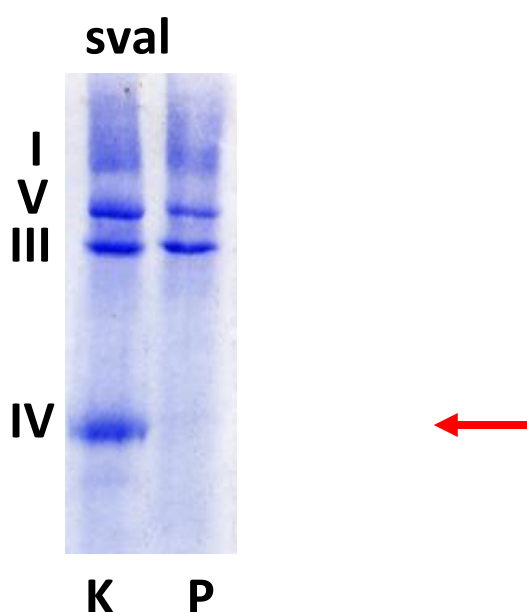
Polarografické studie zahrnují měření spotřeby kyslíku v izolovaných mitochondriích nebo permeabilizovaných svalových vláknech s použitím kyslíkové elektrody po přidavku substrátů: respirační stav III (kdy je k dispozici dostatek kyslíku, ADP a fosforu) nebo respirační stav IV (kdy chybí ADP, jehož absence limituje spotřebu kyslíku). Pomocí polarografie lze určit efektivitu dýchacího řetězce, aktivitu OXPHOS, integritu mitochondriálních membrán a účinnost substrátových transportérů (Gillis & Kaye, 2002).

Další vhodný způsob, jak přispět k diagnostice MO je analýza kapacity mitochondriálního energetického metabolismu (KMEM). Tato metoda se běžně používá v naší laboratoři pro vyšetření oxidativní fosforylace u pacientů z čerstvě získaného vzorku kosterního svalu. Princip KMEM analýzy je měření míry oxidace ^{14}C - značených substrátů v 10 různých inkubacích. Tyto inkubace obsahují [$1\text{-}^{14}\text{C}$] pyruvát, [$\text{U-}^{14}\text{C}$] malát nebo [$1,4\text{-}^{14}\text{C}$] sukcinát, donory a akceptory acetyl-CoA a inhibitory citrátového cyklu. Míra oxidace se měří jako produkce $^{14}\text{CO}_2$. Porovnáním jednotlivých inkubací mezi sebou lze získat obraz mitochondriální poruchy. Výhodou této metody ve srovnání s respirometry nebo spektrofotometry je širší spektrum metabolických drah, které zahrnuje kromě oxidativní fosforylace (OXPHOS) také citrátový cyklus a komplex PDH (Janssen et al., 2006).

4.4.3 Proteinové analýzy (BN, SDS-PAGE elektroforéza) a WB

Immunoblotové techniky se používají ke zjištění množství a složení mitochondriálních proteinů v kosterním svalu (Sperl, 1997; Gillis & Kaye, 2002; The Mitochondrial Disease Foundation, 2003) za použití specifických protilátek proti jednotlivým podjednotkám specifických proteinů. Kombinací imunohistochemických a imuno elektroforetických metod lze dobře stanovit distribuci anebo množství různých peptidových podjednotek enzymových komplexů respiračního řetězce, kódovaných buď mtDNA, nebo nukleární DNA.

Blue native elektroforéza byla vyvinuta pro výzkum membránově vázaných proteinových komplexů (Schagger & von Jagow, 1991). Metoda dovoluje separaci intaktních proteinů z mitochondriální membrány (viz obrázek 4). Je to umožněno použitím detergentu dodecyl- β -D-maltosidu (laurylmaltosid), který solubilizuje mitochondriální membránu bez disociace proteinových komplexů. Extrakce proteinových komplexů je umožněna přidáním aminokapronové kyseliny, která má při pH 7 nulový náboj a proto neovlivňuje elektroforézu. Coomasie blue uděluje proteinům náboj nutný pro elektroforetickou separaci, ale nezpůsobuje jejich disociaci.



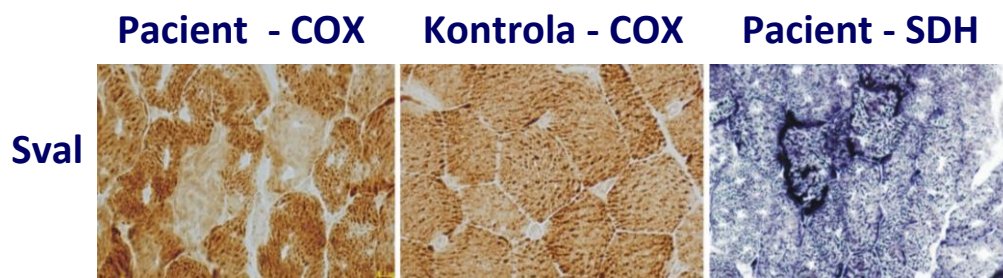
Obrázek 4: Ukázka separace mitochondriálních komplexů OXPHOS pomocí Blue-Native elektroforézy barvené Coomasie Blue. Pozice jednotlivých komplexů jsou uvedeny vlevo: I (NQR), V (ATP syntáza), III (QCCR), IV (COX).

K – kontrola, P- pacient s defektem komplexu IV (COX), (převzato z interních materiálů LPSMP, 2016).

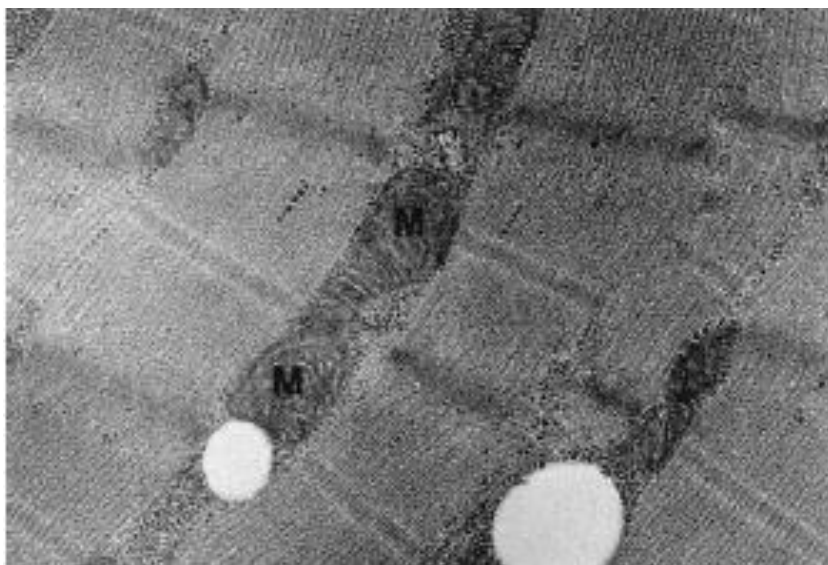
K detekci a kvantifikaci mitochondriálních proteinů lze také využít elektroforézu za denaturujících podmínek (SDS-PAGE) s tricinových pufracím systémem pro lepší separaci proteinů o menších hmotnostech (Schagger & von Jagow, 1987). Separace proteinů může být použita v kombinaci s elektrotransferem proteinů na membránu (WB) a následně se provede specifická detekce proteinů protilátkami. Během SDS-PAGE dochází k denuraci proteinů (linearizace v důsledku rozrušení vodíkových vazeb) působením aniontového detergentu dodecylsulfátu sodného (SDS), který se na protein naváže (dává mu záporný náboj) a ruší tak vyšší uspořádání proteinů (sekundární i terciální struktury). Kovalentní vazby mezi cysteiny jednoho proteinu nebo mezi různými proteiny utváří tzv. disulfidické můstky (-S-S-), které jsou redukovány (-S-H H-S) působením 2 - merkaptoethanolu přítomného ve vzorkovém lyzačním pufru. Náboj bílkovin je zcela překryt anionty SDS, takže se pro separaci molekul proteinů prakticky uplatňuje pouze jejich velikost.

4.4.4 Histochemie a cytochemie, elektronová mikroskopie

Svalovou tkáň lze také vyšetřovat imunocytochemickými metodami zahrnujícími detekci cytochrom c oxidázy (COX), sukcinátdehydrogenázy (SDH), NADH dehydrogenázy a ATPázy. Pacienti s mutacemi mtDNA typicky vykazují mozaikový vzhled barvení COX. Stejněměrně nízká hladina COX a intenzivní zabarvení SDH nasvědčuje defekt v nukleárním genu, ale může být shledán i v případě mutací cytochromu b. Normální nález COX však nevylučuje mitochondriopatie. Atypické mitochondrie mohou být také někdy odhaleny pomocí elektronové mikroskopie a to i v časně fázi onemocnění. Elektronová mikroskopie může dobře ukázat mitochondriální strukturu, proliferaci mitochondriálních krist (popř. stočené kristy), parakrystalické inkluze a zvýšený počet zvětšených mitochondrií v subsarkolemální oblasti.



Obrázek 5: Histochemické barvení na aktivitu cytochrom c oxidázy (COX) a sukcinátdehydrogenázy (SDH) v kosterním svalu u pacienta se syndromem MELAS a kontroly. Ve svalu byla pozorována vlákna s absencí COX a subsarkolemální akumulace SDH produktu. Mozaikovitá distribuce aktivity je typická pro onemocnění s mitochondriální etiologií, (převzato z interních materiálů LPSMP, 2016).



Obrázek 6: Ultrastrukturální zobrazení mitochondrií v kontrolním kosterním svalu. M- mitochondrie, (převzato z Kelley et al., 2002).

5. Cíl práce

Cílem bakalářské práce bylo:

- porovnat současné možnosti a metody analýzy systému OXPHOS na úrovni svalové tkáně;
- pomocí spektrofotometrie analyzovat aktivity komplexů dýchacího řetězce v souboru 11 vzorků svalové tkáně od pacientů s podezřením na mitochondriální onemocnění.

6. Materiál a Metody

6.1 Materiál

6.1.1 Biologický materiál

Studijním materiálem byl soubor vzorků kosterního svalu od 11 pacientů, u kterých vzniklo klinické podezření na mitochondriální onemocnění a 6 kontrol (což byly vzorky kosterního svalu pacientů, u kterých nebylo prokázáno mitochondriální onemocnění). Materiál byl odebrán v rámci indikovaného vyšetření po informovaném souhlasu rodiny. Pro hodnocení výsledků byla použita referenční rozmezí běžně používaná v LPSMP.

6.1.1.1 Vzorky pacientů

- DOSPĚLÍ - LOKÁLNÍ ANESTEZIE - tab. 2
- DĚTI - CELKOVÁ ANESTEZIE - tab. 2

6.1.1.2 Kontrolní vzorky

- 6 KONTROL - DOSPĚLÍ, CELKOVÁ ANESTEZIE (KYČEL)

Tabulka 2: Klinické příznaky u pacientů, jejichž vzorky kosterního svalu byly analyzovány

Pacient	Klinické příznaky:
D1	Hypotonie, mikrocefalie, opoždění PMV, epilepsie, porucha růstu
D2	PMR, centrální hypotonický syndrom, epilepsie, dysmorfie
D3	Hypotonie, hraniční prospívání, deformity dolních končetin
D4	Encefalopatie, PMR, hypotonie, strabismus, ptóza, atrofie optiku
D5	Encefalopatie, Leigh syndrom, PMR, hypertrichóza, porucha růstu, neprospívání
D6	Prematurita, hypotonie, slepota, hluchota, faciální dysmorfie
P1	Myalgie, diplopie, porucha okulomotoriky
P2	Svalová slabost a křeče, hyperreflexie DK
P3	Epilepsie, opakované iktu podobné příhody, porucha sluchu, laktátová acidóza, hyperalaninémie
P4	Svalová slabost, diplopie
P5	Křeče a myalgie, ↑ CK

Vysvětlivky: ↑ = zvýšená hodnota; PMV = psychomotorický vývoj; PMR = psychomotorická retardace; DK = dolní končetiny; CK = kreatinín.

6.1.2 Chemikálie

6.1.2.1 Čisté chemikálie

Acetyl koenzym A, Sigma (USA)
Antimycin, Sigma (USA)
Aprotinin, Sigma (USA)
ATP, Sigma (USA)
Borohydrid draselný, Merck (Německo)
BSA (hovězí sérový albumin), Sigma (USA)
Chlorid draselný (KCl), Penta (ČR)
Cytochrom c, Sigma (USA)
Dichlorfenolindolfenol (DCPIP), Merck (Německo)
Dihydrogenfosforečnan draselný (KH₂PO₄), Penta (ČR)
5,5-dithiobis-2-nitrobenzoát (DTNB), Sigma (USA)
Ethanol 96%, Penta (ČR)
Hydroxid sodný (NaOH), Penta (ČR)
Kyanid draselný (KCN), Lach-Ner (ČR)
Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA), Sigma (USA)
Kyselina chlorovodíková, Penta (ČR)
Malonát sodný, Sigma (USA)
n-dodecyl-β-D-maltosid (laurylmaltosid), Sigma (USA)
NADH, Sigma (USA)
Oxalacetát, Sigma (USA)
Q₁₀ (decylubichinon), Sigma (USA)
Rotenon, Sigma (USA)
Síran měďnatý (CuSO₄), Sigma (USA)
Sukcinát sodný, Sigma (USA)
TRIS (tris(hydroxymethyl)aminomethan), Sigma (USA)
Uhličitan sodný (Na₂CO₃), Penta (ČR)
Vinan sodnodraselný, Lach-Ner (ČR)

6.1.2.2 *Roztoky a pufry*

Roztoky připravené z chemikálií v laboratoři

Roztoky jsou vodné, není-li uvedeno jinak.

Roztok acetyl koenzymu A [1,2 mM]

Roztok antimycinu [1 mg/ml 96% ethanolu]

Roztok ATP [200 mM]

Roztok BSA [10%]

Roztok cytochromu c oxid. [1mM; 0,123 g do 10 ml pufru 25 mM KPi pH 7,4 (2)]

Roztok cytochromu c red. [cca 1 mM]

Roztok DBH₂ [10mM DBH₂ v 96% ethanolu]

Roztok DCPIP [80 mM]

Roztok 5-5'- dithiobis(2- nitrobenzoátu) (DTNB) [1 M Tris-HCl pH 8,1; 1 mM 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoát]

Roztok EDTA [80 mM]

Roztok „KCl-Tris-EDTA-aprotinin“ (KTEA = izolační médium) pufr [150 mM KCl; 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 2 mM kyselina ethylendiamintetraoctová; 0,002 mg/ml aprotinin]

Roztok KCN [0,1 M]

Roztok KPi (fosfátový pufr, KH₂PO₄) [1M], pH 7,8 (1)

Roztok KPi (fosfátový pufr, KH₂PO₄) [25 mM], pH 7,4 (2)

Roztok KPi (fosfátový pufr, KH₂PO₄) [1M], pH 7,0 (3)

Roztok Lowry A [0,4% (w/v) NaOH, 2% (w/v) Na₂CO₃]

Roztok Lowry B [0,5% (w/v) CuSO₄]

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

Roztok malonátu sodného [1M]

Roztok NADH [10 mM]

Roztok n-dodecyl-β-D-maltosid (laurylmaltosid) [15%]

Roztok oxaloacetátu [0,1 M Tris-HCl pH 8,1; 10 mM oxaloacetát sodný]

Roztok Q₁₀ (decylubichinon) [50 mM v 96% ethanolu]

Roztok rotenonu [1mg/ml 96% ethanolu]

Roztok sukcinátu sodného [1M]

Roztok TRIS/HCl [1M], pH 8,1

Komerčně dodávané směsi

Folinovo reagens, Sigma (USA)

6.1.3 Použité přístroje a laboratorní vybavení

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

Automatické pipety (mikropipety) Eppendorf (Německo), Gilson (USA)

Centrifuga Universal 16R Hettich, (Německo)

Homogenizátor s teflonovým pístem typ: K2G7

Homogenizátor Ultra-turrax T8, IKA labortechnik (Německo)

Ledovač Brema Ice makers (Itálie)

pH metr 774, Metrohm (Švýcarsko)

Spektrofotometr UV-2101PC, Shimadzu (Japonsko)

Termoblok, LABNet, LABNet Int. (USA)

Vodní lázeň, Julabo (Německo)

Vortex, IKA (Německo)

Dále bylo používáno běžné laboratorní sklo (SIMAX, USA) a plast (Eppendorf, Německo; Gilson, USA), chirurgické nástroje (B. Braun, Německo), nylonová síťka 250 μ m, buničitá vata.

6.2 Metody

6.2.1 Odběr tkáně

Odběr svalové tkáně probíhá na předem určeném pracovišti, zpravidla na chirurgickém sále, popř. jednotce intenzivní péče, pokud zdravotní stav pacienta nedovoluje jeho transport. Zákrok se provádí za přítomnosti chirurga a dalšího personálu včetně pracovníka laboratoře. Pro analýzu OXPHOS je vhodné získat alespoň 100 mg svalové tkáně. Po aplikaci celkové či lokální anestézie se provede odběr tkáně o dostatečné velikosti, která se následně ihned a bez prodlevy dopraví při 4°C do laboratoře pro další zpracování (homogenizace tkáně, izolace mitochondrií, analýza OXPHOS).

6.2.2 Homogenizace a příprava mitochondriální frakce

Celý proces probíhá v chladu, s vychlazenými pomůckami, materiálem a nástroji, vychlazeným izolačním médiem KTEA a taktéž centrifuga se předchladí na 4°C. Čerstvou tkáň určenou k homogenizaci je nutné zvážit, přičemž optimální množství tkáně je minimálně 100 mg, a dále vypreparovat z tkáně tuk a šlachy.

Připraví se 5% homogenát, což odpovídá 100 mg tkáně a 2 ml média KTEA, a to následujícím způsobem: chlazený vzorek svalu se přemístí na vychlazenou Petriho misku a opláchne se cca 0,5 ml KTEA, čímž se odstraní případné zbytky krve a odsaje se, dále se tkáň v 1 ml média (z celkového odpovídajícího množství) rozstříhá mikrochirurgickými nůžkami na velmi malé kousky a tato suspenze se přenese do vychlazené homogenizační nádoby homogenizátoru. Nejprve se homogenizuje na homogenizátoru Ultra-turrax T8 na stupeň 3-4 cca 15 sekund 2x a poté 15x na homogenizátoru s teflonovým pístem K2G7 do té doby, než bude suspenze homogenní. Vše přitom probíhá za neustálého chlazení. Takto vzniklý homogenát se přenese do zkumavky a Petriho miska i homogenizátor se opláchne 1 ml média k zajištění zbylého biologického materiálu. Oba homogenáty se spojí a vznikne tím výsledný výše uvedený 5% svalový homogenát.

Po důkladném promíchání se odeberou vzorky na analýzu OXPHOS a stanovení koncentrace celkového proteinu. Zbytek homogenátu se rozdělí do mikrozkuavek a v předchlazené centrifuze se při 4°C centrifuguje 10 minut na 600 g (RCF). Supernatant se odebere a zfiltruje se přes nylonovou síťku (250 µm) do vychlazené zkumavky. Zbylé sedimenty se resuspendují v polovině původního objemu homogenátu nového média a ještě jednou zhomogenizují za použití teflonového homogenizátoru. Poté se opět provede centrifugace (4°C, 10 minut, 600 g).

Vzniklé supernatanty se přefiltrují, jako v předešlém kroku, k supernatantu z první centrifugace. Spojené postnukleární supernatanty se rozdělí do mikrozkuavek a centrifugují nyní na 10000 g, opět při 4°C, 10 minut. Sedimentované mitochondrie se spojí do jedné mikrozkuavky, rozsuspendují se a centrifugují opět za stejných podmínek (4°C, 10 minut, 10000 g).

Vzniklá peleta mitochondrií se naředí a precizně suspenduje izolačním médiem v poměru asi 25 µl média na 100 mg původní tkáně. Z této suspenze mitochondrií se odebere vzorek na analýzu OXPHOS a stanovení koncentrace celkového proteinu.

6.2.3 Analýza enzymatických aktivit komplexů dýchacího řetězce

Spektrofotometrické stanovení enzymových aktivit bylo prováděno dle Rustina s mírnými úpravami (Rustin et al., 1994) v kyvetách (o optické dráze 1 cm při 37°C) na dvoupapřskovém spektrofotometru Shimadzu UV-2401PC. Výsledný objem reakční směsi byl ve všech případech 1 ml. Každé měření bylo provedeno dvakrát.

6.2.3.1 Komplex I

Aktivita rotenon-senzitivní *NADH: koenzym Q oxidoreduktázy* (komplexu I, NQR) byla stanovována jako oxidace NADH při 340 nm s použitím koenzymu Q (decylubichinon) jako akceptoru elektronů. Vzorek (mitochondrie) byl nejdříve inkubován z důvodu porušení mitochondriální membrány 3 minuty v hypotonickém prostředí H₂O. Aktivita byla měřena v 50 mM TRIS/HCl (pH 8,1), 2,5 mg/ml BSA, 0,3 mM KCN, 50 μM decylubichinonu (Q₁₀). Reakce byla startována přidavkem 0,1 mM NADH. Získané hodnoty byly upraveny odečtením aktivity měřené v přítomnosti 50 μM rotenonu.

Výsledná aktivita (SA - specifická aktivita) byla vypočtena podle vzorce:

$$SA = dA * 10^6 / \epsilon * v * c$$

dA aritmetický průměr z obou naměřených hodnot (po odečtení aktivity měřené v přítomnosti rotenonu)

ε molární absorpční koeficient $6,22 * 10^3 \text{ dm}^3 / \text{cm} / \text{mol}$

v objem vzorku v μl

c koncentrace proteinu ve vzorku v mg/ml

Specifická aktivita (SA) je vztažena na množství proteinu ve vzorku a je vyjádřena v nmol/min/mg proteinu.

6.2.3.2 Komplex II

Pro stanovení aktivity *sukcinát: koenzym Q reduktázy* (komplexu II, SQR) reakční směs obsahovala 10 mM KPi (pH 7,8; (1)), 2 mM EDTA, 1 mg/ml BSA, vzorek (mitochondrie), 3 μM rotenon, 10 mM sukcinát sodný, 0,2 mM ATP, 0,3 mM KCN, 80 μM DCPIP (2,6-dichlorophenolindophenol), 1 μM antimycin. Reakce byla startována přidavkem 50 μM decylubichinonu. Pokles absorbance při 600 nm v důsledku redukce

DCPIP byl sledován po dobu 3 minut. Reakce byla zastavena specifickým inhibitorem pro komplex II - přidavkem 10 mM malonátu.

Výsledná aktivita (SA - specifická aktivita) byla vypočtena podle vzorce:

$$SA = dA * 10^6 / \epsilon * v * c$$

dA aritmetický průměr z obou naměřených hodnot

ϵ molární absorpční koeficient $20,1 * 10^3 \text{ dm}^3 / \text{cm} / \text{mol}$

v objem vzorku v μl

c koncentrace proteinu ve vzorku v mg/ml

Specifická aktivita (SA) je vztažena na množství proteinu ve vzorku a je vyjádřena v nmol/min/mg proteinu.

6.2.3.3 *Komplex I-III*

Pro stanovení aktivity *NADH: cytochrom c reduktázy* (komplexu I-III, NCCR) byl vzorek (mitochondrie) nejdříve inkubován z důvodu porušení mitochondriální membrány 3 minuty v hypotonickém prostředí H_2O . Reakční směs dále obsahovala 50 mM TRIS/HCl (pH 8,1), 2,5 mg/ml BSA, 40 μM oxidovaný cytochrom c, 2 mM KCN. Reakce byla startována přidavkem 0,1 mM NADH. Průběh reakce byl sledován po dobu 1 minuty, jako vzestup absorbance při 550 nm v důsledku redukce oxidovaného cytochromu c. Získané hodnoty byly upraveny odečtením aktivity měřené v přítomnosti 50 μM rotenonu.

Výsledná aktivita (SA - specifická aktivita) byla vypočtena podle vzorce:

$$SA = dA * 10^6 / \epsilon * v * c$$

dA aritmetický průměr z obou naměřených hodnot (po odečtení pozadí)

ϵ molární absorpční koeficient $19,6 * 10^3 \text{ dm}^3 / \text{cm} / \text{mol}$

v objem vzorku v μl

c koncentrace proteinu ve vzorku v mg/ml

6.2.3.4 *Komplex II-III*

Ke stanovení aktivity *sukcinát:cytochrom c reduktázy* (komplexu II-III, SCCR) byla použita reakční směs ve složení: 50 mM KPi (pH 7,8; (1)), 2 mM EDTA, 1 mg/ml BSA,

vzorek (mitochondrie), 3 μM rotenon, 10 mM sukcinát sodný, 0,2 mM ATP, 0,3 mM KCN a reakce se zahájila po 3 minutách inkubace přidáním 40 μM oxidovaného cytochromu c. Reakce se sledovala při 550 nm 1 minutu a následně se zastavila přidáním 10 mM malonátu sodného. Po 1 minutě inkubace se do směsi přidal 50 μM DBH₂ a zaznamenávala se aktivita po dobu 1 minuty. Poté se přidal do květy 1 μM antimycin a měřila se aktivita po dobu 1 minuty. První křivka byla aktivita komplexu II-III, druhá křivka byla aktivita komplexu III a třetí křivka byla inhibice komplexu III.

Výsledná aktivita (SA - specifická aktivita) byla vypočtena podle vzorce:

$$SA = dA * 10^6 / \varepsilon * v * c$$

- dA aritmetický průměr z obou naměřených hodnot (po odečtení pozadí)
- ε molární absorpční koeficient $19,6 * 10^3 \text{ dm}^3 / \text{cm} / \text{mol}$
- v objem vzorku v μl
- c koncentrace proteinu ve vzorku v mg/ml

6.2.3.5 *Komplex III*

Aktivita *ubichinol: cytochrom c reduktázy* (komplexu III, QCCR) byla měřena v reakční směsi obsahující 50 mM KPi (pH 7,8; (1)), 2 mM EDTA, 1 mg/ml BSA, 0,3 mM KCN, 40 μM cytochrom c a vzorek (mitochondrie). Reakce byla zahájena přidávkem 50 μM ubichinolu (DBH₂). Nárůst absorbance při 550 nm v důsledku redukce cytochromu byl zaznamenáván 3 minuty. Aktivita tohoto komplexu může být také sledována v návaznosti na měření aktivity komplexu II-III.

Výsledná aktivita (SA - specifická aktivita) byla vypočtena podle vzorce:

$$SA = dA * 10^6 / \varepsilon * v * c$$

- dA aritmetický průměr z obou naměřených hodnot (po odečtení pozadí)
- ε molární absorpční koeficient $19,6 * 10^3 \text{ dm}^3 / \text{cm} / \text{mol}$
- v objem vzorku v μl
- c koncentrace proteinu ve vzorku v mg/ml

6.2.3.6 *Komplex IV*

Pro stanovení *cytochrom c oxidázy* (komplexu IV, COX) se použila reakční směs obsahující 40 mM KPi (pH 7,0; (3)), 1 mg/ml BSA, 25 μM redukovaný cytochrom c, 2,5 mM laurylmaltosid a vzorek (homogenát/ mitochondrie), kterým byla reakce startována a sledována 1 minutu. Konkrétně se sledoval pokles absorbance při 550 nm.

Výsledná aktivita (SA - specifická aktivita) byla vypočtena podle vzorce:

$$SA = dA * 10^6 / \epsilon * v * c$$

dA aritmetický průměr z obou naměřených hodnot

ϵ molární absorpční koeficient $19,6 * 10^3 \text{ dm}^3 / \text{cm} / \text{mol}$

v objem vzorku v μl

c koncentrace proteinu ve vzorku v mg/ml

Specifická aktivita (SA) je vztažena na množství proteinu ve vzorku a je vyjádřena v nmol/min/mg proteinu.

6.2.3.7 *Citrátsyntáza*

Aktivita *citrátsyntázy* (CS) byla stanovena v reakční směsi ve složení: 100 mM TRIS/HCl (pH 8,1), 0,1 mM DTNB (5,5-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid)), 2,5 mM laurylmaltosid, vzorek (homogenát/ mitochondrie) a 0,5 mM acetylkoenzym A. Po zaznamenání pozadí při 412 nm po dobu 2 minut byla reakce startována přidávkem 0,5 mM oxalacetátu. Výpočet aktivity se provedl po odečtení pozadí.

Výsledná aktivita (SA - specifická aktivita) byla vypočtena podle vzorce:

$$SA = dA * 10^6 / \epsilon * v * c$$

dA aritmetický průměr z obou naměřených hodnot (po odečtení pozadí)

ϵ molární absorpční koeficient $13,6 * 10^3 \text{ dm}^3 / \text{cm} / \text{mol}$

v objem vzorku v μl

c koncentrace proteinu ve vzorku v mg/ml

Specifická aktivita (SA) je vztažena na množství proteinu ve vzorku a je vyjádřena v nmol/min/mg proteinu.

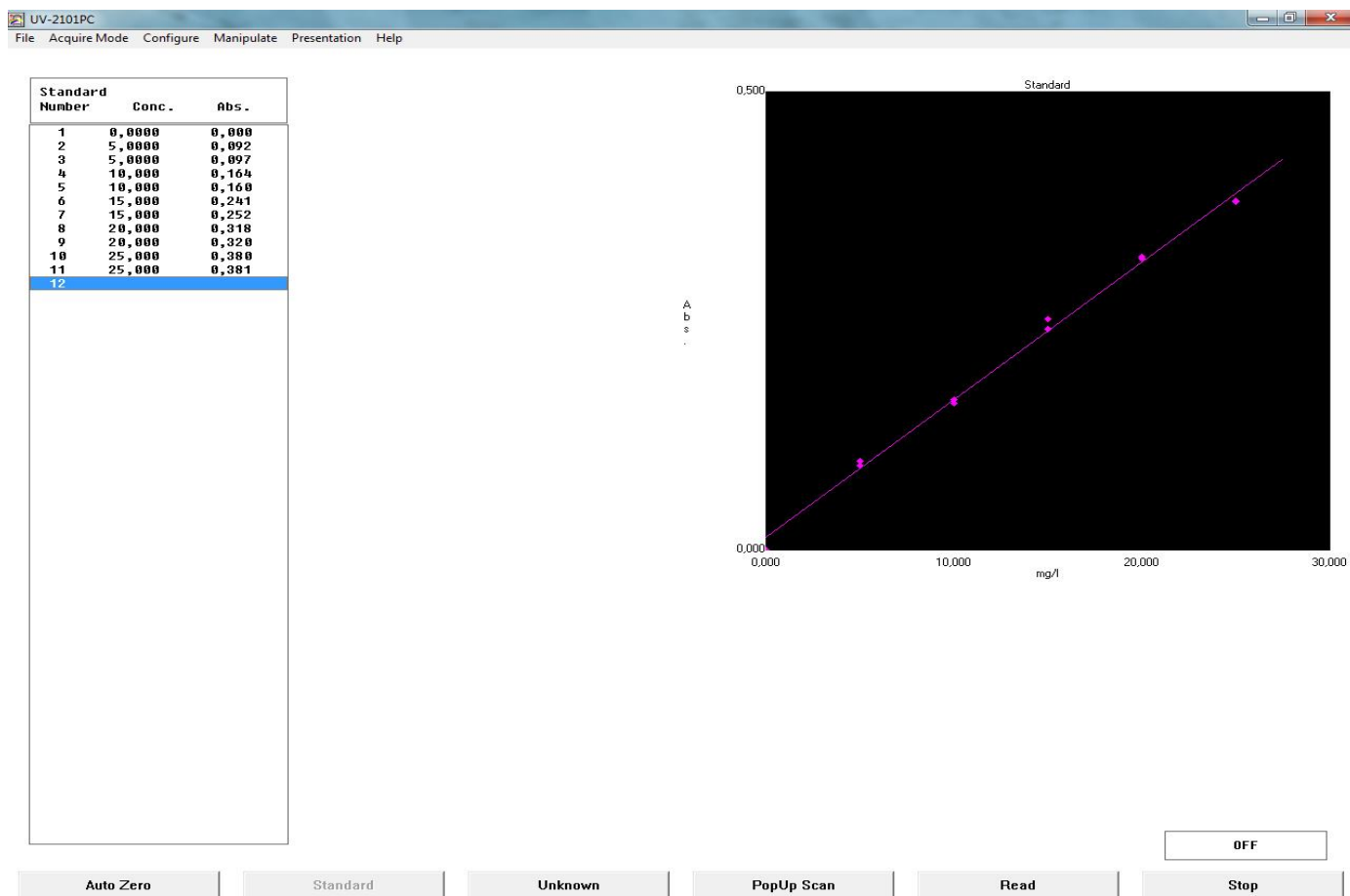
6.2.4 Stanovení koncentrace proteinů metodou dle Lowryho

Z homogenátu vzorku ředěného destilovanou vodou v poměru 1:1 bylo odebráno 2 x 5 μ l a 2 x 7 μ l pro čtyři nezávislá měření (výsledná koncentrace proteinu v daném vzorku poté byla vypočítána jako průměr těchto čtyř měření). Pro suspenzi mitochondrií (již naředěnou 15x v médiu KTEA) byl použit stejný postup. Dále bylo 5 μ l resp. 7 μ l ředěného vzorku doplněno destilovanou vodou na objem 200 μ l. K takto připraveným vzorkům byl přidán 1 ml směsi, vzniklé smícháním zásobních roztoků Lowry A:B:C v poměru 48:1:1. Vzorky byly promíchány pomocí „vortexu“ a inkubovány 15 min při laboratorní teplotě. Poté bylo ke každému vzorku přidáno 100 μ l čerstvě naředěného Folinova reagens s destilovanou vodou v poměru 1:1, promícháno pomocí „vortexu“ a inkubováno 30 min při laboratorní teplotě. Následně byla změřena absorbance pomocí spektrofotometru UV-2101PC při 700 nm.

Jako kalibrační křivka pro odečtení koncentrace proteinu byla použita koncentrační řada hovězího sérového albuminu (BSA): 5, 10, 15, 20, 25 μ g (viz obrázek 7).

Výpočet výsledné koncentrace proteinu v mg/ml byl proveden takto:

$$c(\text{prot.}) = (\text{konc. odečtená z kalibrační křivky} / \text{objem vzorku v } \mu\text{l}) * \text{ředění vzorku}$$



Obrázek 7: Vzor pětibodové kalibrační křivky BSA pro stanovení koncentrace proteinu při 700nm v programu UV-2101PC Shimadzu (vlevo tabulka hodnot absorbance při koncentraci 5 - 25 ug; vpravo kalibrační křivka sestavená z těchto dat, resp. lineární regresní přímka proložená získanými body).

7. Výsledky

Byla provedena izolace homogenátu a mitochondriální frakce z nativního svalu celkem u 11 pacientů s podezřením na mitochondriální onemocnění a u 5 kontrolních vzorků od osob, u kterých nebylo prokázáno mitochondriální onemocnění (viz tabulka č. 3).

V nezamraženém homogenátu a mitochondriální frakci bylo provedeno spektrofotometrické měření komplexů COX, SCCR, NCCR, NQR, SQR, QCCR a CS, vypočítané hodnoty jsou uvedeny v tabulkách č. 4-6.

Výsledky byly porovnány s referenčními rozmezími používanými v LPSMP pro jednotlivé věkové skupiny (viz tabulka č. 7).

V souboru 5 dospělých pacientů byla v homogenátu zjištěna 1x hraniční hodnota komplexu IV (COX) a 4 vzorky byly bez patologického nálezu (viz tabulka č.8). V mitochondriální frakci byla zjištěna 2x normální hodnota enzymů, 1x snížený komplex I (NQR) a I-III (NCCR) svědčící pro poruchu komplexu I (NQR). Ve dvou případech byla nalezena zvýšená hodnota aktivit vybraných komplexů OXPHOS (viz tabulka č.8). Následně bylo primární MO na molekulárně-genetické úrovni (*molekulárně-genetické analýzy byly provedeny pracovníky LPSMP*) potvrzeno u pacienta P3 s poruchou komplexu I (NQR) (viz tabulka č. 8). U pacienta P4 a P5 vyšetření dospělo k podezření na sekundární MO při základním svalovém onemocnění. U pacienta P1 a P2 bylo MO vyloučeno.

V souboru pacientů dětského věku byla v homogenátu nalezena 1x snížená aktivita komplexu IV (COX), 2x hraniční aktivita komplexu IV (COX) a i poměru COX/CS a u 3 pacientů byl nález v normě. V mitochondriích byly u 2 pacientů nalezeny snížené hodnoty komplexu I (NQR) a /nebo I-III (NCCR) svědčící pro defekt komplexu I (NQR). U jednoho pacienta byl nalezen významně snížený komplex IV (COX) včetně poměru COX/CS svědčící pro poruchu komplexu IV (COX). U 2 pacientů byla pouze hraniční hodnota komplexu IV (COX) nebo COX/CS a 1x bylo měření aktivit komplexů dýchacího řetězce ve svalu bez patologického nálezu (viz tabulka č.8).

Biochemické výsledky přispěly k definitivnímu určení diagnózy na molekulárně-genetické úrovni u pacienta D4 s poruchou komplexu I (NQR), kdy byla identifikována mutace v mtDNA v ND5. U pacienta D5 byla potvrzena primární MO s nukleární

etiologií – byla nalezena mutace v *SURF1* genu, který kóduje asemblační protein pro komplex IV (COX). U pacientů D1 a D2 podezření pro primární MO trvá a nyní probíhají analýzy na Mitoexomu. U pacienta D3 hraniční změny v aktivitě komplexu IV (COX) vznikly sekundárně v důsledku primární myopatie. U pacienta D6 byla MO vyloučena (viz tabulka č. 8).

Tabulka 3: Základní údaje ke vzorkům pacientů a kontrol - vstupní hmotnost tkáně a změřené koncentrace celkového proteinu ve svalovém homogenátu/ mitochondriích

Vzorek označen:	Vstupní množství svalové tkáně (mg):	Koncentrace proteinu ve svalovém homogenátu (mg/ml):	Koncentrace proteinu v mitochondriích (mg/ml):
K1	600	7,79	36,45
K2	670	6,89	25,85
K3	520	8,34	35,10
K4	420	5,97	20,84
K5	500	6,72	27,04
K6	360	7,76	28,30
D1	205	6,54	20,70
D2	288	6,01	17,17
D3	97	4,87	10,00
D4	151	4,94	29,78
D5	130	4,53	21,45
D6	130	6,51	18,90
P1	70	7,58	12,10
P2	260	6,39	31,94
P3	216	5,41	36,90
P4	234	8,83	16,16
P5	261	6,11	30,10

Tabulka 4-6: Aktivita komplexů dýchacího řetězce a citrát syntázy v nativním kosterním svalu od 11 pacientů (B, C) s podezřením na mitochondriální onemocnění a od 6 kontrol (A)

4. (A).

			AKTIVITA ENZYMU (nmol/min/mg proteinu)											
			HOMOGENÁT		MITOCHONDRIE						HOMOGENÁT		MITOCHONDRIE	
VZOREK	POHLAVÍ	VĚK (roky)	COX	CS	COX	CS	SCCR	NCCR	NQR	SQR	QCCR	COX/ CS	COX/ CS	
<i>K1</i>	<i>muž</i>	68	133	130	616	496	196	47	58	42	554	1,03	1,24	
<i>K2</i>	<i>muž</i>	56	136	103	896	736	191	70	212	129	802	1,32	1,22	
<i>K3</i>	<i>muž</i>	57	61	84	561	346	125	51	113	41	527	0,74	1,62	
<i>K4</i>	<i>žena</i>	62	125	89	908	565	118	71	247	60	599	1,41	1,61	
<i>K5</i>	<i>muž</i>	59	168	165	1227	1189	175	315	141	50	770	1,02	1,03	
<i>K6</i>	<i>žena</i>	63	160	111	883	621	276	154	184	37	847	1,45	1,42	

5.(B.)

			AKTIVITA ENZYMU (nmol/min/mg proteinu)											
			HOMOGENÁT		MITOCHONDRIE						HOMOGENÁT		MITOCHONDRIE	
VZOREK	POHLAVÍ	VĚK (roky)	COX	CS	COX	CS	SCCR	NCCR	NQR	SQR	QCCR	COX/ CS	COX/ CS	
<i>D1</i>	<i>žena</i>	3	146	161	996	668	132	50	196	80	663	0,90	1,49	
<i>D2</i>	<i>muž</i>	2	63	81	612	573	96	47	426	43	467	0,78	1,07	
<i>D3</i>	<i>muž</i>	3	103	117	829	522	249	160	321	86	494	0,88	1,59	
<i>D4</i>	<i>žena</i>	2	185	212	601	536	140	42	30	37	384	0,87	1,12	
<i>D5</i>	<i>žena</i>	2	43	201	70	402	122	75	106	43	412	0,21	0,17	
<i>D6</i>	<i>muž</i>	5 m.*	47	87	360	367	163	90	203	58	372	0,54	0,98	

6. (C.)

			AKTIVITA ENZYMU (nmol/min/mg proteinu)											
			HOMOGENÁT		MITOCHONDRIE							HOMOGENÁT	MITOCHONDRIE	
VZOREK	POHLAVÍ	VĚK (roky)	COX	CS	COX	CS	SCCR	NCCR	NQR	SQR	QCCR	COX/ CS	COX/ CS	
P1	žena	38	147	103	702	373	134	136	253	53	459	1,42	1,88	
P2	muž	40	196	154	1112	823	208	229	160	85	705	1,27	1,35	
P3	muž	35	348	267	926	884	201	12	99	42	635	1,30	1,05	
P4	žena	62	53	64	895	1063	399	170	209	100	1181	0,83	0,84	
P5	muž	18	167	167	926	1062	494	221	290	71	812	1,00	0,87	

Tabulka 7: Referenční rozmezí pro aktivity komplexů dýchacího řetězce v kosterním svalu

AKTIVITA ENZYMU (nmol/min/mg proteinu) – Referenční rozmezí												
	HOMOGENÁT		MITOCHONDRIE							HOMOGENÁT	MITOCHONDRIE	
věk	COX	CS	COX	CS	SCCR	NCCR	NQR	SQR	QCCR	COX/CS	COX/CS	
do 2 let	53-197	85-144	287-1077	200-640	50-206	42-156	194-354	20-108	100-217	0,6-1,48	1,1-2,22	
2 – 18 let	120-228	108-177	825-1500	528-938	97-267	100-287	118-282	28-94	321-640	0,85-1,65	1,16-2,13	
nad 18 let	68-213	48-128	658-1552	435-1234	82-251	126-316	110-290	21-93	>200	0,74-4,08	0,66-2,25	

Poznámka: hodnoty jsou převzaty z LPSMP

Vysvětlivky:

COX = cytochrom c oxidáza (komplex IV)

NCCR = NADH:cytochrom c oxidoreduktáza (rotenon senzitivní; komplex I-III)

CS = citrátsyntáza

NQR = NADH:koenzym Q oxidoreduktáza (rotenon sensitivní; komplex I)

SQR = sukcinát:koenzym Q oxidoreduktáza (komplex II)

SCCR = sukcinát:cytochrom c oxidoreduktáza (komplex II-III)

QCCR = QH₂:cytochrom c oxidoreduktáza (komplex III) * m. = měsíce

Tabulka 8: Přehled hodnocení získaných nálezů u pacientů ve svalové biopsii v korelaci s konečnou diagnózou

Pacient	Hodnocení nálezu - homogenát	Hodnocení nálezu - mitochondrie	Konečná diagnóza/ závěr
D1	bpn	↓ NCCR	Suspektní MO, analýza Mitoexom
D2	bpn	bpn	Suspektní MO, analýza Mitoexom
D3	~ COX	~ COX	Sekundární mitopatie při kongenitální myopatii
D4	bpn	↓ NQR a NCCR	Primární MO, porucha NQR, mutace mtDNA v <i>ND5</i>
D5	↓ COX a COX/CS	↓ NQR, COX a COX/CS	Primární MO, porucha COX, Mutace <i>SURF1</i> genu
D6	~ COX a COX/CS	~ COX/CS	Není MO
P1	bpn	↓ CS, bpn	Není MO
P2	bpn	bpn	Není MO
P3	bpn	↓ NQR a NCCR	Primární MO, porucha NQR mutace mtDNA v <i>ND5</i>
P4	~ COX	↑ SQR, SCCR a QCCR	Sekundární mitopatie při primární myopatii
P5	bpn	~ COX/CS ↑ QCCR	Sekundární mitopatie při primární myopatii

Vysvětlivky: ~ = hraniční výsledek; ↓ = snížená hodnota; ↑ = zvýšená hodnota; bpn = bez patologického nálezu

Poznámka: molekulárně-genetické analýzy byly provedeny pracovníky LPSMP.

8. Diskuze

Homogenizace svalu a izolace mitochondrií se provádí v den odběru (biopsie), používá se tedy nativní sval. Měření COX a CS se provádí paralelně ve svalovém homogenátu i mitochondriích z důvodu potřeby kontroly kvality přípravy mitochondriální frakce. Pokud vyjde CS v mitochondriální frakci nízká a v homogenátu normální, je třeba brát v potaz možnost poškození mitochondriální membrány během izolace (vylití CS do izolačního média) nebo z důvodu jiného primárního svalového onemocnění (atrofie svalové buňky a snížená odolnost mitochondriální membrány vůči homogenizaci).

Enzymologie se stále řadí mezi zlatý standard a provádí se vždy při podezření na MO. Výhodou je analýza celého spektra enzymů dýchacího řetězce. Metoda je také unikátní v tom, že stačí pouze malé množství materiálu na analýzu aktivity enzymu (pouhý 1 μ l mitochondrií), což je opravdu minimální spotřeba materiálu. Pro konečné hodnocení biochemického nálezu je vhodné výsledky spektrofotometrického měření korelovat s dalšími biochemickými analýzami (oxygraf, oxidace substrátů), pokud jsou k dispozici.

Měření enzymatických aktivit pomocí spektrofotometrie umožňuje měřit aktivity v prostředí, kde máme k dispozici všechny substráty v nadlimitním množství, kdežto např. u oxygrafu se analýza provádí v prostředí, které je blíže fyziologickému stavu buňky, ale na provedení je mnohem složitější, vyžaduje zkušeného pracovníka a složitější technické zázemí. Enzymatické vyšetření je stěžejní ve svalové biopsii, ale lze ho provádět i v jiném dostupném materiálu (kultivované fibroblasty, izolované lymfocyty), v případě úmrtí pacienta i v dalších tkáních.

Výsledky od pacientů, u kterých nebylo prokázáno MO, budou použity pro rozšíření souboru našich (LPSMP) kontrolních hodnot. Referenční rozmezí se liší dle věku. Výsledky se také mohou lišit v závislosti na tom, zda se pro analýzu použije nativní sval nebo zamražený sval. Proto je třeba vždy zvolit správné referenční rozmezí.

V obou testovaných skupinách pacientů byly výsledky enzymatického měření aktivit komplexů OXPHOS základem pro další diferenciatně-diagnostickou rozvahu. Zároveň byly korelovány s dalšími biochemickými výsledky. U 3 pacientů s primárním MO známe již molekulárně-genetickou podstatu onemocnění, a tudíž je možno postiženým rodinám nabídnout genetické poradenství.

9. Závěr

V této bakalářské práci byly porovnány současné možnosti a metody analýzy systému OXPHOS na úrovni kosterního svalu u pacientů s podezřením na MO.

V souboru 11 pacientů s podezřením na primární MO byla provedena analýza svalové biopsie, která zahrnovala izolaci mitochondriální frakce a měření aktivit komplexů: cytochrom c oxidázy (komplex IV, COX), NADH:koenzym Q oxidoreduktázy (rotenon sensitivní; komplex I, NQR), sukcinát:koenzymQ oxidoreduktázy (komplex II, SQR), sukcinát:cytochrom c oxidoreduktázy (komplex II-III, SCCR), QH₂:cytochrom c oxidoreduktázy (komplex III, QCCR), NADH:cytochrom c oxidoreduktázy (rotenon senzitivní; komplex I-III, NCCR) a citrátsyntázy (CS) pomocí spektrofotometrie.

Zároveň byly analyzovány vzorky svalů v souboru 5 pacientů s primárním podezřením na mitochondriální vadu, která se však posléze nepotvrdila a tudíž tento soubor rozšířil stávající soubor kontrol využívaných v LPSMP.

U 3 pacientů se na základě analýz, které byly součástí této práce, podařilo zacílit diagnostickou rozvahu na analýzu konkrétního genu. Jednalo se o jednoho pacienta s poruchou COX, kde příčinou onemocnění byla mutace v *SURF1* genu. U dvou pacientů s poruchou komplexu I (NQR) byly následně potvrzeny mutace v *ND5* genu mitochondriální DNA. Na základě našich výsledků je možné nabídnout rodinám genetické poradenství.

10. Použitá literatura

Azzu, V., and Brand, M.D. (2010). The on/off switches of the mitochondrial uncoupling proteins. *Trends Biochem. Sci.* 35, s. 298–307.

Baradaran, R. et al. (2013). Crystal structure of the entire respiratory complex I. *Nature*, 494(7438), s. 443–8.

Boyer, P.D., 1997. The ATP synthase--a splendid molecular machine. *Annual review of biochemistry*, 66, s. 717–49.

Brzezinski, P. & Gennis, R.B. (2008). Cytochrome c oxidase: exciting progress and remaining mysteries. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 40(5), s. 521–31.

Cree, L.M., Samuels, D.C., and Chinnery, P.F. (2009). The inheritance of pathogenic mitochondrial DNA mutations. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1792, 1097–1102.

Crofts, A.R. et al. (2008). The Q-cycle reviewed: How well does a monomeric mechanism of the bc₁ complex account for the function of a dimeric complex? *Biochimica et biophysica acta*, 1777(7-8), s. 1001–19.

DiMauro, S. (1996). Mitochondrial myopathies: what next? *J Inher Metab Dis* 19, s. 489–503.

DiMauro, S., Schon, E. A. (2003). Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N. Engl. J. Med.* 348, 2656–2668.

Fadic, R., Johns, D. R. (1996). Clinical spectrum of mitochondrial diseases. *Sem Neurol* 16, s. 11–22.

Fontanesi, F., Soto, I. C., Horn, D., and Barrientos, A. (2006). *Am J Physiol Cell Physiol* 291, C1129-1147.

Gillis, L., Kaye, E. (2002). Diagnosis and management of mitochondrial diseases. *Pediatr Clin N Am* 49, s. 203–219.

Goodsell, D. S. (2010). Mitochondrion. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* 38, s. 134–140.

Granata, S. et al. (2009). Mitochondrial dysregulation and oxidative stress in patients with chronic kidney disease. *BMC genomics*, 10(1), s. 388.

Iverson, T.M. (2013). Catalytic mechanisms of complex II enzymes: a structural perspective. *Biochimica et biophysica acta*, 1827(5), s. 648–57.

Janssen, A. J. M., Trijbels, F. J. M., Sengers, R. C. A., Wintjes, L. T. M., Ruitenbeek, W., Smeitink, J. A. M., Morava, E., Engelen, B. G. M. van, Heuvel, L.P. van den, Rodenburg, R. J. T. (2006). Measurement of the Energy-Generating Capacity of Human Muscle Mitochondria: Diagnostic Procedure and Application to Human Pathology. *Clin. Chem.* 52, s. 860–871.

Kelley, D. E., He, J., Menshikova, E. V., Ritov, V. B. (2002). Dysfunction of Mitochondria in Human Skeletal Muscle in Type 2 Diabetes. *Diabetes*. 51(10), s. 2944-2950. Dostupné také z: <http://diabetes.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/diabetes.51.10.2944>

McFarland, R., Taylor, R. W., Turnbull, D. M. (2002). The neurology of mitochondrial DNA disease. *Lancet Neurol* 1, s. 343–351.

Metabolic disease. (2016). *Encyclopædia Britannica*. [online]. [cit. 2016-08-03]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/metabolic-disease/Disorders-of-lipid-metabolism>.

Mitchell, P., 1961. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*, 191, s. 144–8.

Neuromuscular disease center. (2015). Melas pathology: Muscle fiber pathology. [online]. USA: Washington University, [cit. 2016-08-01]. Dostupné z: <http://neuromuscular.wustl.edu/pathol/melas.htm>

Nicholls, D. G. & Ferguson, S. J. (2013). *Bioenergetics 4th*, Elsevier.

Rollins, S., Prayson, R. A., McMahon, J. T., Cohen, B. H. (2001). Diagnostic yield muscle biopsy in patients with clinical evidence of mitochondrial cytopathy. *Am J Clin Pathol* 116(3), s. 326–330.

Rustin, P., Chretien, D., Bourgeron, T., Gérard, B., Rötig, A., Saudubray, J.M., Munnich, A. (1994). Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin. Chim. Acta* 228, s. 35–51.

Shmoop Editorial Team. (2008). Mitochondrial Membranes - Shmoop Biology. [online]. [cit. 2016-07-08]. Dostupné z: <http://www.shmoop.com/biology-cells/mitochondrial-membrane.html>

Schagger, H., von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem.* 166, s. 368-379.

Schagger, H., von Jagow, G. (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* 199, s. 223-231.

Sperl, W. (1997). Diagnosis and therapy of mitochondriopathies. *Wien Klin Wochenschr* 109, s. 93–99.

The Mitochondrial Disease Foundation. (2003). Pittsburgh.info@umdf.org

Venditti, P., Di Stefano, L., and Di Meo, S. (2013). Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Mitochondrion* 13, s. 71–82.

Vinothkumar, K. R., Zhu, J. & Hirst, J. (2014). Architecture of mammalian respiratory complex I. *Nature*, 515(7525), s. 80–84.

Walker, U. A., Collins, S., and Byrne, E. (1996). Respiratory Chain Encephalomyopathies: A Diagnostic Classification. *Eur. Neurol.* 36, s. 260–267.