Kwantifisering van Mitochondriale Respirasie om Aangebore Mitochondriale Defekte te Ondersoek

D.J. Pieterse

B.Sc. Honns.

Verhandeling voorgelê ter gedeeltelike voldoening aan die vereistes vir die graad Magister Scientiae in Biochemie in die Fakulteit Natuurwetenskappe aan die Potchefstroomse Universiteit vir Christelike Hoër Onderwys

Studieleier: Mnr. S.J. Steyn
Medeleier: Prof. P.J. Pretorius

Potchefstroom
1999

Inhoudsopgawe

		Bladsy
ABSTRACT		i
OPSOMMING		iv
BEDANKINGS		vii
HOOFSTUK 1: INLEIDING		1
HOOFSTUK 2: LITERATUUROORSIG		3
2.1	Inleiding	3
2.2	Energiegenerering in die Eukariotiese sel	5
	2.2.1 Die Mitochondrion	5
	2.2.2 Oorsig van Elektrontransport	6
	2.2.3 Kofaktore in Elektrontransport	7
	2.2.4 Komplekse van die Mitochondriale Respiratorieseketting	8
	2.2.4.1 Kompleks I: NADH-ubiquinoon Oksidoreduktase	8
	2.2.4.2 Kompleks II: Suksinaat-ubiquinoon Oksidoreduktase	9
	2.2.4.3 Kompleks III: Ubiquinool-sitochroom c Oksidoreduktase	10
	2.2.4.4 Kompleks IV: Sitochroom c Oksidase	11
	2.2.4.5 Kompleks V: ATP sintase	12
2.3	Mitochondriaalgeassosieerde Defekte	15
	2.3.1 Defekte van Kompleks I	19
	2.3.1.1 Bilaterale Kinder Kataraktogenesis	20
	2.3.2 Defekte van Kompleks III	21
	2.3.2.1 De Toni-Debre-Fanconisindroom	21
	2.3.3 Defekte van Kompleks IV	22
	2.3.3.1 Barthsindroom	22
	2.3.3.2 Leigh se siekte	23
	2.3.4 Diagnostiese Toetse	24
	2.3.4.1 Siftingstoetse	24

2.3.4.2 Ensiemtoetse.. 26
2.4 Probleemstelling en Doelstelling.. 28

HOOFSTUK 3: EKSPERIMENTELE METODES.............................. 30
3.1 Inleiding.. 30
3.2 Kwantifisering van Mitochondriale Respirasie............................ 30
3.2.1 Agtergrond.. 30
3.2.2 Verskillende benaderingswyses om mitochondriale respirasie te kwantifiseer.. 31
3.2.3 Samevatting.. 32
3.3 Kwantifisering van *in situ* mitochondriale respirasie in digitonien deurlaatbaargemaakte eukariotiese selle.................................. 34
3.3.1 Deurlaatbaarmaking van eukariotiese selle met digitonien...... 34
3.3.2 Beginsel van kwantifisering van *in situ* mitochondriale respirasie.. 36
3.3.3 Die beginsel van luminometriese kwantifisering van ATP...... 38
3.4 Optimalisering van kondisies vir die *in situ* kwantifisering van mitochondriale respirasie.. 39
3.4.1 Kweking en voorbereiding van N-2α neuroblastomaselle 39
3.4.2 Bepaling van die lineêre gebied vir ATP kwantifisering met Lusiferase-lusiferien.. 40
3.4.3 Ekstraksie van ATP vanuit eukariotiese selle..................... 41
3.4.3.1 Bepaling van die hoeveelheid TCA wat benodig word om ATP uit N-2α neuroblastomaselle vry te stel......... 41
3.4.4 Bepaling van die optimum digitonienkonsentrasie om N-2α neuroblastomaselle selektief deurlaatbaar te maak.............. 42
3.4.5 Optimalisering van kondisies vir ATP produksie deur kompleks I.. 43
3.4.5.1 Kompleks I substraatkonsentrasie......................... 43
3.4.5.2 Lineêriteit van ATP produksie deur kompleks I........ 43

3.4.6 Optimalisering van kondisies vir ATP produksie deur kompleks III deur gliserol-3-fosfaatdehidrogenase.............. 44
3.4.6.1 Kompleks III substraatkonsentrasie........................ 44
3.4.6.2 Lineêriteit van ATP produksie deur kompleks III deur gliserol-3-fosfaatdehidogenase............................. 44
3.4.7 Optimalisering van kondisies vir ATP produksie deur kompleks IV... 45
3.4.7.1 Kompleks IV substraatkonsentrasie........................ 45
3.4.7.2 Lineêriteit van ATP produksie deur kompleks IV........ 46
3.4.8 ATP produksie in die teenwoordigheid van kompleksspesifieke inhibeerders................................ 46
3.4.9 Opsomming van die optimalisering van die *in situ* kwantifisering van mitochondriale respirasie.................... 47
3.5 Kweking en voorbereiding van fibroblaste vir mitochondriale respirasie analises.. 48
3.6 Kliniese beelde.. 48
3.6.1 Kliniese beeld van baba RV....................................... 48
3.6.2 Kliniese beeld van baba CT....................................... 49
3.7 Isolering van mitochondriale komplekse uit fibroblaste................ 49
3.8 Bepaling van die aktiwiteit van geïsoleerde mitochondriale komplekse.. 50
3.8.1 Kompleks II en III: Suksinaat-sitochroom c oksidoreduktase. 50
3.8.2 Kompleks IV: Ferrositochroom c: Suurstof oksidoreduktase. 51
3.8.3 Sitraatsintase.. 51
3.9 Samevatting.. 52

HOOFSTUK 4: RESULTATE.. 53
4.1 Inleiding.. 53
4.2 Resultate van die optimalisering van die kondisies vir die *in situ* kwantifisering van mitochondriale respirasie.......................... 53

4.2.1 Bepaling van die lineêre gebied vir ATP kwantifisering met lusiferase-lusiferien.. 53

4.2.2 Bepaling van die hoeveelheid TCA wat benodig word om ATP uit N-2α neuroblastomaselle vry te stel.................... 54

4.2.3 Bepaling van die optimum digitonienkonsentrasie om N-2α neuroblastomaselle selektief deurlaatbaar te maak............ 55

4.2.4 Optimum kondisies vir ATP produksie deur kompleks I...... 56

4.2.4.1 Kompleks I substraatkonsentrasie........................ 56

4.2.4.2 Lineêriteit van ATP produksie deur kompleks I......... 57

4.2.5 Optimalisering van kondisies vir ATP produksie deur kompleks III deur gliserol-3-fosfaatdehidrogenase............... 58

4.2.5.1 Kompleks III substraatkonsentrasie........................ 58

4.2.5.2 Lineêriteit van ATP produksie deur kompleks III deur gliserol-3-fosfaatdehidogenase............................ 59

4.2.6 Optimalisering van kondisies vir ATP produksie deur kompleks IV.. 60

4.2.6.1 Kompleks IV substraatkonsentrasie....................... 60

4.2.6.2 Lineêriteit van ATP produksie deur kompleks IV........ 62

4.2.7 ATP produksie in die teenwoordigheid van komplekspesifieke inhibeerders................................ 63

4.2.8 Optimalisering van die *in situ* kwantifisering van mitochondriale respirasie in fibroblaste........................... 64

4.3 *In situ* mitochondriale respirasie analises................................ 65

4.4 *In vitro* mitochondriale respirasie analises............................... 68

4.5 Samevatting.. 69

HOOFSTUK 5: BESPREKING.. 70

5.1 Inleiding.. 70

5.2 Kwantifisering van mitochondriale respirasie............................ 70

5.3 *In situ* en *in vitro* mitochondriale respirasie analises..................... 75

5.3.1 Baba RV 75
5.3.2 Baba CT 77
5.4 Weefselspesifieke uitdrukking van mitochondriale defekte 79
5.5 Samevatting 79

BYLAAG 1 81

LITERATUURVERWYSINGS 93

LYS VAN AFKORTINGS 105

Abstract

QUANTIFICATION OF MITOCHONDRIAL RESPIRATION TO DETERMINE INHERITED MITOCHONDRIAL DEFECTS

Original Title: Kwantifisering van Mitochondriale Respirasie om Aangebore Mitochondriale Defekte te Ondersoek.

Genetic defects of oxidative phosphorylation account for a large variety of clinical symptoms in childhood. The mitochondrial respiratory chain catalyses the oxidation of fuel molecules with the concomitant energy transduction into ATP. During the oxidation process electrons are transferred to oxygen via the energy transducing complexes of the respiratory chain. When a defect occurs in one of these complexes of the respiratory chain, the electrons can not be transferred through that complex and less electrons are transferred to oxygen and consequently less ATP is produced. The diagnosis of respiratory chain deficiencies are difficult because the complexes are coded for by both chromosomal and mitochondrial DNA. The Metabolic Laboratory of the Biochemistry and Microbiology department at the PU for CHE is involved in the diagnoses and detection of inherited metabolic defects, therefor there is a need for a standardised method with which an inherited metabolic defect can be traced in patients.

Many different methods for the quantification of mitochondrial respiration were examined. Mitochondrial respiration can for example be measured with polarography as a function of the amount of oxygen used or the amount of ATP produced over a certain time. The activities of the different mitochondrial complexes can also be quantified separately. Due to the difficulty in obtaining tissue (like muscle tissue) from paediatric patients we decided to determine mitochondrial respiration *in situ* in fibroblasts. The method has the advantage that the mitochondria don't have to be isolated and that several tests can be done with a small amount of tissue. It is also a lot easier to get fibroblasts than it is to get paediatric muscle tissue.

The cells are made permeable with digitonin so that the mitochondrial complex specific substrates can reach the mitochondria in the cells. We decided to quantify the amount of ATP produced in a certain time by the use of a luciferase-luciferin enzyme system. The method is very sensitive yet very easy to perform. We decided to standardise the method for quantification of *in situ* mitochondrial respiration due to the variations found in literature concerning this method. The aspects that were standardised included the determination of the optimum concentration digitonin to permeabilise the fibroblasts, optimisation of the luciferase-luciferin enzyme reaction, optimisation of the extraction of ATP from cells, determination of the optimum substrate concentration for the different complexes as well as the linear range for each reaction. In addition, with the use of complex specific inhibitors, it was necessary to determine to what extent the various mitochondrial complexes are specifically responsible for the observed respiration.

The *in situ* method for ATP quantification, after standardisation, was used on fibroblasts from people who seemed to have no defects, for the determination of control values. The method was then tested and evaluated on fibroblasts from two patients with possible inherited metabolic diseases. The one patient was diagnosed with a possible cytochrome c oxidase defect and the other patient with a possible complex I defect. Both the patients' respiration values for the involved complexes were lower than the control respiration values. These results were verified by determining the respiration activities of the individual complexes through classical *in vitro* analyses. With this, a technique was standardised with which mitochondrial respiration defects can be examined in for example paediatric patients.

Results of this study were presented at the following local and international congresses:

PIETERSE, D.J., STEYN, S.J. & PRETORIUS, P.J.
Quantification of *in situ* Mitochondrial Respiration as an aid to Determine Induced and Inherited Mitochondrial Defects.
First one day Biochemistry Symposium between the University of the Free State and the Potchefstroom University for Christian Higher Education, Bloemfontein, June 1997

PIETERSE, D.J., STEYN, S.J. & PRETORIUS, P.J.
Quantification of Mitochondrial Respiration to Determine Inherited Mitochondrial Defects.
Biochemistry in Africa, 2nd International congress of FASBMB and the 15th congress of SASBMB, Potchefstroom, 30 September - 3 October 1998.

Opsomming

KWANTIFISERING VAN MITOCHONDRIALE RESPIRASIE OM AANGEBORE MITOCHONDRIALE DEFEKTE TE ONDERSOEK

Genetiese defekte van die oksidatiewe fosforilasiesisteem is verantwoordelik vir 'n verskeidenheid kliniese beelde by kinders. Die mitochondriale respiratorieseketting kataliseer die oksidasie van energieryke molekules en die energie wat uit hierdie oksidasie reaksie voortspruit, word gebruik om ATP te produseer. Gedurende die oksidasieproses word elektrone aan molekulêre suurstof oorgedra deur die funksionele komplekse waaruit die respiratorieseketting bestaan. Wanneer 'n defek in een van hierdie komplekse van die respiratorieseketting voorkom, kan min of geen elektrone deur die betrokke kompleks vloei en minder elektrone word aan suurstof oorgedra en gevolglik word ook minder ATP geproduseer. Die diagnose van 'n respiratorieseketting defek is moeilik om te maak aangesien die afsonderlike meting van elke kompleks se aktiwiteit besonder kompleks is. Hierbenewens word die komplekse van die respiratorieseketting deur beide chromosomale en mitochondriale DNA gekodeer. Die Metabolisme Laboratorium van die departement Biochemie en Mikrobiologie by die PU vir CHO is gemoeid met die diagnose en opsporing van aangebore metaboliese defekte. Gevolglik het daar 'n vraag na 'n eenvoudige gestandaardiseerde metode ontstaan waarmee moontlike aangebore mitochondriale defekte in pasiënte ondersoek kan word.

Verskeie metodes vir die kwantifisering van mitochondriale respirasie is ondersoek. Mitochondriale respirasie kan byvoorbeeld polarografies gemeet word as funksie van die hoeveelheid suurstof gebruik of as die hoeveelheid ATP geproduseer per tydseenheid of die aktiwiteite van die mitochondriale komplekse kan elk afsonderlik gekwantifiseer word. Tog is dit nie altyd ewe maklik om weefsel vanaf pediatriese pasiënte te verkry vir ondersoeke na moontlike mitochondriale defekte nie – veral spierweefsel. Daar is besluit om mitochondriale respirasie *in situ* te ondersoek in fibroblaste. Die metode bied die voordeel dat geen isolering van mitochondria nodig is nie en dat verskeie analises uitgevoer kan word met 'n baie klein hoeveelheid sellulêre materiaal sonder ernstige

ingrepe om byvoorbeeld pediatriese spierweefsel te verkry. Die selle word selektief deurlaatbaar gemaak met digitonien sodat mitochondriale kompleksspesifieke substrate toegang kan verkry tot die mitochondria in die selle. Daar is verder besluit om die hoeveelheid ATP wat tydens 'n sekere tyd geproduseer is te kwantifiseer met behulp van 'n lusiferase-lusiferien ensiemsisteem. Die metode is uiters sensitief, maar tog eenvoudig om uit te voer. Aangesien daar groot variasies in die literatuur bestaan vir die uitvoering van *in situ* mitochondriale respirasie, is besluit om die kwantifisering van *in situ* mitochondriale respirasie te standaardiseer. Die aspekte wat gestandaardiseer is, sluit die bepaling van die optimum digitonienkonsentrasie, wat nodig is om fibroblaste selektief deurlaatbaar te maak, optimalisering van die lusiferase-lusiferien ensiemreaksie, optimalisering van ATP ekstraksie uit selle, bepaling van die optimum substraatkonsentrasies vir die onderskeie mitochondriale komplekse asook die tydperk waaroor hierdie reaksies lineêr verloop, in. Daar moes ook, aan die hand van kompleksspesifieke inhibeerders, bepaal word tot watter mate die onderskeie mitochondriale komplekse spesifiek verantwoordelik is vir die waargenome respirasie.

Nadat die *in situ* metode vir ATP kwantifisering gestandaardiseer is, is die metode op fibroblaste van oënskynlik normale persone toegepas vir die verkryging van normaalwaardes. Die metode is daarna getoets en geëvalueer deur van fibroblaste, wat afkomstig is van pasiënte wat moontlike aangebore mitochondriale defekte besit, gebruik te maak. Twee pasiënte is geïdentifiseer, die een met 'n moontlike sitochroom c oksidase-defek en die ander een met 'n moontlike kompleks I-defek. Beide die pasiënte se respirasiewaardes vir die betrokke komplekse was aansienlik laer as die van die kontrole waardes. Die resultate is geverifieer deur die aktiwiteit van die moontlike defektiewe mitochondriale komplekse afsonderlik te kwantifiseer volgens klassieke *in vitro* toetse. Hierdeur is daar 'n tegniek gestandaardiseer waarmee mitochondriale respirasie defekte in onder andere pediatriese pasiënte ondersoek kan word.

Hierdie werk is by die volgende plaaslike en internasionale kongresse voorgedra:

PIETERSE, D.J., STEYN, S.J. & PRETORIUS, P.J.
"Quantification of *in situ* Mitochondrial Respiration as an aid to Determine Induced and Inherited Mitochondrial Defects."
Eerste eendag Biochemie simposium tussen die Universiteit van die Vrystaat en die Potchefstroomse Universiteit vir Christelike Hoër Onderwys, Bloemfontein, Junie 1997.

PIETERSE, D.J., STEYN, S.J. & PRETORIUS, P.J.
"Quantification of Mitochondrial Respiration to Determine Inherited Mitochondrial Defects."
Biochemie in Afrika, Tweede internasionale kongres van FASBMB en die vyftiende kongres van SASBMB, Potchefstroom, 30 September - 3 Oktober 1998.

Bedankings

By die voltooiing van hierdie verhandeling wil ek graag my opregte dank en waardering uitspreek teenoor:

- **My Hemelse Vader, vir die geleentheid wat Hy my gegee het om die M.Sc. te kan voltooi. Ek verstaan nie altyd die pad wat U my laat stap nie, maar ek sal volg in U spoor.**

- My studieleier, Stefan Steyn. Baie dankie vir al jou hulp en ondersteuning. Baie dankie dat ek jou enige tyd kon pla met my oneindige vrae. Ek kon nie vir 'n beter studieleier gevra het nie.

- Prof. Piet Pretorius. Baie dankie vir al die belangstelling en aanmoediging en ook die verskeie kere wat Prof. die verhandeling deurgelees en gehelp het.

- Francois van der Westhuizen. Baie dankie vir jou hulp met die deurlees van die verhandeling en ook al die belangstelling en aanmoediging.

- Mariette van der Berg. Baie dankie vir die baie kere wat ek jou kon pla met die uitdruk en versorging van my verhandeling.

- My ouers, vir julle opoffering en geduld met my studies. Dankie dat julle nooit in my pad gestaan het nie en dat ek altyd kon weet dat julle my besluite ondersteun. Ek waardeer dit regtig baie.

- Almal by die Departement Biochemie en Mikrobiologie, dit was seker die lekkerste twee jaar van my lewe sover. Julle het dit vir my baie aangenaam gemaak om saam met julle te werk.

- Vir my beste vriende, Jacques van Onselen en Hanna du Plessis. Dankie vir die twee jaar van my M.Sc. wat jy met my gedeel het. Geen mens kan ooit vir 'n beter vriende vra nie.

- **Dankie Jesus!**

Lys van Figure

Figuur 2.1:	Die rol van die mitochondrion in die omskakeling van voedsel na ATP..	3
Figuur 2.2	Voorstelling van die elektrontransportketting..................	4
Figuur 2.3	Binding-wissel model van ATP-sintese.........................	14
Figuur 3.1	Struktuur van digitonien...	34
Figuur 4.1	Lineêre gebied van die luminometriese kwantifisering van ATP..	54
Figuur 4.2	Ekstraksie van ATP by verskillende TCA-konsentrasies..	55
Figuur 4.3	Effek wat 'n toenemende digitonienkonsentrasie op ATP produksie het..	56
Figuur 4.4	Verwantskap tussen glutamaat- en malaatkonsentrasies en die hoeveelheid ATP geproduseer...	57
Figuur 4.5	Lineêriteit van ATP produksie deur kompleks I...............	58
Figuur 4.6	Verwantskap tussen die gliserol-3-fosfaat konsentrasie en die hoeveelheid ATP geproduseer.............	59
Figuur 4.7	Lineêriteit van ATP produksie deur kompleks III deur gliserol-3-fosfaatdehidrogenase...........................	60
Figuur 4.8	Verwantskap tussen TMPD konsentrasie en die hoeveelheid ATP geproduseer in die teenwoordigheid van 10 mM askorbiensuur.......................................	61
Figuur 4.9	Verwantskap tussen die askorbiensuurkonsentrasie en die hoeveelheid ATP geproduseer in die teenwoordigheid van 200 μM TMPD..........................	61
Figuur 4.10	Lineêriteit van ATP produksie deur kompleks IV met 10 mM askorbiensuur en 200 μM TMPD as substrate...	62
Figuur 4.11	ATP produksie deur die mitochondriale komplekse in die teenwoordigheid van kompleks spesifieke inhibeerders.......	63

Figuur 4.12	Normaalwaardes vir ATP-produksie soos bepaal in Fibroblaste (n=3)..	64
Figuur 4.13	*In situ* Mitochondriale respirasie analise: Baba RV............	66
Figuur 4.14	*In situ* Mitochondriale respirasie analise: Baba CT...........	67

HOOFSTUK 1

Inleiding

Oksidatiewe fosforilasie is verantwoordelik vir die produsering van die ATP wat deur die liggaam benodig word (Shoffner & Wallace, 1995), en vind in die elektrontransportketting plaas wat in die binneste mitochondriale membraan ingebed is (Altamura *et al.* 1996). Die mitochondriale respiratorieseketting kom in alle mitochondria voor en verseker die oordrag van elektrone vanaf die reduserende ekwivalente (bv. NADH en suksinaat) na molekulêre suurstof met die beskikbaarstelling van vrye energie wat gebruik word om ATP te vorm (Capaldi *et al.* 1983; Rustin *et al.* 1994). Die respiratorieseketting bestaan uit vyf ensiemkomplekse wat gekodeer word deur beide die kern en mitochondriale DNA (Munnich *et al.* 1996).

Die eerste pasiënt met abnormale mitochondria is in 1959 beskryf, en sedertdien is heelwat ander pasiënte met mitochondriale defekte beskryf (Sengers *et al.* 1984; Shoffner & Wallace, 1995). Respiratoriesekettingdefekte is vir lank beskou as neuromuskulêre siektetoestande, maar oksidatiewe fosforilasie vind nie net in die neuromuskulêre sisteem plaas nie (Munnich *et al.* 1996). Pasiënte met mitochondriale defekte se spierweefsel word hoofsaaklik aangetas, maar ander organe soos die hart, lewer, niere en brein word ook aangetas (Shoffner & Wallace, 1995). Dit het duidelik geword dat die genetiese defekte van die oksidatiewe fosforilasiesisteem aanleiding gee tot 'n groot verskeidenheid kliniese simptome by kinders (Munnich *et al.* 1996). Dit blyk ook moeilik te wees om die defekte te diagnoseer, juis as gevolg van die tweeledige aard van die oorsprong van die komplekse van die elektrontransportketting (Scholte *et al.* 1987).

Daar bestaan verskeie metodes wat aangewend kan word om hierdie defekte te diagnoseer en te bepaal in watter een van die komplekse van die respiratorieseketting die defek gelokaliseer is, maar nie een van die metodes is sonder probleme nie (Munnich *et al.* 1996). Die pasiënt word byvoorbeeld aan 'n verskeidenheid beladingstoetse onderwerp of so nie moet die weefsel onmiddellik nadat dit van die pasiënt verkry is, verwerk word. Die defek kan gelokaliseer word deur die mitochondriale respirasie van die pasiënt te ondersoek. Daar is in die laaste paar jaar begin om mitochondriale respirasie te ondersoek

deur van digitonien gebruik te maak om selle selektief deurlaatbaar te maak sodat kompleksspesifieke substrate toegang tot die mitochondria kan verkry (Wanders *et al.* 1993). Die hoeveelheid ATP wat tydens 'n sekere tyd geproduseer is, word deur middel van 'n lusiferase-lusiferien ensiemsisteem bepaal en vergelyk met normaalwaardes (Wanders *et al.* 1993; Wanders *et al.* 1994). In hierdie studie word die metode gestandaardiseer vir gebruik by die Metabolisme Laboratorium van die departement Biochemie en Mikrobiologie aan die PU vir CHO.

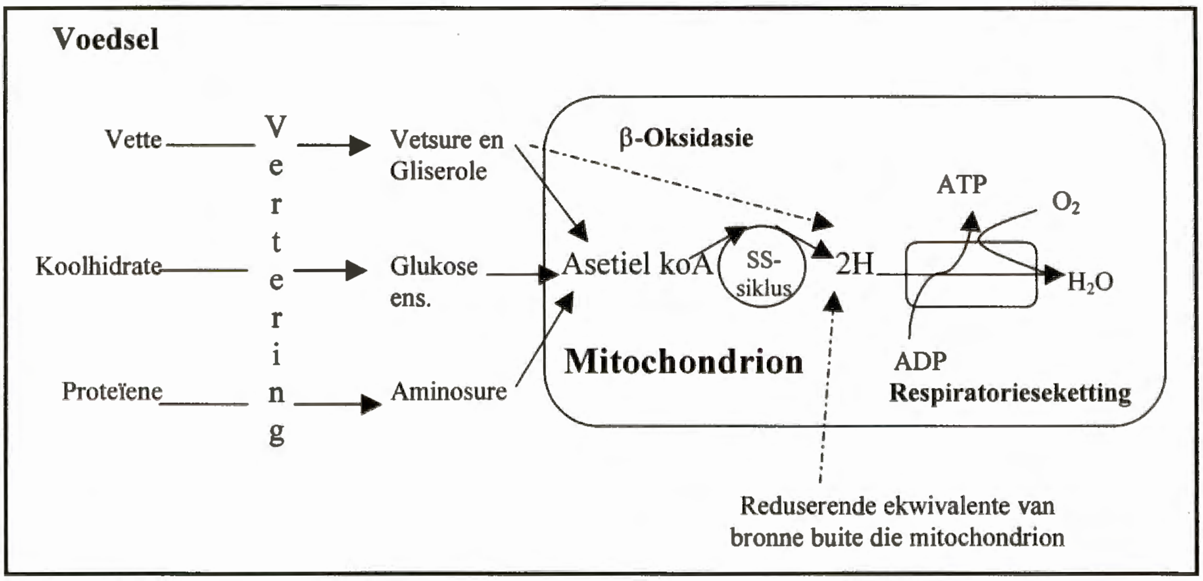
In Hoofstuk 2 word die relevante literatuur ten opsigte van die respiratorieseketting en die defekte wat daarmee geassosieer word, saamgevat. Die probleemstelling wat ontstaan vanuit die literatuur en die relevante doelwitte van hierdie studie word ook in hoofstuk 2 gegee. In Hoofstuk 3 word die verskillende metodes wat gebruik kan word om mitochondriale respirasie te kwantifiseer met mekaar vergelyk en die voordele van die gebruik van die lusiferase-lusiferien ensiemsisteem word uitgestip. Die standaardisasie van die *in situ* analise vir ATP kwantifisering word beskryf en die finale metode vir die kwantifisering van die respiratoriese aktiwiteit in fibroblaste, word aangedui. Alle metodes wat gebruik is tydens die projek, asook die kliniese beelde van die pasiënte wat in die studie ondersoek is, word ook in Hoofstuk 3 gegee. In Hoofstuk 4 word die resultate van die standaardisering asook die resultate wat verkry is deur van die *in situ* analise vir ATP kwantifisering gebruik te maak, gegee. Ook die resultate wat verkry is deur van 'n klassieke *in vitro* analise gebruik te maak, word in die hoofstuk beskryf. Laastens word die metode en die resultate wat verkry is, in Hoofstuk 5 bespreek en geëvalueer.

HOOFSTUK 2

Literatuuroorsig

2.1 INLEIDING

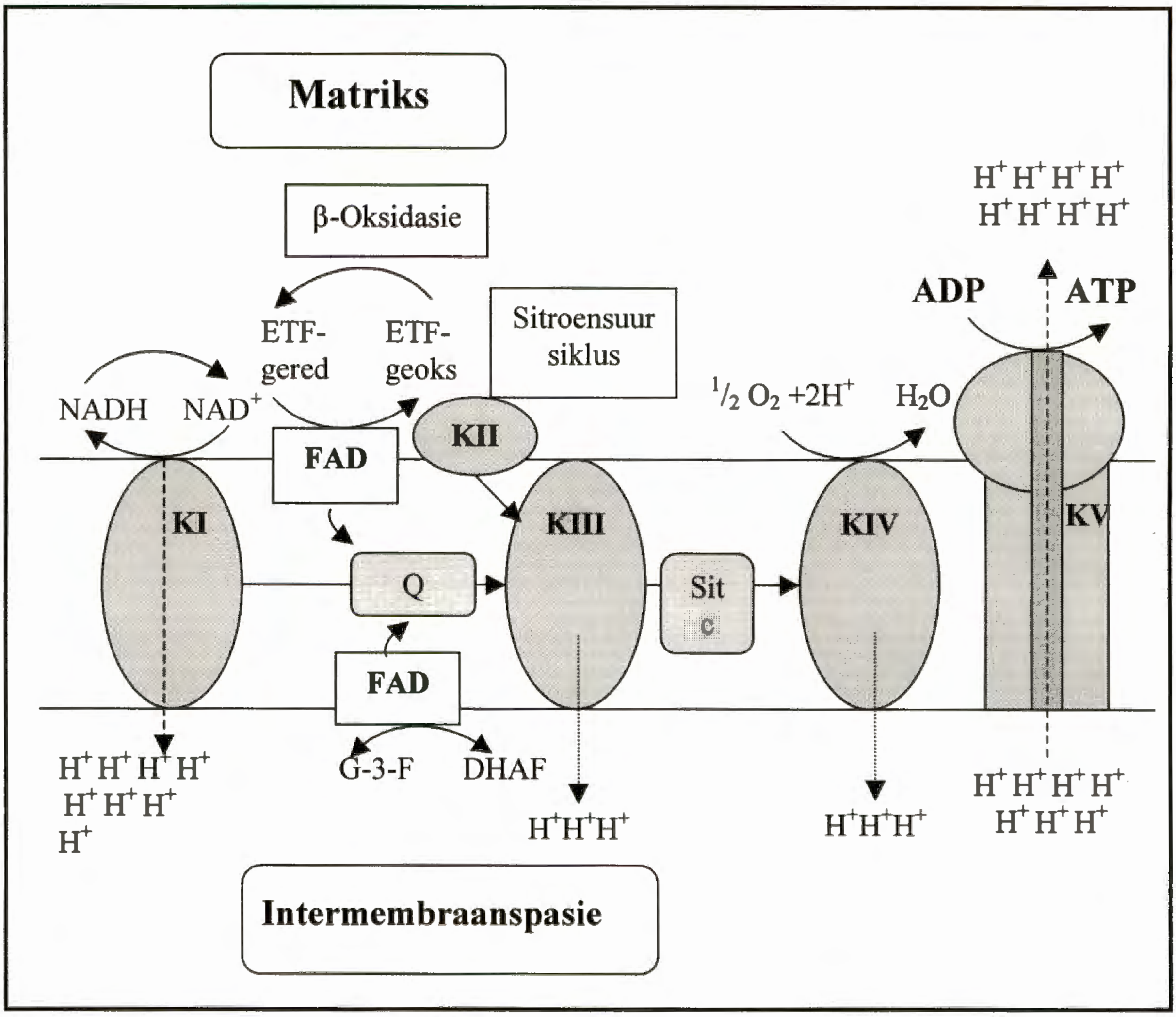
Onderhouding van lewe benodig energie, maar waar kom die energie vandaan? In die geval van die mens, word voedsel ingeneem om energie te produseer. Die oksidasie van die hoof voedselgroepe lei tot die generering van reduserende ekwivalente (2H) wat deur die respiratorieseketting opgeneem word en gebruik word vir oksidasie en die gekoppelde generering van ATP (Murray *et al.* 1996) (Figuur 2.1).



(Verwerk uit Murray *et al.* 1996)

Figuur 2.1: Die rol van die mitochondrion in die omskakeling van voedsel na ATP.

Die gereduseerde ekwivalente naamlik NADH en $FADH_2$ se elektrone word in die mitochondrion oorgedra na molekulêre suurstof (Hatefi, 1985). Dit word bewerkstellig deur die komponente van die elektrontransportketting (Weiss *et al.* 1991) (Figuur 2.2). Die ensiemkomplekse van die respiratorieseketting koppel die proses van elektronoordrag aan proton translokasie oor die mitochondriale membraan (Weiss *et al.* 1991).



Figuur 2.2 Voorstelling van die elektrontransportketting

Kompleks I tot kompleks V word in Figuur 2.2 as KI tot KV aangedui. Koënsiem Q_{10} word as Q aangedui terwyl sitochroom c deur sit c aangedui word. Elektrone beweeg deur die elektrontransportketting soos in Figuur 2.2 deur die soliede pyle aangedui word. Die beweging van protone word deur stippellyn pyle aangedui. Dihidroksieasetoonfosfaat en gliserol-3-fosfaat word onderskeidelik deur die afkortings DHAF en G-3-F aangedui.

Die translokasie van protone oor die binneste mitochondriale membraan (Frerman & Goodman, 1995) resulteer in die daarstelling van 'n protongradiënt (Boyer, 1992). Die energie wat in die protongradiënt gestoor is, word deur ATP sintase (kompleks V) gebruik

(Pedersen & Amzel, 1993) om die sintese van ATP vanaf ADP en vrye fosfaat te dryf (Abrahams *et al.* 1994). Elektronoordrag tussen kompleks I, kompleks III en kompleks IV word bewerkstellig deur mobiele elektrondraers. Tussen kompleks I en kompleks III is ubiquinoon (Q) die mobiele elektrondraer (Lenaz & Fato, 1986). Q dra ook elektrone vanaf kompleks II na kompleks III (Lee *et al.* 1998). Sitochroom c is die mobiele elektrondraer tussen kompleks III en kompleks IV (Froud & Ragan, 1984).

2.2 ENERGIEGENERERING IN DIE EUKARIOTIESE SEL

2.2.1 DIE MITOCHONDRION

Alle eukariotiese selle bevat mitochondria wat verantwoordelik is vir die grootste deel van die suurstofverbruik van die liggaam (Wanders *et al.* 1993), want die mitochondrion is die organel waarin oksidatiewe fosforilasie plaasvind. Die mitochondrion is ook die plek waar die sitroensuursiklus en vetsuuroksidasie plaasvind (Robinson & Lemire, 1996). Beide bogenoemde prosesse genereer gereduseerde koënsieme wat deur die respiratoriese elektrontransportketting geoksideer kan word.

Elke sel bevat etlike honderde mitochondria, maar die aantal mitochondria wat elke sel bevat verskil aansienlik tussen verskillende weefsels en organismes aangesien die algehele energie benodigdhede van verskillende weefsels en organismes verskil (Wallace *et al.* 1992). So bevat sekere seltipes soos byvoorbeeld amfibiese eierselle meer as 100 000 mitochondria, terwyl ander selle soos die alg *Micromonas,* slegs een mitochondrion bevat (Wolfe, 1981). 'n Lewersel bevat ongeveer 1000 mitochondria wat ongeveer 25% van die hepatosiet se inhoud uitmaak (Prescott, 1988).

Die mitochondrion is 'n sferiese organel waarvan die vorm kan wissel van elipsoïedaal (1 μm x 2 μm) tot staafvormig (1-2 μm lank en 0.5 μm in diameter) (Wolfe 1981; Prescott 1988). Die mitochondrion bestaan uit twee membrane wat heeltemal diverse eienskappe

besit (Manella, 1982). Die buitenste mitochondriale membraan bevat slegs 'n paar proteïene. Een van die proteïene is die transmembraanproteïen, porien, wat kanale vorm wat die vrye diffusie van ione en wateroplosbare metaboliete met 'n molekulêre massa van laer as 10 000 toelaat (Horton *et al.* 1996). Die binneste mitochondriale membraan is ryk aan proteïene en is deurlaatbaar vir molekules sonder 'n lading soos byvoorbeeld O_2, H_2O en CO_2. Dit laat egter nie protone en groter polêre en ioniese komponente deur nie en die komponente moet dus deur spesifieke transportsisteme oor die membraan gedra word (Horton *et al.* 1996). Die binneste mitochondriale membraan bevat baie voue, wat kristae genoem word (Wolfe, 1981). Die voue vergroot die oppervlakarea van die membraan. Die komponente wat oksidatiewe fosforilasie uitvoer, is in die binneste mitochondriale membraan ingebed, maar sommige van die subeenhede strek tot in die matriks (Prescott, 1988). Die area tussen die binneste en buitenste mitochondriale membraan word die intermembraanspasie genoem en is ongeveer 100 Å wyd (Wolfe, 1981; Prescott, 1988).

Die matriks is die deel van die mitochondrion wat deur die binneste mitochondriale membraan omsluit word en bevat die piruvaatdehidrogenase kompleks, die ensieme van die sitroensuursiklus (behalwe dié van die suksinaatdehidrogenase kompleks aangesien hierdie kompleks in die binneste mitochondriale membraan ingebed is) en die meeste van die ensieme wat vetsuuroksidasie kataliseer (Prescott, 1988). Die proteïenkonsentrasie in die matriks is so hoog dat die matriks jelagtig is (Horton *et al.* 1996). Die matriks bevat ook metaboliete en anorganiese ione en 'n poel van NAD^+ en $NADP^+$ wat afsonderlik bly van die piridien-nukleotied koënsieme van die sitosol (Horton *et al.* 1996).

2.2.2 Oorsig van Elektrontransport

Die respiratorieseketting bestaan uit vyf ensiemkomplekse (Figuur 2.2) wat in die binneste mitochondriale membraan voorkom (Zheng *et al.* 1990; Shoffner & Wallace, 1995). Elektronvloei deur die respiratorieseketting vind plaas via die oksidasie en reduksie van kofaktore soos byvoorbeeld NADH en FADH (Wanders *et al.* 1993). Die vloei van

elektrone vind plaas vanaf die reduserende agent na die oksiderende agent (Rustin *et al.* 1994). Die mobiele elektrondraers, ubiquinoon (Q) en sitochroom c, dien as koppelstukke tussen die komplekse van die elektrontransportketting (Horton *et al.* 1996) (Figuur 2.2). Ubiquinoon (Q) dra elektrone vanaf komplekse I en II oor aan kompleks III, waarna sitochroom c die elektrone na kompleks IV toe oordra (Shoffner & Wallace, 1995). Kompleks IV gebruik die elektrone vir die reduksie van suurstof na water. Elk van die drie komplekse (I, III en IV) dra protone oor die binneste mitochondriale membraan soos wat die elektrone deur die komplekse beweeg (Shoffner & Wallace, 1995). Kompleks II, (suksinaatdehidrogenase, EC 1.3.5.1) dra nie direk by tot die vorming van die protongradiënt nie, maar dra elektrone vanaf suksinaat na koënsiem Q. Dit lewer 'n bydrae tot die elektrontransport wat die translokasie van protone deur kompleks III verseker (Hatefi, 1985).

2.2.3 KOFAKTORE IN ELEKTRONTRANSPORT

Die komplekse van die elektrontransportketting bevat kofaktore soos flaviene (FAD en FMN), quinoonkomponente soos koënsiem Q en die metaalkomponente (Yster-swael groepe, heem en die proteïen-gebonde koper) (Hatefi, 1985; Shoffner & Wallace, 1995). Die elektrone wat tussen komplekse I en IV deur die elektrontransportketting vloei, word deur die kofaktore, wat as elektrondraers optree, oorgedra (Hatefi, 1985). Elektrone beweeg twee-twee in die respiratoriese elektrontransportketting in vanaf die gereduseerde substrate, NADH en suksinaat. In kompleks I en kompleks II word die flavien koënsieme FMN en FAD respektiewelik gereduseer (Frerman & Goodman, 1995). Die gereduseerde koënsieme $FMNH_2$ en $FADH_2$ doneer een elektron op 'n keer (Horton *et al.* 1996). Yster-swael (Fe-S) groepe van beide die [2Fe-2S] en [4Fe-4S] tipes is teenwoordig in komplekse I, II en III en elke yster-swaelgroep ontvang of doneer een elektron elke keer as die yster atome reduksie of oksidasie ondergaan (Horton *et al.* 1996).

Ses verskillende sitochrome word onder die mitochondriale ensiemkomplekse aangetref, naamlik sitochroom b_{560}, sitochroom b_{566}, sitochroom c_1, sitochroom c, sitochroom a en sitochroom a_3 (Trumpower, 1990). Sitochrome dra elektrone vanaf 'n reduserende verbinding na 'n oksiderende verbinding deur te sirkuleer tussen die verskillende oksidasietoestande van die heem-geassosieerde ysteratome en hul heem (Trumpower, 1990).

2.2.4 KOMPLEKSE VAN DIE MITOCHONDRIALE RESPIRATORIESEKETTING.

2.2.4.1 Kompleks I: NADH-ubiquinoon Oksidoreduktase (EC 1.6.5.3)

Kompleks I staan ook bekend as NADH-dehidrogenase. In die sitosol is die belangrikste NAD-gekoppelde dehidrogenases glikolitiese ensieme en ook die laktaatdehidrogenases (Shoffner & Wallace, 1995). Aangesien NADH nie oor die mitochondriale membraan kan beweeg nie, word die reduserende ekwivalente deur die malaat-aspartaat pendel aan die NAD^+ in die mitochondriale matriks oorgedra om NADH te vorm (Horton *et al.* 1996). Die NADH wat deur die reaksie gevorm word, word aan kompleks I oorgedra deur direkte ensiem-ensiem interaksies (Shoffner & Wallace, 1995). Kompleks I kataliseer die oordrag van twee elektrone vanaf NADH na Q (Degli Esposti *et al.* 1996). Kompleks I is 'n uiters komplekse ensiem en bevat ongeveer 30 polipeptiede waarvan die massa wissel van ongeveer 75 tot 5 kDa, alhoewel nie al die polipeptiede benodig word vir katalitiese aktiwiteit nie (Frerman & Goodman, 1995). Die belangrikste polipeptiede is in ongeveer gelyke hoeveelhede teenwoordig en vorm 'n strukturele eenheid (Frerman & Goodman, 1995). Bereidings van kompleks I bevat FMN (Shoffner & Wallace, 1995), verskeie yster-swael groepe (Beinert & Albracht, 1982) en varieërende hoeveelhede fosfolipiede en ubiquinoon (Frerman & Goodman, 1995). Die flavoproteïenfraksie bevat polipeptiede van verskillende groottes (Frerman & Goodman, 1995).

2.2.4.2 Kompleks II: Suksinaat-ubiquinoon Oksidoreduktase (EC 1.3.5.1)

Kompleks II staan ook bekend as suksinaatdehidrogenasekompleks en die kompleks dehidrogeneer suksinaat na fumaraat in die sitroensuursiklus, waarna die elektrone aan ubiquinoon in die binneste mitochondriale membraan oorgedra word (Shoffner & Wallace, 1995). Soos kompleks I, kataliseer kompleks II ook die reduksie van Q na QH_2. Soogdier kompleks II bevat vier polipeptiede, genaamd C_{II-1} (74 kDa), C_{II-2} (27 kDa), C_{II-3} (15.5 kDa) en C_{II-4} (13.5 kDa) (Frerman & Goodman, 1995). Suksinaatdehidrogenase is 'n oplosbare fraksie wat C_{II-1} en C_{II-2} bevat, maar geen ubiquinoon oksidoreduktase aktiwiteit nie. Oplosbare suksinaatdehidrogenase kan bind aan dehidrogenase-uitgeputte submitochondriale partikels om suksinaat oksidase aktiwiteit te rekonstrueer (Frerman & Goodman, 1995). Die ander twee subeenhede word *in vivo* benodig om suksinaatdehidrogenase te bind aan die membraan en om elektrone oor te dra aan die fisiologiese ontvanger, Q.

Die oordrag van die twee elektrone vanaf suksinaat na ubiquinoon geskied deur oksidasie van $FADH_2$ deur die oordrag van 2H-atome, gevolg deur twee enkel-elektronoordragte vanaf die gereduseerde flavien na 'n reeks van drie yster-swael groepe (Prescott, 1988). Aangesien min vrye energie vrygestel word deur die reaksie gekataliseer deur kompleks II, kan die kompleks nie direk bydra tot die protonkonsentrasiegradiënt oor die binneste mitochondriale membraan nie (Horton *et al.* 1996). Kompleks II verskaf eerder elektrone vanaf die oksidasie van suksinaat. Q kan elektrone ontvang vanaf kompleks I asook kompleks II en die elektrone word weer oorgedra aan kompleks III, waarna dit na die res van die elektrontransportketting oorgedra word (Hatefi, 1985).

Daar bestaan ook ander reaksies wat elektrone aan Q kan skenk. Gliserol-3-fosfaat is onder andere 'n substraat vir mitochondriale L-gliserol-3-fosfaatdehidrogenase (EC

1.1.99.5) (Beleznai *et al.* 1988). In die proses word twee H-atome oorgedra aan die FAD prostetiese groep waarna die FAD omgeskakel word in $FADH_2$ (Horton *et al.* 1996). Die $FADH_2$ skenk dan twee elektrone aan Q.

2.2.4.3 Kompleks III: Ubiquinol-sitochroom c Oksidoreduktase (EC 1.10.2.2)

Kompleks III kataliseer die elektronoordrag tussen die twee mobiele elektrondraers, naamlik ubiquinol en sitochroom c (Shoffner & Wallace, 1995). Kompleks III bevat tien verskillende polipeptiede met massas wat wissel tussen 50 en 6.4 kDa (Frerman & Goodman, 1995). Die subeenhede sluit 'n Reiske yster-swael proteïen [2Fe-2S], sitochroom b (wat twee heemgroepe b_{560} en b_{566} insluit op 'n enkele polipeptiedketting) en ook sitochroom c_1 in. Die twee heemgroepe is nie-kovalent gebind deur bis-histidien residue (Trumpower, 1990). Sitochroom c_1 en die Reiske proteïen word blootgestel aan die elektropositiewe sitosoliese kant van die binneste mitochondriale membraan (Trumpower, 1990; Frerman & Goodman, 1995).

Die volgorde van elektronoordrag in kompleks III is baie ingewikkeld. Die oksidasie-reduksievolgorde en die geassosieerde protonbeweging was onduidelik totdat Peter Mitchell in 1975 die sogenaamde Q-siklus voorgestel het. Bernard Trumpower het verder bygedra tot ons huidige begrip van die Q-siklus (Trumpower, 1990; Frerman & Goodman, 1995).

Die resultaat van die sikliese en vertakte elektronvloei, soos wat dit plaasvind volgens die Q-siklus, is dat die helfte van die elektron ekwivalente van die aanvanklike ubiquinol oksidasie teruggevoer word na die ubiquinol in die quinoon/quinool poel. Die netto reaksie toon twee protone getranslokeer vir elke elektron wat oorgedra word (Frerman & Goodman, 1995). Vir elke ubiquinol wat geoksideer word, word twee molekules

sitochroom c gereduseer en vier protone word gedeponeer aan die positiewe kant van die membraan (Trumpower, 1990).
Inhibeerders soos UHBDT (5 undesiel-6 hidroksie-4,7-hidroksinaftoquinoon) inhibeer die reoksidasie van die yster-swael sentrum en reduksie van sitochroom b_{566}. UHBDT bind aan die gereduseerde yster-swael proteïen, verplaas die ubiquinol en verhoog die potensiaal van die yster-swael proteïen met 100 mV (Frerman & Goodman, 1995). Antimisien, wat 'n kompleks III inhibeerder is, (Frerman & Goodman, 1995) inhibeer die quinoon reduksie op so 'n manier dat sitochroom b gereduseer word, maar die reduksie van sitochroom c_1 geïnhibeer word (Frerman & Goodman, 1995; Matsuno-Yagi & Hatefi, 1996).

Die sitochroom bc_1 kompleks dra twee elektrone vanaf ubiquinol (QH_2) na twee molekules sitochroom c, deponeer die twee protone van ubiquinol aan die positiewe kant van die membraan en translokeer 'n addisionele twee protone aan die negatiewe kant van die membraan vir elke paar elektrone oorgedra (Trumpower, 1990).

Sitochroom c_1 en die yster-swael proteïen is teenwoordig in die binneste mitochondriale membraan. Sitochroom c_1 is ingebed in die bc_1 kompleks met die heem-bevattende porsie van die proteïen by die oppervlak van die membraan (Trumpower, 1990). Die yster-swael proteïen word by die oppervlak van die bc_1 kompleks gehou deur hidrofobiese interaksies en kan van die kompleks onttrek word deur gebruik te maak van 'n oplosmiddel (Trumpower, 1990).

2.2.4.4 Kompleks IV: Sitochroom C Oksidase (EC 1.9.3.1)

Kompleks IV is die laaste komponent van die respiratoriese elektrontransportketting (Shoffner & Wallace, 1995; Ädelroth *et al.* 1996) en die kompleks kataliseer reduksie van molekulêre suurstof (O_2) na water ($2H_2O$) (Capaldi *et al.* 1983). Kompleks IV translokeer ook protone oor na die intermembraanspasie. Die mobiele proteïen koënsiem, sitochroom

c, is die bron van elektrone wat kompleks III en kompleks IV verbind (Frerman & Goodman, 1995).

Die soogdier kompleks IV ensiem is 'n dimeer wat 13 tipes polipeptiedkettings bevat waarvan subeenhede I, II en III deur mitochondriale gene gekodeer word (Frerman & Goodman, 1995). Soos reeds genoem, is sitochroom c oksidase 'n multisubeenheid proteïenkompleks wat met 'n aantal kofaktore geassosieer word in die elektrontransportketting (Ädelroth *et al.* 1996). In die katalitiese siklus van sitochroom c oksidase word elektrone van wateroplosbare sitochroom c opeenvolgend oorgedra aan koper A (CuA), sitochroom a en daarna aan die bikernige sentrum wat bestaan uit sitochroom a_3 en CuB waar O_2 gereduseer word na water (Brunori & Wilson, 1982; Ädelroth *et al.* 1996)

Daar kom verskillende sitochroom c oksidase subeenhede in soogdiere voor. In beeste is daar verskillende isovorme van die subeenhede, naamlik VIa, VIIa en VIII; H (hart) isovorme wat uitgedruk word in hart en spiere en L (lewer) isovorme wat uitgedruk word in die lewer, nier en brein (Frerman & Goodman, 1995). Molekulêre suurstof word gereduseer by 'n katalitiese sentrum, wat die heem-yster atoom van sitochroom a_3, asook die naburige Cu_B atoom, insluit. Hierdie sogenaamde bikernige sentrum is ook die bindingsplek vir komponente soos sianied (CN^-) en koolstofmonoksied (CO) en sitochroom c oksidase word dus geïnhibeer deur hierdie ligande (Hatefi 1985; Eaton *et al.* 1996)

2.2.4.5 Kompleks V: ATP-sintase (EC 3.6.1.34)

Anders as komplekse I–IV dra kompleks V nie by tot die protongradiënt nie. Kompleks V gebruik eerder die energie van die elektrochemiese gradiënt van protone, verkry vanaf die voorafgaande redoksreaksies, om ATP vanaf ADP en P_i te produseer (Amzel & Pederson, 1983; Pederson *et al.* 1993). Die meeste van die ATP in die sel word deur hierdie sisteem gevorm (Boyer, 1987).

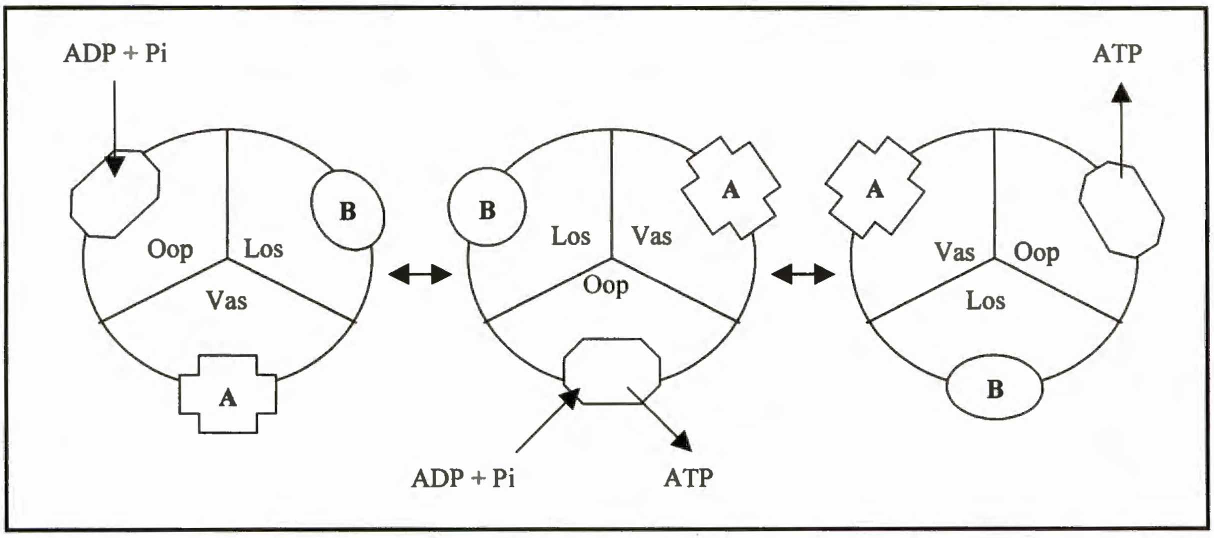
ATP-sintase (kompleks V) is 'n F tipe ATPase genaamd F_0F_1 sintase en word gelokaliseer in die binneste mitochondriale membraan (Pederson *et al.* 1993). Wanneer die F_1 komponent los van die membraan is, dien dit as 'n ATPase (Boyer, 1987). Die F impliseer 'n koppelingsfaktor: ATP-sintase koppel die oksidasie van substrate aan die fosforilasie van ADP in die mitochondria deur die transmembraan protongradiënt. F-tipe ATPase is verantwoordelik vir die generering en nie die hidrolise van ATP nie, alhoewel die hidrolise van ATP wel in sommige selle soos anaerobiese bakterieë plaasvind (Pederson *et al.* 1993).

Die ATPase is membraangebonde en het 'n karakteristieke knop-en-steel struktuur. Die ATPase bestaan dus uit 'n kopstuk, 'n basisstuk en 'n steel wat die kopstuk en die basisstuk verbind (Amzel & Pederson, 1983). Alhoewel intakte ATP-sintase molekules drie dele toon wat onderskei kan word, skei die drie dele gewoonlik in twee dele naamlik 'n wateroplosbare eenheid, F_1, en 'n oplosmiddel oplosbare eenheid, F_0. Die kopstuk blyk gewoonlik F_1 te wees en die basisstuk F_0 met die steelgedeelte 'n samestelling uit beide die F_1 en F_0 komponent (Pederson *et al.* 1993). Die F_1 komponent bestaan uit α en β subeenhede asook drie kleiner subeenhede, terwyl die F_0 komponent uit drie subeenhede bestaan (Boyer, 1987). Die F_0 komponent is 'n protonkanaal wat oor die mitochondriale membraan strek en dit rig die elektrochemiese protongradiënt in die rigting van die F_1 komponent (Pederson *et al.* 1993).

Die F_1 komponent gebruik die protongradiënt om ATP te vorm deur ADP en P_i te bind (Wang, 1983; Pederson *et al.* 1993). Die F_0 komponent is bekend vir sy sensitiwiteit vir oligomisien (Hatefi, 1985). Oligomisien is 'n antibiotikum wat binne die kanaal bind en sodoende die protone verhoed om deur die kanaal te beweeg en sodoende word ATP-sintese belemmer (Horton *et al.* 1996).

Die meganisme van ATP-sintese vanaf ADP en P_i, gekataliseer deur kompleks V, was die teiken van intensiewe navorsing vir dekades. In 1979 het Paul Boyer die eerste keer die

bindingsmeganisme voorgestel. Die binding-wissel model is gebaseer op die waarnemings wat aantoon dat die toevoeging van energie nie nodig is om die fosfo-anhidried binding te vorm nie, maar wel om ATP uit die katalitiese punt vry te stel (Boyer, 1993) en dat die Pi en ADP op so 'n manier bind wat die vorming van ATP aanmoedig. Al hoe meer bewyse vir die meganisme word gevind. 'n Konformasie verandering, wat gedryf word deur die proton invloei, verswak die binding van ATP genoegsaam sodat die ATP vrygestel word van die ensiem. Gedurende ATP vorming is daar verskeie katalitiese punte betrokke wat saamwerk soos aangedui in Figuur 2.3.



(Verwerk uit Horton *et al.* 1996)

Figuur 2.3 Binding-wissel model van ATP-sintese.

A = ATP en **B** = ADP + Pi
Die verskillende konformasies van die drie katalitiese punte word deur die verskillende vorms voorgestel. ADP en Pi bind aan die **oop** punt. 'n Proton aangedrewe konformasieverandering veroorsaak dat die ensiem stywer aan die ADP en Pi bind in die los konformasie. Terselfdertyd het die punt waar die ATP "**vas**" gebind was 'n **oop** punt geword en die "**los**" punt het 'n "**vas**" punt geword. ATP word vrygestel uit die oop punt en ATP word gesintetiseer in die "**vas**" punt

Die binding-wissel model stel voor dat die $\alpha_3\beta_3$ oligomeer van ATP-sintase drie katalitiese punte bevat (Figuur 2.3). Op enige tydstip is elk van die punte in een van die volgende

konformasies: oop, los of stewig met ATP verbind. Al drie die katalitiese punte beweeg opeenvolgend deur die konformasies. Die vorming en vrystelling van ATP vind in die volgende stappe plaas (Boyer, 1993)

1. Een molekuul ADP en een molekuul P_i bind aan die oop katalitiese punt.
2. Die inwaartse beweging van protone oor die binneste mitochondriale membraan veroorsaak dat elk van die katalitiese punte van konformasie verander en na die volgende konformasietoestand beweeg.
3. ATP word vrygestel vanuit die oop punt en ADP en Pi verbind om ATP in die stewige punt te vorm.

2.3 MITOCHONDRIAALGEASSOSIEËRDE DEFEKTE

Die eerste beskrywing van 'n pasiënt met abnormale mitochondria is in 1959 gepubliseer (Sengers *et al.* 1984). Sedertdien is heelwat pasiënte met mitochondriale siektetoestande beskryf (Sengers *et al.* 1984).

Respiratoriesekettingdefekte is vir lank beskou as neuromuskulêre siektetoestande, maar oksidatiewe fosforilasie, wat ATP-sintese deur die respiratorieseketting insluit, vind nie net in die neuromuskulêre sisteem plaas nie (Zheng *et al.* 1990; Munnich *et al.* 1996). 'n Hele aantal nie-neuromuskulêre organe en weefsels is afhanklik van mitochondriale energieverskaffing en om hierdie rede kan 'n respiratoriesekettingdefek teoreties aanleiding gee tot enige simptoom in enige orgaan of weefsel op enige ouderdom as gevolg van die tweeledige genetiese oorsprong van respiratoriese ensieme (Scholte *et al.* 1987; Munnich *et al.* 1996). Pasiënte met mitochondriale defekte se spierweefsel word hoofsaaklik aangetas, maar ander organe soos die hart, lewer, niere en brein word ook aangetas (Scholte *et al.* 1987). Die ensieme word gekodeer deur kern DNA sowel as mitochondriale DNA (Zheng *et al.* 1990). Menslike mitochondriale DNA (mtDNA) bestaan uit 16 569 bp en kodeer vir 13 proteïene, onder andere 7 subeenhede van kompleks I, 1 subeenheid van kompleks III en 3 subeenhede van kompleks IV (Wallace *et al.* 1992; James *et al.* 1996).

In die laaste paar jaar het dit duidelik geword dat genetiese defekte van oksidatiewe fosforilasie die molekulêre basis vorm vir 'n groot verskeidenheid kliniese simptome by kinders (Munnich *et al.* 1996) en is daar waargeneem dat uit 100 pasiënte wat met respiratoriesekettingdefekte geïdentifiseer is, het 56% nie neuromuskulêre simptome getoon nie, terwyl 44% na die kliniek verwys is as gevolg van neuromuskulêre probleme. Dit blyk dus moeilik te wees om 'n respiratoriesekettingdefek te identifiseer wanneer net een simptoom teenwoordig is. In teenstelling hiermee wil dit blyk dat dit makliker is om 'n defek te identifiseer wanneer twee heel onverwante simptome waargeneem word (Munnich *et al.* 1996)

Alhoewel die siektetoestand op enige tydstip kan begin, het Munnich *et al.* (1996) waargeneem dat uit die 100 pasiënte wat geïdentifiseer is, het 36% voor die ouderdom van 1 maand, 44% tussen 1 maand en 2 jaar en 20% na 2 jaar die simptome begin toon.

Die mees algemeen waargeneemde simptome van die respiratoriesekettingdefekte word in Tabel 2.1 (Verwerk uit Munnich *et al.* 1996) gegee.

Wat ook al die ouderdom is waarop die simptome verskyn of wat ook al die aanvanklike simptoom is, die belangrikste verskynsel is dat al hoe meer weefsel deur die siekte geaffekteer word met verloop van tyd (Munnich *et al.* 1996) en dat die defekte van die sentrale senuweestelsel byna altyd teenwoordig is in die latere stadium van die siekte.

Alhoewel die aanvanklike simptome kan voortduur en geleidelik toeneem in intensiteit, kan dit selfs gebeur dat die simptoom heeltemal kan verdwyn nagelang ander weefsel betrokke raak (Munnich *et al.* 1996). Hierdie verskynsel is veral waar as die defek in die beenmurg of ingewande voorkom (Munnich *et al.* 1996). Daar is ook waargeneem dat baie van die pasiënte by wie die mitochondriale respiratorieseketting verwante defekte eers as kind of volwassene begin het, wel sekere simptome getoon het toe hulle babas was,

Tabel 2.1 Algemene Respiratoriese Defekte

NEONATALE PERIODE (0-1 MAAND)	KLEUTER (1 MAAND - 2 JAAR)	KIND - VOLWASSENE (OUER AS 2 JAAR)
SENTRALE SENUWEESTELSEL		
Kogenitale laktiese asidose Ketoasidotiese koma	Herhaaldelike ketoasidotiese komas Beroerte-agtige episodes Leigh -sindroom Alpers -sindroom	Spastisiteit Hartkrampe Stuipe Serebrale spierstoornis Migraine
SPIERE		
Spier atrofie Styfheid Swak kopbeheer Spontane spierbewegings	Miopatiese voorkoms Spier atrofie Swak ledemate Oefening intoleransie	Progressiewe miopatieë Swak ledemate Oefening intoleransie
LEWER		
Lewerversaking Lewervergroting	Progressiewe lewervergroting Lewersel disfunksie	Geen bekende aangetekende toestande
HART		
Hipertrofiese kardiomiopatie	Hipertrofiese kardiomiopatie	Totale hart blokasie Intraventrikulêre blok
NIERE		
De Toni Debré Fanconi - sindroom	Nierversaking De Toni Debré Fanconi - sindroom	Geen bekende aangetekende toestande
INGEWANDE		
Geen bekende aangetekende toestande	Herhaaldelike vormering Kroniese diarree Gebrek aan groei	Geen bekende aangetekende toestande
OOR		
Geen bekende aangetekende toestande	Gehoorverlies Sensorineurale doofheid	Sensorineurale doofheid Amonoglikosidies-geïnduseerde ototoksisiteit
OOG		
Geen bekende aangetekende toestande	Verhinderde oogbewegings Katarakke	Katarakke Verhinderde oogbewegings

naamlik, neutropenia, chroniese waterige diarree of 'n onvermoë om te groei (Munnich *et al.* 1996).

Daar is waargeneem dat sekere patologiese beelde of assosiasies meer geneig is om op 'n sekere ouderdom voor te kom, maar die aansienlike oorvleueling van die kliniese beelde lei egter tot probleme met die klassifikasie van baie pasiënte (Munnich *et al.* 1996). Daar is al probeer om sekere kliniese profiele aan sekere sindrome toe te skryf, maar daar is aangetoon dat die profiele onbruikbaar is. Hoewel sommige pasiënte ooreenstemmende simptome toon, is daar waargeneem dat hulle wel verskillende defekte onderlede het (Zheng *et al.* 1990).

Die betrokkenheid van 'n spesifieke orgaan of weefsel kom voor as gevolg van weefselspesifieke isovorme van die verskillende kerngekodeerde subeenhede van die respiratorieseketting komplekse (Rustin *et al.* 1994). Aan die anderkant, kan verskillende weefsels betrokke wees as gevolg van 'n potensiële mtDNA heteroplasmie. So kan dit byvoorbeeld wees as beide die gemuteerde en normale mitochondriale genoom saam in die sel voorkom as gevolg van orgaanspesifieke regulering van die elektronflukse in die respiratorieseketting as gevolg van orgaanspesifieke energie benodigdhede (Rustin *et al.* 1994). Respiratoriesekettingdefekte toon dus, veral by kinders, 'n wye en nimmereindigende spektrum van kliniese simptome wat enige orgaan of weefsel kan aantas. Daar word gereeld verskillende hoeveelhede van beide gemuteerde en normale mitochondriale DNA, met weefsel tot weefsel verskille, by pasiënte waargeneem (Rustin *et al.* 1994).

Pasiënte met mitochondriale defekte besit gewoonlik een of meer van die volgende biochemiese abnormaliteite: (Scholte *et al.* 1987)

1. Bloed laktaatvlakke is verhoog en die vlakke verhoog drasties tydens oefening
2. Die respiratoriese kwosiënt is verhoog

3. Die konsentrasie van abnormale organiese sure in die uriene is verhoog
4. Die konsentrasie van abnormale karnitien esters in die uriene is verhoog
5. Die vrye karnitienvlakke in die bloed is verlaag
6. Abnormale spiermorfologie.

Vervolgens gaan van die defekte wat met die verskillende komplekse geassosieer word, beskryf word.

2.3.1 DEFEKTE VAN KOMPLEKS I

Wanneer 'n defek in kompleks I voorkom, word die transport van elektrone deur die elektrontransportketting verhinder en sodoende word die oksidasie van die drie NADH molekules, wat in die sitroensuursiklus gevorm is, ook verhinder (Ciulla *et al.* 1995). Die intrasellulêre NADH hoop dus op relatief tot die NAD en anaerobiese metabolisme word dan bo aerobiese metabolisme verkies. Laktaat wat deur anaerobiese glukolise geproduseer word, hoop op en die laktaat:piruvaatverhouding verhoog sodoende ook.

‘n Defektiewe kompleks I kan veroorsaak word deur 'n mutasie in die kern- of mitochondriale DNA (Bakker *et al.* 1994). Alhoewel daar nog nie defektiewe kern DNA in hierdie geval beskryf is nie, word al hoe meer pasiënte met mitochondriale enkefalomiopatieë beskryf met 'n delesie- of puntmutasie in die mitochondriale DNA (Wallace, 1992). Dit wil voorkom dat wanneer die hoeveelheid wilde tipe mitochondriale DNA afneem, kompleks I eerste geaffekteer word, gevolg deur kompleks IV, maar daar is ook al uitsonderings opgemerk (Bakker *et al.* 1994).

In die artikel van Bakker *et al.* (1994), word 'n elfjarige meisie beskryf met verhoogde laktaat- en piruvaatvlakke. Die laktaatvlakke in die bloed, by rustende toestand, was 9.0-mmol/L (normaal < 2.0 μmol/L) en die piruvaatvlakke in die bloed was 220 μmol/L

(normaal < 60 µmol/L), terwyl die aminosuurvlakke in die serum normaal was, behalwe vir alanien wat 456 µmol/L (normaal 150-300 µmol/L) was. Die biochemiese ondersoek van die geïsoleerde spiermitochondria en spierhomogenaat het aangetoon dat die pasiënt 'n kompleks I defek besit. Die meeste van die pasiënte met 'n kompleks I defek, toon normale of verlaagde sitochroom c oksidase aktiwiteit (Bakker *et al.* 1994).

2.3.1.1 Bilaterale Kinder Kataraktogenesis

In die artikel van Ciulla *et al.* (1995) word die geval van 'n 5½-maande oue dogtertjie beskryf wat kort na geboorte snelasemhalend (Eng. tachypneic) geword het, maar met normale suurstofversadiging. Die baba was metabolies asidoties en het 'n vergrote anioon opening getoon en haar serum laktaatvlak was merkbaar verhoog tot 20.4 mmol/L (normaal, < 2.2) en 'n verhoogde laktaat tot piruvaat verhouding van 100:1 (normaal, 10 tot 25:1) (Ciulla *et al.* 1995). Gedurende die eerste maand van haar lewe het sy wanabsorpsie en hepatomegalie getoon met normale lewerfunksie. Sy het ook baie stadig gewig aangesit. 'n Spierbiopsie het verhoogde lipied- en glikogeenvlakke getoon, wat dui op 'n mitochondriale disfunksie. 'n Biochemiese ondersoek van die komplekse van die elektrontransportketting het getoon dat kompleks I geen aktiwiteit vertoon het in vergelyking met die kontrole nie. Die aktiwiteit van die ander komplekse was normaal (Ciulla *et al.* 1995).

Ander kliniese sindrome wat geassosieer word met die verlaagde aktiwiteit van kompleks I sluit MELAS-sindroom, Alpers se siekte, Leigh se siekte, Leber se oorerflike optiese neuropatie en MERRF-sindroom in (Zheng *et al.* 1990; Wanders *et al.* 1993; Ciulla *et al.* 1995). MELAS-sindroom is soms ook te wyte aan ‘n kompleks IV defek, terwyl MERRF-sindroom ook met kompleks III, kompleks IV asook ‘n kombinasie van ‘n kompleks I en IV defek geassosieer word (Zheng *et al.* 1990). Pearson-sindroom (Kapsa *et al.* 1994), Kearns-Sayre-sindroom (Zheng *et al.* 1990) en de Toni-Debre-Fanconi-sindroom (Luder *et al.* 1994; Wendel *et al.* 1995) word ook met 'n kompleks I defek geassosieer. Die prognose

van kinders met erge laktiese asidose en veelvuldige orgaan betrokkenheid blyk nie goed te wees nie (Cuilla *et al.* 1995).

2.3.2 DEFEKTE VAN KOMPLEKS III

2.3.2.1 De Toni-Debre-Fanconi-sindroom

De Toni-Debre-Fanconi-sindroom kom as 'n defek by meer as een van die komplekse van die respiratorieseketting voor (Wendel *et al.* 1995). Dit kom algemeen voor as gevolg van 'n sitochroom c oksidase defek en ook as 'n kompleks I defek. Dit kom ook voor as 'n gekombineerde kompleks III/IV defek. De Toni-Debre-Fanconi-sindroom kan ook voorkom in 'n laat stadium van Pearson-sindroom waar dit verskeie organe insluitend die niere aantas (Wendel *et al.* 1995). In die geval word De Toni-Debre-Fanconi-sindroom beskryf waar dit met 'n kompleks III defek van die respiratorieseketting geassosieer word.

Wendel *et al.* (1995) beskryf 'n twee maande oue baba wat in die hospitaal opgeneem is met 'n onvermoë om te groei. Laboratoriumtoetse het 'n metaboliese asidose getoon, maar verder was die serum elektroliete, glukose en kreatinien in die normale vlakke. Die bloedlaktaatvlakke was tussen 1.7-2.9 (normaal < 2.0 mmol/l) en piruvaatvlakke was 0.077 (normaal < 0.065 mmol/l) (Afdeling 2.3.4.1). Die vlakke was dus normaal of effens verhoog. Op vier maande is daar weer toetse gedoen waartydens aansienlik verhoogde laktaat (28 500 normaal < 200) en 3-hidroksiebuteraat (25 000 normaal < 80) vlakke in die uriene waargeneem is. Die baba se toestand het versleg en op 7 maande het die baba gesterf. As gevolg van die massiewe urinêre uitskeiding van laktaat is 'n mitochondriale defek vermoed. Postmortem toetse wat op spier en lewer weefsel gedoen is het beide verlaagde kompleks III aktiwiteit getoon. As gevolg van die laktaatvlakke wat aanvanklik normaal voorgekom het is 'n defek in die mitochondriale respiratorieseketting mis gekyk. 'n Blok in kompleks III respirasie beïnvloed beide die oksidasie van NAD en FAD substrate (Wendel *et al.* 1995).

Kompleks III defekte is relatief skaars en onder die paar pasiënte wat al met 'n kompleks III defek beskryf is, kom daar ook heelwat verskillende kliniese beelde voor (Wendel *et al.* 1995).

2.3.3 DEFEKTE VAN KOMPLEKS IV

As gevolg van die kompleksiteit van kompleks IV is dit nie verbasend dat daar in hierdie geval so 'n verskeidenheid kliniese beelde beskryf is nie. Die kliniese beelde wissel van geïsoleerde spiersimptome tot ernstige progressiewe neurodegeneratiewe siektes waaraan die pasiënte gewoonlik sterf voor hul tweede lewensjaar (Christensen *et al.* 1993). In sommige gevalle van die defek kom die simptome algemeen deur die liggaam voor, terwyl die defek in sommige gevalle weer net tot een weefsel, byvoorbeeld spierweefsel, beperk is (Christensen *et al.* 1993). Die meeste gevalle van sitochroom c oksidase defek gaan gepaard met laktaat asidemie en/of die verhoogde urinêre uitskeiding van laktaat (Christensen *et al.* 1993).

2.3.3.1 Barth-sindroom.

Pasiënte met Barth-sindroom vertoon die volgende kliniese en biochemiese profiel: verslapte hartspier, neutropenie, neuromuskulêre swakheid; afwesigheid van serebrale betrokkenheid en vertraagde groei (Barth *et al.* 1996). Die kliniese/biochemiese kenmerke sluit veranderlike laktaatasidemie and laktaatasidurie, verhoogde urinêre uitskeiding van 3-metielglutakonsuur, 3-metielglutaarsuur en 2-etielhidrokrielsuur in (Barth *et al.* 1996). Studies wat met betrekking tot die elektrontransportketting gedoen is, het getoon dat die aktiwiteit van komplekse III en IV verlaag is (Barth *et al.* 1996).

2.3.3.2 Leigh se siekte.

Leigh se siekte is 'n neurodegeneratiewe kondisie met karakteristieke patologiese verskynsels (Morris *et al.* 1996). 'n Aantal verskillende ensiemdefekte onderliggend aan Leigh se siekte is al beskryf, waaronder defekte van sitochroom c oksidase (kompleks IV van die elektrontransportketting), kompleks I, piruvaatdehidrogenase kompleks en kompleks V (Ciulla *et al.* 1995). Die meeste van die pasiënte het aan sitochroom c oksidase defek gely en het gewoonlik in die neonatale of vroeë volwasse stadium gesterf (Ciulla *et al.* 1995; Morris *et al.* 1996). Spierbiopsies het die teenwoordigheid van beskadigde rooiweefsel en mitochondriale ultrastrukturele heterogeniteit aangetoon. Ciulla *et al.* (1995) het ook die betrokkenheid van meer as een orgaan beskryf. Behalwe dat die pasiënte ernstige laktiese asidose en katarakke getoon het, het die pasiënte ook gely aan wanabsorpsie, hepatomegalie en neurologiese abnormaliteite. Dit blyk dat enige orgaansisteem waar die ATP-produksie nie normaal is nie, geaffekteer sal word (Ciulla *et al.* 1995).

Kompleks I defekte kom die tweede meeste van die verskillende defekte voor. Pasiënte met 'n kompleks IV, kompleks I en PDH defek het geen verwantskap in ouderdom van voorkoms of laktaat konsentrasies getoon nie (Morris *et al.* 1996). Ongeag van die oorsaak van die siekte, het die meeste van die pasiënte simptome begin toon in die eerste 5 jaar van hulle lewe. Behalwe vir die neurodegeneratiewe simptome, was die algemeenste kenmerke 'n gebrek aan groei en hipotonisiteit (Morris *et al.* 1996).

'n Aantal siektes word veroorsaak deur klassieke mitochondriale DNA mutasies (James *et al.* 1996). Twee van die siektes, naamlik MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic asidosis and stroke-like episodes) en MERRF (myoclonic epilepsy and ragged red fibres) word algemeen veroorsaak deur spesifieke puntmutasies in die tRNA gene wat deur die mitochondriale DNA gekodeer word (James *et al.* 1996). In beide hierdie siektes veroorsaak die puntmutasies dat die aktiwiteit van kompleks I en IV

afneem. Mense met hierdie siektes het dus 'n kompleks I sowel as 'n sitochroom c oksidase defek.

2.3.4 DIAGNOSTIESE TOETSE

Die komplekse van die mitochondriale respiratorieseketting word beide deur mitochondriale DNA sowel as kern DNA gekodeer (Horton *et al.* 1996). As gevolg van die tweeledige aard van oksidatiewe fosforilasie, moet 'n defek in die mitochondriale respiratorieseketting vermoed word wanneer die pasiënte:

1. 'n onverklaarbare assosiasie van neuromuskulêre en/of nie-neuromuskulêre simptome toon,
2. die toestand van die pasiënt vinnig verswak,
3. wanneer onverwante organe en weefsel tergelyke tyd aangetas is (Munnich *et al.* 1996).

2.3.4.1 Siftingstoetse

Siftingstoetse is 'n reeks toetse wat gedoen word wanneer daar nie met sekerheid gesê kan word wat die defek by 'n pasiënt is nie. Die toetse volg op mekaar en afleidings word gemaak deur te kyk of die pasiënt positief of negatief reageer op sekere toetse. Indien die pasiënt positief toets vir 'n sekere siektetoestand kan daar verdere, meer spesifieke toetse gedoen word. Die siftingstoetse is 'n reeks lang eksperimente, maar is nuttig in die opsporing van respiratoriesekettingdefekte.

Siftingstoetse sluit die bepaling van laktaat, piruvaat, ketoonliggame en hulle molêre verhoudings in as aanduidings van die oksidasie-reduksiestatus van die sitoplasma en mitochondria. Hierdie bepalings moet in die vastende toestand en een uur na voeding by die pasiënte uitgevoer word en ook deur die dag herhaal word (Munnich *et al.* 1996). Om akkurate laktaat bepalings in die bloed van pasiënte te verseker moet die monsters by die

pasiënt in 'n rustende toestand geneem word. Die monster moet dadelik gedeprotoneer en verkoel word (Munnich *et al.* 1996).

Die teenwoordigheid van 'n volgehoue verhoogde bloedlaktaatvlakke (2.5 mM) met verhoogde laktaat tot piruvaat (L/P) verhoudings en ketoonliggaamverhoudings dui sterk op 'n respiratoriesekettingdefek (Munnich *et al.* 1996). Die laktaat tot piruvaat verhoudings word algemeen gebruik om veranderings in die laktaat en piruvaat konsentrasies in die liggaam waar te neem. Ketoonliggame word gevorm vanuit asetiel koënsiem A (Horton *et al.* 1996). Die ketoonliggame (β-hidroksibuteraat, asetoasetaat en asetoon) word gevorm wanneer die hoeveelheid asetiel koA te veel is om in die sitroensuursiklus te verwerk. Hierby kan die ondersoek van die redoksstatus in die plasma help om te onderskei tussen die verskillende meganismes van laktiese asidose, gebaseer op die *in vivo* molêre L/P- en ketoonliggaamverhoudings. 'n Defek in die oksidatiewe fosforilasie resulteer gewoonlik in L/P- verhoudings van groter as 20 en ketoonliggaamverhoudings van groter as 2. 'n Defek van die piruvaatdehidrogenase (PDH) kompleks resulteer in lae L/P-verhoudings (kleiner as 10) (Munnich *et al.* 1996). Dit blyk dat sitroensuursiklusdefekte ook in hoë L/P-verhoudings resulteer, maar in die geval is die molêre ketoonliggaam verhoudings laer (kleiner as 1) (Munnich *et al.* 1996).

Die standaardsiftingstoets word as volg, uitgevoer:
Doen ten minste 4 toetse daagliks in vastende toestand en 1 uur na voeding. Die volgende word getoets:

1. Plasma laktaat
2. Molêre plasma L/P verhoudings → redoks status in sitoplasma
3. Ketonemie (Paridoksale verhoging in gevoede individue)
4. Molêre plasma β-OH bottersuur/asetoasetaat verhouding → redoks status in die mitochondria.
5. Bloedglukose en vrye vetsure.
6. Urinêre organiese sure → laktaat, ketoonliggame, sitroensuursiklus intermediate.

Die volgende beladingstoetse word gedoen as die gewone siftingstoetse niks oplewer nie.

1. Glukose beladingstoets (2 g/kg oraal). Die toets word gedoen om latente hiperlaktatemia en/of paradoksale hiperketonurie te ontmasker.
2. Toets vir urienlaktaat en sitroensuursiklus intermediate deur gebruik te maak van gaschromatografie-massaspektrometrie.
3. Bepaling van die redoksstatus in die SSV om die verhoging van L/P-verhoudings waar te neem (Munnich *et al.* 1996).

Bogenoemde diagnostiese toetse kan misluk om enige verandering in die redoksstatus in die plasma waar te neem aangesien daar 'n hele aantal slaggate bestaan, byvoorbeeld:

1. Proksimale tubulopatie kan die bloedlaktaat verminder en die urienlaktaat verhoog.
2. Diabetes Mellitus kan die inbeweging van piruvaat in die sitroensuursiklus beïnvloed.
3. Weefselspesifieke isovorme kan selektief geblokkeer word sonder om die redoksstatus van die plasma te beïnvloed.
4. Wanneer die defek in kompleks II voorkom, gaan die defek skaars die redoksstatus beïnvloed (Munnich *et al.* 1996).

Wanneer die diagnostiese toetse negatief is, kan die respiratoriesekettingdefek nie gediagnoseer word nie, veral as daar net een simptoom teenwoordig is. Vir hierdie rede moet alle bekombare weefsel van pasiënte wat vermoedelik 'n defek in die respiratorieseketting het, stelselmatig ensiematies getoets word (Munnich *et al.* 1996).

2.3.4.2 Ensiemtoetse

Wanneer 'n abnormale redoksstatus in die plasma van die pasiënt waargeneem word, of wanneer die defek in meer as een orgaan uitgedruk word, moet verdere polarografies- en spektrofotometries-gebaseerde ensiemtoetse uitgevoer word (Munnich *et al.* 1996).

Polarografiese studies behels die meting van die hoeveelheid suurstof gebruik deur mitochondria-ryke fraksies deur middel van 'n Clarke elektrode in die teenwoordigheid van verskeie respiratoriese substrate (malaat en piruvaat, malaat en glutamaat, suksinaat, palmitiensuur ens.) (Munnich *et al.* 1996). Polarografiese studies benodig 400-500 µg mitochondriale proteïen wat vanaf spierbiopsies (100-200 mg) verkry word. Die weefsel wat in die tegniek gebruik word moet vars wees omrede geen polarografiese studie moontlik is op gevriesde materiaal nie (Munnich *et al.* 1996).

In die geval van 'n kompleks I-defek, het die polarografiese studies verswakte respirasie met die NADH-produserende substrate getoon, terwyl respirasie normaal was met FADH-produserende substrate (Munnich *et al.* 1996). Die teenoorgestelde is waargeneem vir kompleks II. 'n Defek in die respiratorieseketting by kompleks III of kompleks IV beïnvloed beide die oksidasie van NADH- en FADH-produserende substrate.

Spektrofotometriese studies behels die meting van respiratoriese ensiemaktiwiteite afsonderlik, of in 'n groep, deur gebruik te maak van spesifieke elektronakseptors of donors (Munnich *et al.* 1996). Die toetse word uitgevoer op lewer en nier weefselhomogenate en benodig 1-20 mg weefsel wat vanaf naaldbiopsies verkry word. Die monsters moet dadelik gevries of in vloeibare stikstof gehou word (Munnich *et al.* 1996).

Aangesien hierdie toetse vir diagnose gebruik word, moet die toetse baie akkuraat wees. Ongeag in watter weefsel die toestand uitgedruk word, is dit altyd goed om 'n velbiopsie te doen (Munnich *et al.* 1996) en soms is dit die enigste moontlikheid. Velbiopsies is relatief eenvoudig om te verkry as dit vergelyk word met die ander weefsel biopsies en dit is 'n goeie metode vir verifiëring van die biochemiese resultate. Weefsel soos spiere of lewer word gewoonlik gebruik in studies oor mitochondriale fosforilasie aangesien dit weefsel is wat baie energie van die respiratorieseketting vereis en die defek dus die maklikste in die weefsel opgespoor kan word (Wanders *et al.* 1993). Tog is dit ook moontlik om die defekte deur middel van 'n velbiopsie op te spoor.

Daar moet in gedagte gehou word dat *in vitro* ondersoeke na oksidatiewe fosforilasie moeilik bly ongeag van die weefsel wat gebruik word.

1. Normale respiratoriese ensiemaktiwiteite sluit nie mitochondriale disfunksies uit nie, al druk die weefsel wat getoets word die siektetoestand uit. Dit kan wees omdat 'n mens te doen het met 'n kinetiese mutant of weefsel heterogeniteit. In elk van die gevalle moet 'n mens uitgebreide genetiese analises uitvoer, ander weefsel toets en die toetse later weer herhaal.
2. Die verspreiding van kontrole waardes veroorsaak dat die ensiemdefekte nie altyd geïdentifiseer word nie aangesien die normaalwaardes soms oorvleuel met die van pasiënte.
3. Daar bestaan ook nie 'n betroubare metode vir die bepaling van kompleks I aktiwiteit in weefselkulture nie, aangesien die oksidasie van NADH-gegenereerde substrate by detergent-behandelde of vries-ontdooide kontrole selle veranderlik is en die rotenoon weerstandbiedende NADH-sitochroon c reduktase aktiwiteit baie hoog is in die weefsel.

2.4 PROBLEEMSTELLING EN DOELSTELLING

In die voorafgaande literatuuroorsig is daar aangetoon dat die mitochondriale elektrontransportketting 'n komplekse sisteem is wat verantwoordelik is vir die energieverskaffing van die liggaam (Zheng *et al.* 1990). Die komponente van die respiratorieseketting word deur beide mtDNA en kern DNA gekodeer (Munnich *et al.* 1996). Alle organe en weefsels is afhanklik van mitochondriale energieverskaffing en om hierdie rede kan 'n respiratoriesekettingdefek teoreties aanleiding gee tot enige simptoom in enige orgaan of weefsel op enige ouderdom (Scholte *et al.* 1987; Munnich *et al.* 1996). Daar word deesdae dus ook heelwat pasiënte beskryf wat een of ander mitochondriale respiratoriesekettingdefek besit (Sengers *et al.* 1984) en 'n hele paar van die siektetoestande is in Afdeling 2.3 beskryf. Heelwat van die probleme wat ondervind word

om die defekte te diagnoseer is ook in hierdie hoofstuk beskryf. Van die metodes wat gebruik kan word om die defekte op te spoor, is in Afdeling 2.3.3 beskryf. Dit blyk dus heel duidelik te wees dat daar nie 'n maklike metode bestaan waarmee defekte in die mitochondriale respiratorieseketting gelokaliseer kan word nie. Die Metabolisme Laboratorium van departement Biochemie en Mikrobiologie by die PU vir CHO is sedert die tagtigerjare gemoeid met die diagnose en opsporing van aangebore metaboliese defekte. Daar bestaan in die verband 'n vraag na die daarstelling van tegnieke om mitochondriale respirasie te kwantifiseer. Heelwat biochemiese profiele van pasiënte waarmee oor die jare te doen gekry is, dui op 'n mitochondriale defek. Met die daarstelling van tegnieke om mitochondriale respirasie te kwantifiseer, sal die diagnose en ensiematiese lokalisering van 'n aangebore defek versnel en vergemaklik word.

Die doelstelling van hierdie studie is dus om metodes vir die kwantifisering van mitochondriale respirasie te ondersoek en om hieruit 'n metode te selekteer en te standaardiseer wat die kwantifisering van mitochondriale respirasie in die plaaslike Metabolisme Laboratorium sal verseker.

Die volgende benaderingswyse is geformuleer:

- Ondersoek verskeie metodes van mitochondriale respirasie
- Selektering van 'n metode wat die beste aan die Metabolisme Laboratorium se behoeftes sal voldoen
- Standaardisering van die metode
- Daarstelling van normaalwaardes
- Toetsing en evaluering van die metode op pasiënte met moontlike aangebore mitochondriale defekte

HOOFSTUK 3

Eksperimentele Metodes

3.1 INLEIDING

In die vorige hoofstuk is daar aangetoon dat die kwantifisering van mitochondriale respirasie noodsaaklik is om aangebore metaboliese defekte te ondersoek. In hierdie hoofstuk word verskeie benaderingswyses ondersoek om mitochondriale respirasie te kwantifiseer, asook die standaardisering van die gepaste metode. Die eksperimentele metodes wat in hierdie studie aangewend is, word in hierdie hoofstuk beskryf, terwyl daar in die volgende hoofstukke slegs daarna verwys sal word. In die beskrywings van die eksperimentele metodes word daar slegs na die name van die buffers en reagense wat in die bepaalde metodes aangewend is verwys, want die volledige samestelling daarvan word in Bylaag 1 gegee.

3.2 KWANTIFISERING VAN MITOCHONDRIALE RESPIRASIE

3.2.1 AGTERGROND

Mitochondriale respirasie word gewoonlik gekwantifiseer in biologiese materiaal wat verkry word vanaf pediatriese pasiënte. Om mitochondriale respirasie suksesvol te kan kwantifiseer, word 'n metode benodig wat met die minimum hoeveelheid materiaal, 'n redelike volledige kwantifisering van mitochondriale respirasie kan lewer. Die beste tipe weefsel vir die bestudering van mitochondriale respirasie defekte is spierweefsel (Scholte *et al.* 1987; Rustin *et al.* 1994; Bakker *et al.* 1994; Trounce *et al.* 1996), maar ten minste 300 mg spierweefsel word benodig. Verder moet die mitochondria binne 'n tydperk van een uur nadat die weefsel verwyder is, geïsoleer wees (Rustin *et al.* 1994; Trounce *et al.* 1996). Die tipiese isolering van mitochondria behels homogenisering van die weefsel gevolg deur verskeie sentrifugeringstappe (Rustin *et al.* 1994; Chretien *et al.* 1995;

Trounce *et al.* 1996). Verkieslik moet die isolering in 'n koelkamer (4 °C) uitgevoer word (Trounce *et al.* 1996). Die spierweefsel word gewoonlik chirurgies onder narkose van die pasiënt verkry (Rustin *et al.* 1994; Trounce *et al.* 1996). As in ag geneem word dat die aanvraag vir 'n mitochondriale respirasie defek gewoonlik vir pediatriese pasiënte is, is die verkryging van 300 mg spierweefsel nie altyd 'n haalbare opsie nie. Verder is die pasiënte (soos beskryf in Hoofstuk 2) baie siek en kan 'n chirurgiese ingreep vir die verkryging van spierweefsel nie tot voordeel van die pasiënt strek nie. As gevolg van die feit dat gespesialiseerde vertrekke en apparaat nodig is om mitochondria te isoleer, en dit alles binne een uur na die isolering van die spierweefsel moet geskied, is dit nie wenslik om afhanklik te wees van spierweefsel vir die ondersoek na mitochondriale defekte in pediatriese pasiënte nie. Dit is wel moontlik om bloed sowel as 'n velbiopsie, vir die *in situ* kweking van die pasiënt se fibroblaste, van 'n pediatriese pasiënt te verkry. Die belangrikste vereiste vir 'n metode waarmee mitochondriale respirasie, onder die omstandighede soos hier bo beskryf, gekwantifiseer kan word, is dus dat die metode in staat moet wees om mitochondriale respirasie te kan kwantifiseer vanaf die minimum hoeveelheid materiaal, om sodoende 'n moontlike aangebore mitochondriale defek te ondersoek.

3.2.2 VERSKILLENDE BENADERINGSWYSES OM MITOCHONDRIALE RESPIRASIE TE KWANTIFISEER

Daar bestaan twee basiese metodes wat gevolg kan word om mitochondriale respirasie te kwantifiseer. Die eerste benadering is om mitochondriale membraanfraksies voor te berei en dan die aktiwiteite van die individuele mitochondriale komplekse te meet (Ragan *et al.* 1987; Lowerson *et al.* 1992; Trounce *et al.* 1996). Die ander benaderingswyse is om mitochondriale respirasie te kwantifiseer deur gebruik te maak van geïsoleerde mitochondria (Rickwood *et al.* 1987; Trounce *et al.* 1996) of aktief groeiende eukariotiese selle (Wanders *et al.* 1994; Robinson, 1996). Mitochondriale respirasie kan dan polarografies gemeet word as 'n funksie van die hoeveelheid suurstof gebruik (Granger &

Lehninger, 1982; Rustin *et al.* 1994; Hofhaus *et al.* 1996) of die hoeveelheid ATP geproduseer tydens 'n tydsverloop deur gebruik te maak van verskeie metodes (Trautschold *et al.* 1985; Wanders *et al.* 1993; Bates *et al.* 1994; Robinson, 1996; Chittock *et al.* 1998).

In die geval van eukariotiese selle kan van digitonien (Ventura *et al.* 1995) gebruik gemaak word om die selmembrane selektief deurlaatbaar te maak sodat die mitochondriale substrate in die mitochondria kan inbeweeg (Wanders *et al.* 1994; Hofhaus *et al.* 1996). In laasgenoemde benaderingswyse bly die mitochondria ongeskonde in sy natuurlike omgewing.

3.2.3 SAMEVATTING

'n Benaderingswyse wat moontlik die kriteria vir die kwantifisering van mitochondriale respirasie vanaf pediatriese materiaal kan bevredig, is om mitochondriale respirasie *in situ* te ondersoek. Geen isolering van mitochondria is nodig nie en met relatief min materiaal kan 'n verskeidenheid mitochondriale komplekse ondersoek word. Die selle word selektief deurlaatbaar gemaak met digitonien sodat mitochondriale kompleksspesifieke substrate toegang tot die mitochondria in die sel verkry. Hierdie benaderingswyse is al aangewend om mitochondriale respirasie defekte te ondersoek (Wanders *et al.* 1993; Wanders *et al.* 1994; Robinson, 1996; Wanders *et al.* 1996). Om *in situ* mitochondriale respirasie te meet moes 'n keuse gemaak word tussen die meting van suurstof verbruik of kwantifisering van ATP geproduseer. Die gepaste metode moet uiters sensitief wees, maklik op 'n roetine basis uitgevoer kan word en moet nie te veel sellulêre materiaal vereis nie. Ons het besluit op die meting van ATP produksie oor 'n sekere tyd aangesien die metode aan bogenoemde vereistes voldoen het. Die lusiferase-lusiferien ensiemsisteem bied die sensitiwiteit sowel as die eenvoudigheid wat benodig word om die hoeveelheid geproduseerde ATP te kwantifiseer. Daar kom egter 'n groot variasie in die literatuur voor ten opsigte van die tipe substrate, konsentrasies van reagense, buffers, pH's en selkonsentrasies (Wanders *et al.* 1993; Wanders *et al.* 1994; Robinson, 1996; Wanders *et al.* 1996). Daarom is besluit

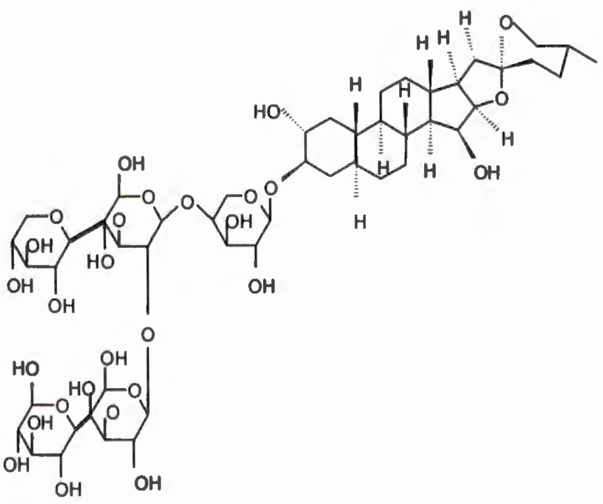
om die *in situ* mitochondriale respirasie tegniek te standaardiseer. Aspekte wat gestandaardiseer moet word sluit in: bepaling van die optimum digitonienkonsentrasie nodig om fibroblaste selektief deurlaatbaar te maak, optimalisering van die lusiferase-lusiferien ensiemreaksie, optimalisering van ATP ekstraksie uit selle, bepaling van die optimum substraatkonsentrasies vir die onderskeie mitochondriale komplekse asook die tydperk waaroor hierdie reaksies lineêr verloop. Ten laaste moet, aan die hand van kompleksspesifieke inhibeerders, bepaal word tot watter mate die onderskeie mitochondriale komplekse verantwoordelik is vir die waargenome respirasie.

Fibroblaste is die ideale weefsel om te gebruik tydens die optimalisering van die substraatkonsentrasies van die metode. 'n Probleem is egter die stadige groei van fibroblaste. Vir die standaardisering van die metode word 'n groot hoeveelheid selle benodig. Omdat N-2α neuroblastomaselle baie vinniger groei as fibroblaste is besluit om van N-2α neuroblastoma selle gebruik te maak tydens die standaardiseringsreaksies. Die finale kondisies is op fibroblaste getoets om seker te maak dat daar nie verskille tussen fibroblaste en N-2α neuroblastoma selle voorkom nie.

Om te bepaal of die gestandaardiseerde *in situ* mitochondriale respirasie analise wel instaat is om mitochondriale respirasie defekte in pasiënte aan te dui, is die resultate getoets aan die hand van 'n ander, algemeen aanvaarde metode. Daar is besluit om gebruik te maak van 'n spektrofotometriese metode om die aktiwiteit van geïsoleerde mitochondriale komplekse te bepaal soos beskryf deur Trounce *et al.* (1996). Vir die metode was dit nodig om die mitochondriale komplekse vanuit die fibroblaste te isoleer (Afdeling 3.6).

3.3 KWANTIFISERING VAN *IN SITU* MITOCHONDRIALE RESPIRASIE IN DIGITONIEN DEURLAATBAAR-GEMAAKTE EUKARIOTIESE SELLE

3.3.1 DEURLAATBAARMAKING VAN EUKARIOTIESE SELLE MET DIGITONIEN



Figuur 3.1 Struktuur van digitonien.

Die gebruik van digitonien om selle deurlaatbaar te maak, word algemeen in die literatuur beskryf (Wanders *et al.* 1993; Rustin *et al.* 1994; Wanders *et al.* 1994; Hofhaus *et al.* 1996; Robinson, 1996; Wanders *et al.* 1996). Hierdie benaderingswyse kan gevolg word om die funksionele eienskappe van die respiratorieseketting te ondersoek (Wanders *et al.* 1994). Digitonien is 'n steroïed glikosied (Fiskum *et al.* 1980) en word berei van die sade van *Digitalis purpurea.* Digitonien maak die plasmamembrane van eukariotiese selle deurlaatbaar deur met die membraan cholestrole en die ander ongekonjugeerde β hidroksie-sterole in die eukariotiese plasmamembraan te komplekseer (Scallen & Dietert, 1969; Mooney 1988; Hofhaus *et al.* 1996). Deur porieë te vorm, word die plasmamembraan se

deurlaatbaarheid vir anorganiese ione, metaboliete en ensieme verhoog (Fiskum *et al.* 1980; Hofhaus *et al.* 1996).

Digitonienkonsentrasies van 10 µg/ml tot 100 µg/ml affekteer slegs die cholestrol ryke plasmamembraan (Mooney, 1988). Die plasmamembraan bevat heelwat meer cholestrol as intrasellulêre membrane en daarom moet digitonien nie teen te hoë konsentrasies aangewend word nie (Colbeau *et al.* 1971). Met lae konsentrasies digitonien word slegs die plasmamembraan selektief deurlaatbaar gemaak en bly die mitochondria, ander organelle en die sitoskelet intakt (Colbeau *et al.* 1971; Fiskum *et al.* 1980; Mooney, 1988; Wolvetang *et al.* 1990). Die sitolitiese kompartement van die sel word wel beskikbaar gestel vir manupilasie en dit is hierdie selektiwiteit wat digitonien 'n voorsprong gee oor ander deurlaatbaarmakende reagense (Mooney, 1988).

Die binneste mitochondriale membraan bevat skynbaar geen cholestrole nie, terwyl die buitenste membraan relatief min cholestrole bevat (Colbeau *et al.* 1971). Die mitochondria word dus nie te erg beskadig wanneer lae digitonienkonsentrasies gebruik word nie en die mitochondria kan dus nog steeds hul funksies uitvoer (Hofhaus *et al.* 1996). Wanneer die digitonien-behandelde selle in buffer gevoeg word wat ADP, fosfaatgroepe en respiratoriese substrate bevat, kan die selle respireer (Hofhaus *et al.* 1996). Beide die hoeveelheid O_2 gebruik (Harris *et al.* 1981; Granger & Lehninger, 1982; Schoonen *et al.* 1990; Hofhaus *et al.* 1996) sowel as die hoeveelheid ATP geproduseer (Harris *et al.* 1981; Robinson, 1996; Wanders *et al.* 1996) kan gebruik word om *in situ* mitochondriale respirasie te meet. Om wel te verseker dat die mitochondria aktief bly en dat die plasmamembraan nie te erg beskadig word nie, moet die optimum hoeveelheid digitonien vir elke tipe eukariotiese sel bepaal word.

3.3.2 BEGINSEL VAN KWANTIFISERING VAN *IN SITU* MITOCHONDRIALE RESPIRASIE

Selektief deurlaatbaargemaakte selle wat in 'n isotoniese medium met respiratoriese substrate, ADP en vrye fosfaat geïnkubeer word, sal ATP produseer deur die betrokkenheid van die hele elektrontransportketting (Wanders *et al.* 1994; Hofhaus *et al.* 1996). Indien glutamaat en malaat (substrate vir kompleks I) gebruik word as respiratoriese substrate, sal NADH aan die matriks van die mitochondria gelewer word (Hofhaus *et al.* 1996; Robinson, 1996) deur die werking van die malaat-aspartaatpendel (Bremer & Davis, 1975; Majamaa *et al.* 1997) (Hoofstuk 2). In die intakte sisteem sal die elektrone van NADH oorgedra word na molekulêre suurstof (Hatefi, 1985) deur die komponente van die elektrontransportketting (Weiss *et al.* 1991) (Figuur 2.2). Die ensiemkomplekse van die respiratorieseketting koppel elektronoordrag aan proton translokasie oor die mitochondriale membraan (Weiss *et al.* 1991). Die translokasie van protone oor die binneste mitochondriale membraan (Frerman & Goodman, 1995), resulteer in 'n protongradiënt (Boyer, 1993). Die energie wat in die protongradiënt gestoor is, word gebruik deur ATP sintase (kompleks V) (Pedersen & Amzel, 1993) om die sintese van ATP vanaf ADP en vrye fosfaat te fasiliteer (Abrahams *et al.* 1994). Elektronoordrag tussen kompleks I, kompleks III en kompleks IV word bewerkstellig deur mobiele elektrondraers. Tussen kompleks I en kompleks III is ubiquinoon (Q) die mobiele elektrondraer (Lenaz & Fato, 1986). Q dra ook elektrone vanaf kompleks II na kompleks III (Lee *et al.* 1998). Sitochroom c is die mobiele elektrondraer tussen kompleks III en kompleks IV (Froud & Ragan, 1984). Die digitonienbehandelde selle kan ook van substrate voorsien word wat Q onafhanklik van die aktiwiteit van kompleks I sal reduseer. So sal suksinaat Q reduseer deur kompleks II (Lee *et al.* 1998) of gliserol-3-fosfaat sal Q reduseer deur gliserol-3-fosfaatdehidrogenase (EC 1.1.99.5) (Beleznai *et al.* 1988). Elektrone sal dan die elektrontransportketting binnedring by kompleks III met die gepaardgaande translokasie van protone en die hele proses, soos beskryf vir kompleks I, sal lei tot ATP produksie met die reduksie van molekulêre suurstof. Op dieselfde manier kan endogene sitochroom c in

die binneste mitochondriale membraan kunsmatig gereduseer word deur die byvoeging van askorbiensuur (vitamien c) en *N,N,N',N'*-tetrametiel-(-fenieldiamien) (TMPD) by die digitonienbehandelde selle (Granger & Lehninger, 1982; Robinson, 1996). Elektrone dring dan die elektrontransportketting binne by kompleks IV met die gepaardgaande translokasie van protone en die produsering van ATP.

Wanneer kompleks III deur antimisien ('n kompleks III inhibeerder) (Wanders *et al.* 1996) geïnhibeer word en NADH produserende substrate word by die digitonienbehandelde selle gevoeg, sal min of geen ATP geproduseer word nie. Wanneer min elektrone deur kompleks III vloei sal daar ook min protone oor die binneste mitochondriale membraan gedra word en gevolglik sal daar ook min ATP geproduseer word. Wanneer kompleks I substrate (substrate wat NADH produseer soos glutamaat en malaat) aan die digitonienbehandelde selle verskaf word en daar word min of geen ATP geproduseer, is die enigste afleiding wat gemaak kan word dat daar iets verkeerd is met die elektrontransportketting. Dit kan dus enige van die vyf ensiemkomplekse of mobiele elektrondraers wees wat nie korrek funksioneer nie. Die volgende stap in die lokalisering van die blok in die elektrontransportketting, is om endogene sitochroom c te reduseer deur askorbiensuur en TMPD by die digitonienbehandelde selle te voeg (Granger & Lehninger, 1982; Robinson, 1996). Daar kan dus nou gekyk word of die toevoeging van elektrone aan kompleks IV wel lei tot ATP produksie. Aangesien ons in die geval weet dat dit kompleks III is wat nie korrek funksioneer nie, sal kompleks IV wel die korrekte hoeveelheid ATP produseer deur die reduksie van sitochroom c. Die hoeveelheid ATP geproduseer deur die vloei van elektrone deur kompleks IV word vergelyk met dié van kontrole waardes. As die hoeveelheid ATP wat geproduseer is ooreenstem met die kontrole waardes, kan daar afgelei word dat die oksidasie van sitochroom c (gereduseerd) wel plaasvind en dat kompleks V die energie van die protongradiënt kon gebruik om ATP te produseer.

Die volgende stap in die lokalisering van die blok in die elektrontransportketting is om elektrone aan kompleks III beskikbaar te stel. Elektrone kan aan kompleks III voorsien

word deur die reduksie van Q. Q word deur kompleks II (met suksinaat as substraat) of met gliserol-3-fosfaatdehidrogenase (met gliserol-3-fosfaat as substraat) gereduseer. Die hoeveelheid ATP word bepaal en met kontrole waardes vergelyk. Ons weet in die geval dat kompleks III nie korrek funksioneer nie en dat min of geen ATP geproduseer sal word. Ons kan dan aflei dat of die reduksie van Q foutief is of dat daar iets verkeerd is met die pendel tussen Q en kompleks III of dat kompleks III nie instaat is om QH_2 te oksideer nie of dat kompleks III nie instaat is om die elektrone na sitochroom c oor te dra nie. Geen uitspraak oor die funksionaliteit van kompleks I (die oksidasie van kompleks I en die oordrag van elektrone na Q) kan gemaak word as kompleks III nie korrek funksioneer nie. Indien kompleks I deur rotenoon ('n kompleks I spesifieke inhibeerder) (Wanders *et al.* 1996) geïnhibeer word, sal normale ATP produksie deur kompleks III wel kan plaasvind. Indien dit kompleks IV is wat geïnhibeer word sal daar geen uitspraak gelewer kan word oor die betrokkenheid van kompleks I of kompleks III nie.

3.3.3 DIE BEGINSEL VAN LUMINOMETRIESE KWANTIFISERING VAN ATP.

Soos wat vroeër vermeld is, is besluit om luminometrie te gebruik vir die kwantifisering van ATP. In die teenwoordigheid van lusiferase vanaf *Photinus pyralis,* reageer ATP met *P. pyralis* lusiferien om pirofosfaat en adeniliel-lusiferien te lewer. Adeniliel-lusiferien word geoksideer deur molekulêre suurstof in die teenwoordigheid van dieselfde ensiem. Die reaksie lewer CO_2, AMP en oksilusiferien wat in 'n opgewekte toestand verkeer en wanneer oksilusiferien weer na die grondtoestand terugkeer, word 0.9 fotone met 'n golflengte van 562 nm uitgestraal vir elke molekule ATP wat gehidroliseer word. Wanneer optimale kondisies gebruik word, is die intensiteit van die uitgestraalde lig proporsioneel aan die ATP konsentrasie (Wulf & Döppen, 1985).

Die vergelyking vir die ligproduserende reaksie is as volg : (Bio-Orbit AN 200)

$$ATP + Lusiferien + O_2 \xrightarrow{\text{lusiferase}} oksilusiferien + ATP + PPi + CO_2 + LIG$$

3.4 OPTIMALISERING VAN DIE KONDISIES VIR DIE *IN SITU* KWANTIFISERING VAN MITOCHONDRIALE RESPIRASIE.

3.4.1 KWEKING EN VOORBEREIDING VAN N-2α NEUROBLASTOMASELLE.

N-2α neuroblastomaselle is gekweek in Ham se F12 medium (Gibco) met die byvoeging van 10 % (v/v) fetale kalfserum en antibiotika (B.1.2). Die selle is by 37 °C geïnkubeer in 'n inkubator met 5 % (v/v) CO_2. Die weefselkulture is vier-en-twintig uur voor gebruik met medium en fetale kalfserum sonder antibiotika gevoer (sien B.1.2), waarna die selle drie keer met 'n 1 x PBS oplossing (B.1.1) gewas is. Die selle is met 4 ml steriele tripsien/EDTA (B.1.4) behandel en vir 5-7 minute by 37 °C geïnkubeer (Nolte *et al.* 1997). Die tripsien is met medium sonder antibiotika vervang en die fles is liggies geskud om al die selle van die bodem los te maak. Die getripsineerde selle is in polipropileenbuise versamel, waarna die buise vir 'n halfuur in 'n 37 °C waterbad geïnkubeer is om die selmembrane kans te gee om te herstel. Hierna is die selle twee keer met 1 x PBS gewas en elke keer is die selle weer gesedimenteer deur dit te sentrifugeer vir 5 minute teen 400 x g. Die selle is weereens in 1 x PBS geresuspendeer en die proteïenkonsentrasie is bepaal deur gebruik te maak van die BCA metode (Smith *et al.* 1985). Die selle is verdun tot 'n finale konsentrasie van 1 mg/ml proteïene met 1 x PBS. Om te verseker dat al die ATP wat in die selle teenwoordig is en as agtergrondlesing waargeneem sal word, uitgeput word, is die selle vir 15 minute by 37 °C geïnkubeer waarna die selle op ys gelaat is tot met gebruik. Selle is so spoedig moontlik gebruik om te verhoed dat die aktiwiteit afneem.

3.4.2 BEPALING VAN DIE LINEÊRE GEBIED VIR ATP KWANTIFISERING MET LUSIFERASE-LUSIFERIEN.

Die metode wat gestandaardiseer is, is gebaseer op die metode van Wulff en Döppen (1985). Om die lineêre gebied vir die luminometriese analise te bepaal is 'n ATP-verdunningsreeks saamgestel. 'n ATP meesteroplossing is voorberei deur ATP (B.1.28) op te los in $MgSO_4$-oplossing (B.1.27). Die verdunningsreeks is so saamgestel dat die volgende ATP konsentrasies: 5, 2.75, 1.25, 0.5, 0.275, 0.125, 0.05, 0.0275, 0.0125 en 0.005 nmol ATP in 20 µl verkry is. Al die reaksies is by kamertemperatuur uitgevoer en die reaksiemengsels is in weggooibare polisterien kuvette (kuvette vir LKB Analiseerders 2171-091) saamgestel. Daar is 240 µl Volledige Buffer (B.1.26) en 40 µl lusiferase-lusiferien (B.1.29) in elk van die kuvette gevoeg waarna die kuvette vir 10 minute by kamertemperatuur gelaat is. Tydens die projek is daar gebruik gemaak van 'n Bio-Orbit 1253 luminometer (LKB instrumente, Turkye, Finland). Die kuvette is afsonderlik in die luminometer geplaas en die agtergrondlesing (A) is geneem deur vir 25 sekondes lank elke sekonde 'n lesing te neem en die gemiddeld (in mV) te bepaal. Die lesings verteenwoordig dus die hoeveelheid lig wat deur die lusiferase-lusiferien ensiemsisteem geproduseer word gedurende die tydperk. Nadat die agtergrondlesing bepaal is, is 20 µl van die ATP verdunning (soos hierbo beskryf) by die Volledige buffer en lusiferase-lusiferien in die kuvet gevoeg en weereens is die lesing (M), soos beskryf vir die agtergrondlesing, bepaal. Na hierdie stap is 10 µl van die eksterne ATP-standaard (B.1.28) bygevoeg en die (ES) lesing is bepaal. Die konsentrasie ATP is bereken deur gebruik te maak van die volgende vergelyking wat verkry is vanuit die ATP Analiserings Pakket handleiding:

$(((M-A)/(ES-M)) \times 0.1$ nmol ATP$)$ = nmol ATP in die monster.

Die resultate word in Afdeling 4.2.1 bespreek.

3.4.3 EKSTRAKSIE VAN ATP VANUIT EUKARIOTIESE SELLE

Trichloorasynsuur (TCA) is baie effektief vir die ekstraksie van ATP uit somatiese selle en word algemeen gebruik as 'n standaard waarteen ander ekstraksiemiddels getoets word (Stanley, 1986). Wanneer TCA by selle gevoeg word om dit te liseer en om al die ensieme wat ATP produseer te inaktiveer, word EDTA daarmeesaam by die selle gevoeg (Holmsen *et al.* 1972). Ongelukkig is die katalitiese aktiwiteit van die vuurvlieg lusiferase baie sensitief vir oplosmiddels (Kicka & De Luca, 1982) sowel as sekere ione soos byvoorbeeld Cl^- (Aledort *et al.* 1966). Die TCA in die reaksiemengsel moet dus verwyder of verdun word om te verseker dat die hoeveelheid ATP wat uit die sel vrygestel is, akkuraat gemeet kan word en dat die TCA nie met die lusiferase-lusiferien se werking inmeng nie. Volgens die vervaardigers van die luminometer is dit onwaarskynlik dat TCA konsentrasies van minder as 0.1% (v/v) sommer met die werking van die lusiferase ensiem sal inmeng (Bio-Orbit AN 200). Die minimum hoeveelheid TCA wat benodig word om die ATP effektief uit die selle vry te stel moet dus bepaal word.

3.4.3.1 Bepaling van die hoeveelheid TCA wat benodig word om ATP uit N-2α neuroblastomaselle vry te stel.

N-2α neuroblastomaselle was verdun met 1 x PBS om 'n konsentrasie van 0.2 mg/ml proteïene te lewer. Die suspensie is verdeel in Eppendorfbuise in 50 µl hoeveelhede. Die verdeling lewer 10 µg sellulêre proteïen per buisie. 50 µl Yskoue TCA is by elk van die buise gevoeg, in elkeen van die buise 'n ander konsentrasie TCA. Elkeen van die TCA konsentrasies het ook 2 mM EDTA bevat. Die volgende TCA konsentrasies (w/v) (in die finalevolume) is gebruik: 0.5%, 1.0%, 1.5%, 2.0%, 3.0% en 5 %. Die buise is deeglik gemeng, waarna dit vir 10 minute op ys gelaat is. Die TCA konsentrasies is tot minder as 0.1 % verdun deur 500 µl Volledige Buffer (B.1.26) by die reaksiemengsels in die buise te

voeg. Die buise is weereens gemeng waarna die ATP inhoud van die selle gemeet is soos beskryf in Afdeling 3.4.2. Die resultate word in Figuur 4.2 (Afdeling 4.2.2) gegee.

3.4.4 Bepaling van die Optimum Digitonienkonsentrasie om N-2α Neuroblastomaselle Selektief Deurlaatbaar te Maak.

'n Gewysigde weergawe van die metode van Wanders *et al.* (1993) is gebruik om die optimum digitonienkonsentrasie te bepaal. Die reaksiemengsels is in Eppendorfbuise op ys saamgestel tot 'n finale volume van 50 µl. Die reaksiemengsel het bestaan uit 30 µl Sitosolmengsel (B.1.8), 1 mM ADP (B.1.13) (Hofhaus *et al.* 1996; Robinson, 1996; Wanders *et al.* 1993), 10 mM glutamaat (B.1.9), 10 mM malaat (B.1.10) en verskillende konsentrasies digitonien (µg/ml) (Digitonien is opgelos in gedistilleerde water). N-2α neuroblastomaselle is bygevoeg tot 'n finale konsentrasie van 0.2 mg/ml (Wanders *et al.* 1993) en die buise is dadelik by 37 °C geïnkubeer (Wolvetang *et al.* 1990; Wanders *et al.* 1993; Robinson, 1996;) vir 20 minute (Wanders *et al.* 1993). Inkubasie by 37 °C aktiveer die reaksie. Na 20 minute is 50 µl 8 % (w/v) TCA/2 mM EDTA (B.1.24) by die reaksiemengsels gevoeg om die reaksie te stop en om die ATP uit die N-2α neuroblastomaselle vry te stel. Die reaksiemengsels is verder behandel soos beskryf in Afdeling 3.4.3.1 en die hoeveelheid ATP wat uit die selle vrygestel is, is bepaal soos beskryf in Afdeling 3.4.2. Die resultate van die analise word in Figuur 4.3 (Afdeling 4.2.3) gegee.

3.4.5 OPTIMALISERING VAN KONDISIES VIR ATP PRODUKSIE DEUR KOMPLEKS I

3.4.5.1 Kompleks I substraatkonsentrasie

Soos genoem in Afdeling 3.3.2 kan ATP produksie deur kompleks I verkry word deur die toevoeging van NADH tot die mitochondriale matriks deur die malaat-aspartaat pendel met glutamaat en malaat as substrate. Meesteroplossings is van glutamaat (B.1.9) en malaat (B.1.10) voorberei en by die sitosolmengsel (B.1.8) gevoeg tot finale konsentrasies soos aangedui in Figuur 4.4 (Afdeling 4.2.4.1). Die reaksiemengsels is weereens op ys saamgestel (Afdeling 3.4.4). Die N-2α neuroblastomaselle is tot 'n finale proteïenkonsentrasie van 0.2 mg/ml by die reaksiemengsels gevoeg en die reaksiemengsels is in 'n 37 °C waterbad geïnkubeer vir 20 minute (Wanders *et al.* 1993). Die reaksies is gestop en die vrygestelde ATP is bepaal soos beskryf in Afdelings 3.4.3.1 en 3.4.2. Die resultate word in Figuur 4.4 (Afdeling 4.2.4.1) gegee.

3.4.5.2 Lineêriteit van ATP produksie deur kompleks I.

Nadat die optimum substraatkonsentrasies vir ATP produksie deur kompleks I bepaal is, was die volgende stap om die lineêriteit van die ATP produksie deur kompleks I te bepaal met 10 mM glutamaat en malaat. Die reaksiemengsels is weereens op ys saamgestel (Afdeling 3.4.4) en het sitosolmengsel (B.1.8), ADP (B.1.13) en 10 mM glutamaat (B.1.9) en malaat (B.1.10) bevat. N-2α neuroblastomaselle is bygevoeg tot 'n finale proteïenkonsentrasie van 0.2 mg/ml en die reaksiemengsels is geïnkubeer in 'n 37 °C waterbad. Die reaksies is na sekere tydsintervalle, soos aangedui in Figuur 4.5, met 50 μl 8% (w/v) TCA/ 2 mM EDTA (B.1.24) gestop (Afdeling 3.4.3.1) en die ATP konsentrasies is bepaal (Afdeling 3.4.2). Die resultate word in Figuur 4.5 (Afdeling 4.2.4.2) gegee.

3.4.6 OPTIMALISERING VAN KONDISIES VIR ATP PRODUKSIE DEUR KOMPLEKS III DEUR GLISEROL-3-FOSFAATDEHIDROGENASE.

3.4.6.1 Kompleks III substraatkonsentrasie

Om ATP produksie deur kompleks III te toets is daar besluit om van gliserol-3-fosfaatdehidrogenase gebruik te maak om Q te reduseer. QH_2 dien dan as substraat vir ATP produksie deur kompleks III. 'n Meesteroplossing gliserol-3-fosfaat (B.1.14) is voorberei. Die reaksiemengsels is weereens op ys saamgestel soos beskryf in Afdeling 3.4.4 en gliserol-3-fosfaat is by die reaksiemengsels gevoeg tot 'n finale konsentrasie soos aangedui in Figuur 4.6 (Afdeling 4.2.5.1). N-2α neuroblastomaselle was bygevoeg tot 'n finale proteïenkonsentrasie van 0.2 mg/ml en die reaksiemengsels is vir 20 minute geïnkubeer in 'n 37 °C waterbad (Wanders *et al.* 1993). Die reaksies is gestop en die vrygestelde ATP is bepaal soos beskryf in Afdelings 3.4.3.1 en 3.4.2. Die resultate word in Figuur 4.6 (Afdeling 4.2.5.1) gegee.

3.4.6.2 Lineêriteit van ATP produksie deur kompleks III deur gliserol-3-fosfaatdehidrogenase

Die lineêriteit van ATP produksie deur kompleks III, deur die reduksie van Q deur gliserol-3-fosfaat, is volgende bepaal. Die reaksiemengsels (Afdeling 3.4.4) is op ys saamgestel en het sitosolmengsel (B.1.8), ADP (B.1.13) en 10 mM gliserol-3-fosfaat (B.1.14) bevat. N-2α neuroblastomaselle is bygevoeg tot 'n finale proteïenkonsentrasie van 0.2 mg/ml en die reaksiemengsels is geïnkubeer in 'n 37 °C waterbad. Die reaksiemengsels is na sekere tydsintervalle met 50 µl 8% (w/v) TCA/2 mM EDTA (B.1.24) gestop soos beskryf in Afdeling 3.4.3.1 en die ATP konsentrasies is bepaal (Afdeling 3.4.2). Die resultate word in Figuur 4.7 (Afdeling 4.2.5.2) gegee.

3.4.7 OPTIMALISERING VAN KONDISIES VIR ATP PRODUKSIE DEUR KOMPLEKS IV

3.4.7.1 Kompleks IV substraatkonsentrasie

Vir ATP produksie deur kompleks IV word endogene sitochroom c in die gereduseerde toestand gehou deur die byvoeging van 'n oormaat askorbiensuur en 'n klein hoeveelheid TMPD by die digitonienbehandelde selle (Granger & Lehninger, 1982; Hofhaus *et al.* 1996; Robinson, 1996). TMPD medieër die reduksie van sitochroom c deur askorbiensuur (Tzagoloff, 1982). Aangesien askorbiensuur en TMPD saamwerk, is daar besluit om die optimum TMPD konsentrasie vir ATP produksie deur kompleks IV te bepaal in die teenwoordigheid van 10 mM askorbiensuur aangesien daar in die literatuur 'n beskrywing vir 10 mM askorbiensuur vir ATP produksie deur kompleks IV voorkom (Hofhaus *et al.* 1996). 'n Meesteroplossing van TMPD (B.1.19) is berei waarvan verskeie verdunnings gemaak is om die optimum TCA konsentrasie vir ATP produksie deur kompleks IV te bepaal. Die reaksiemengsel is op ys saamgestel en het bestaan uit sitosolmengsel (B.1.8), ADP (B.1.13), askorbiensuur (B.1.17) en verskeie TMPD konsentrasies soos aangedui in Figuur 4.8 (Afdeling 4.2.6.1). N-2α neuroblastomaselle is bygevoeg tot 'n finale konsentrasie van 0.2 mg/ml en die reaksiemengsels is vir 20 minute (Wanders *et al.* 1993) geïnkubeer in 'n 37 °C waterbad. Die reaksiemengsels is met 50 µl 8% (w/v) TCA/2 mM EDTA (B.1.24) gestop soos beskryf in Afdeling 3.4.3.1 en die ATP konsentrasies is bepaal (Afdeling 3.4.2). Die resultate word in Figuur 4.8 (Afdeling 4.2.6.1) gegee.

Nadat die optimum TMPD konsentrasie bepaal is, was die volgende stap om die optimum askorbiensuurkonsentrasie te bepaal. 'n Meesteroplossing askorbiensuur (B.1.17) is berei. Reaksiemengsels is weereens saamgestel soos gedoen vir die bepaling van die optimum TMPD konsentrasie, behalwe dat 200 µM TMPD in elk van die buise gevoeg is. Verskillende askorbiensuur hoeveelhede (soos aangedui in Figuur 4.9, Afdeling 4.2.6.1) is

by die reaksiemengsels gevoeg. N-2α neuroblastomaselle is bygevoeg tot 'n finale proteïenkonsentrasie van 0.2 mg/ml en die reaksiemengsels is vir 20 minute (Wanders *et al.* 1993) geïnkubeer by 37 °C. Die reaksiemengsels is met 50 µl 8% (w/v) TCA/2 mM EDTA (B.1.24) gestop soos beskryf in Afdeling 3.4.3.1 en die ATP konsentrasies is bepaal (Afdeling 3.4.2). Die resultate word in Figuur 4.9 (Afdeling 4.2.6.1) gegee.

3.4.7.2 Lineêriteit van ATP produksie deur kompleks IV

Vervolgens is die lineêriteit van ATP produksie deur kompleks IV met 10 mM askorbiensuur en 200 µM TMPD getoets. Die reaksiemengsels (Afdeling 3.4.4) is op ys saamgestel en het die volgende bevat: sitosolmengsel (B.1.8), ADP (B.1.13), 10 mM askorbiensuur (B.1.17) en 200 µM TMPD. N-2α neuroblastomaselle is bygevoeg tot 'n finale proteïenkonsentrasie van 0.2 mg/ml en die reaksiemengsels is vir die tydsintervalle soos aangedui in Figuur 4.10 (Afdeling 4.2.6.2) geïnkubeer in 'n 37 °C waterbad. Die reaksiemengsels is met 50 µl 8 % (w/v) TCA/2 mM EDTA (B.1.24) gestop soos beskryf in Afdeling 3.4.3.1 en die ATP konsentrasies is bepaal (Afdeling 3.4.2). Die resultate word in Figuur 4.10 (Afdeling 4.2.6.2) gegee.

3.4.8 ATP PRODUKSIE IN DIE TEENWOORDIGHEID VAN KOMPLEKS-SPESIFIEKE INHIBEERDERS

Om seker te maak dat die ATP produksie wat waargeneem word wel deur oksidatiewe fosforilasie geproduseer is, word die ATP produksie vanaf die mitochondriale komplekse in die teenwoordigheid van inhibeerders wat spesifiek inwerk op die onderskeie mitochondriale komplekse, getoets. Vir ATP produksie deur kompleks I word 20 µg/ml rotenoon (B.1.20) (Wanders *et al.* 1996) by die reaksiemengsels gevoeg. Vir ATP produksie deur kompleks III word 10 µg/ml antimisien (B.1.21) en vir ATP produksie deur kompleks IV word natriumazied (B.1.23) tot 'n finale konsentrasie van 10 mM by die

reaksiemengsels gevoeg (Wanders *et al.* 1996). Die substrate is volgens die reeds bepaalde optimum konsentrasies by die reaksiemengsels gevoeg. Vir praktiese redes is daar besluit om die reaksies van ATP produksie deur die verskillende komplekse net vir 15 minute te laat plaasvind voordat dit met 50 µl 8 % (w/v) TCA/2 mM EDTA (B.1.24) gestop en die ATP vrygestel is soos in Afdeling 3.4.3.1. Die hoeveelheid ATP geproduseer is bepaal soos beskryf in Afdeling 3.4.2. Die resultate word in Figuur 4.11 gegee (Afdeling 4.2.7).

3.4.9 OPSOMMING VAN DIE OPTIMALISERING VAN DIE *IN SITU* KWANTIFISERING VAN MITOCHONDRIALE RESPIRASIE

Al die resultate vir die optimalisering van die *in situ* kwantifisering van mitochondriale respirasie word in Hoofstuk 4 gegee. Kondisies vir ATP produksie deur kompleks I, kompleks III en kompleks IV is geoptimaliseer deur gebruik te maak van verskillende substrate. Daar is gevind dat 10 mM glutamaat en malaat lei tot die maksimum ATP produksie deur kompleks I (Afdeling 3.4.5.1), terwyl 10 mM suksiensuur (B.1.12) die maksimum hoeveelheid ATP produseer deur kompleks II (Afdeling 3.4.6.1). 10 mM Gliserol-3-fosfaat sorg dat die maksimum hoeveelheid ATP deur kompleks III geproduseer word (Afdeling 3.4.7.1). 10 mM Askorbiensuur tesame met 200 µM TMPD sorg vir maksimum ATP produksie deur kompleks IV (Afdeling 3.4.8.1). Die reaksiemengsels is elke keer by 4 °C saamgestel (op ys) (Afdeling 3.4.4) en die verskillende substrate en/of inhibeerders is elke keer by die reaksiemengsels bygevoeg. N-2α neuroblastomaselle is elke keer tot 'n finale konsentrasie van 0.2 mg/ml (Afdeling 3.4.4) by die reaksiemengsels gevoeg waarna die reaksies begin is deur die buise in 'n 37 °C waterbad te plaas (Afdeling 3.4.4). Al die reaksies verloop lineêr vir ten minste 15 minute en die reaksies is dus elke keer toegelaat om vir 15 minute plaas te vind (Afdeling 3.4.10). Die reaksies is gestop (Afdeling 3.4.3.1) en die ATP vrygestel (Afdeling 3.4.3.1) waarna die hoeveelheid ATP wat deur die kompleks geproduseer is, gekwantifiseer is (Afdeling 3.4.2).

Nadat al die optimum substraat en inhibeerder konsentrasies nou in die N-2α neuroblastomaselle bepaal is, kon die metode in fibroblaste uitgevoer word. Die optimalisering van kondisies, soos bepaal vir N-2α neuroblastomaselle, is getoets op die fibroblaste en daar is gevind dat dieselfde kondisies ook in dié geval geld. Die resultate, soos wat dit verkry is vanaf fibroblaste word in Figuur 4.12 (Afdeling 4.2.8) gegee.

3.5 KWEKING EN VOORBEREIDING VAN FIBROBLASTE VIR MITOCHONDRIALE RESPIRASIE ANALISES

Fibroblastkulture word net soos N-2α neuroblastomaselle (Afdeling 3.4.2) by 37 °C en 5% (v/v) CO_2 in 75cm^2 flesse (NUNC) gekweek soos voorheen beskryf (Van der Westhuizen, 1993). Die selle is elke vierde dag met medium (B.1.2) gevoer en wanneer 'n volledige monolaag gevorm het, is die selle geoes. Die weefselkulture is met behulp van 'n fasekontrasmikroskoop ondersoek. Die fibroblaste is net soos die N-2α neuroblastomaselle voorberei vir mitochondriale respirasie analises.

3.6 KLINIESE BEELDE

Die metode, soos beskryf in Afdeling 3.4.9 is oorgedra op fibroblaste en die metode is toegepas op pasiënte. Die resultate word in Figuur 4.13 en Figuur 4.14 (Afdeling 4.3) gegee. Die pasiënte het die volgende kliniese beelde getoon.

3.6.1 KLINIESE BEELD VAN BABA RV

Baba RV is op 07-05-1997 gebore. Op 22-09-1997 is die volgende resultate verkry uit bloed wat van die baba getrek is. Die arteriële laktaatvlakke was 4.16 mmol/L (normaalwaardes 0.36-0.75 mmol/L) en arteriële piruvaatvlakke was 0.16 mmol (normaalwaardes 0.03-0.08 mmol/L). Die baba was nie asidoties nie en het ook geen reuk

vertoon nie. Die hoofprobleem wat ondervind is, was die uiters verhoogde laktaatvlakke wat kon dui op 'n moontlike glutaarsuururie tipe II of 'n elektrontransportketting defek (Afdeling 2.3). Om die rede is 'n velbiopsie van die pasiënt geneem en opgekweek soos beskryf vir die uitvoering van mitochondriale respirasie analises (Afdeling 3.5).

3.6.2 KLINIESE BEELD VAN BABA CT

Baba CT is gebore op 21-01-1997 en die volgende waarnemings is kort na geboorte gemaak. Die baba het tekens van metaboliese asidose getoon met 'n vergrote anioongaping. Die serum-laktaat vlakke was verhoog tot 9.82 mmol/L en die serum-piruvaat vlakke was verhoog tot 200 µmol/L. Die serum-laktaat tot piruvaat verhouding was verhoog tot 49.1 (normaal 10-25). Die ammoniak vlakke was 93.49 µmol/L (normaal waarde 7-35 µmol/L). Organiesesuur analises het gedui op 'n geweldige laktiese asidose met die gepaardgaande 2-OH-bottersuur en ook verhoogde vlakke van 3-OH-bottersuur en asetoasetaat wat dui op ketose. Verhoogde ρ-OH-feniellaktaat het gedui op 'n moontlike lewer betrokkenheid, alhoewel die tirosienvlakke normaal was wat die moontlikheid van tirosinemie uitgesluit het. Weereens is 'n velbiopsie van die pasiënt geneem en opgekweek soos beskryf vir die uitvoering van mitochondriale respirasie analises (Afdeling 3.5).

3.7 ISOLERING VAN MITOCHONDRIALE KOMPLEKSE UIT FIBROBLASTE

Die metode is gebaseer op die werk van Lowerson *et al.* (1992). Ses 75 cm^2 flesse fibroblastselle van elke kontrole persoon en pasiënt is volgens die beskryfde metode gekweek (Afdeling 3.5). Die selle is 24 uur voor gebruik met medium wat nie antibiotika bevat nie gevoer (B.1.2), waarna die selle geoes is soos reeds beskryf (Afdeling 3.5). Die selle is vir 10 minute by 400 x g by 4 °C gesentrifugeer. Die selle is in 3 ml Mitomix

(B.1.31) gesuspendeer en weereens vir 10 minute teen 400 x g by 4 °C gesentrifugeer, waarna die selle in 1 ml van die Mitomix geresuspendeer en na die homogeniseerder oorgedra is. Die volume in die homogeniseerder is aangevul tot 4 ml met Mitomix. Die selle is 10 keer teen 500 rpm gehomogeniseer terwyl dit op ys gehou is. Die homogenaat is vir 10 minute teen 570 x g by 4 °C gesentrifugeer waarna die supernatant onttrek is en op ys bewaar is, terwyl die presipitaat vir 'n tweede keer aan die homogeniseringsproses onderwerp is. Die twee stelle supernatante is gekombineer en vir 10 minute by 14 600 x g by 4 °C gesentrifugeer. Die supernatant is onttrek en die presipitaat is in 120 µl Mitomix geresuspendeer. Die proteïenkonsentrasie is bepaal (Afdeling 3.4.1) en die mitochondriale-kompleksmengsel is tot 5 mg proteïen/ml verdun waarna dit by -80°C bewaar is totdat dit gebruik is. Net voor gebruik was die mitochondria deur 3 vries en ontvries siklusse geneem om lise van die mitochondria te verseker vir die lewering van mitochondriale membrane.

3.8 BEPALING VAN DIE AKTIWITEIT VAN GEÏSOLEERDE MITOCHONDRIALE KOMPLEKSE

Die metode is gebaseer op die metode van Trounce *et al.* (1996) en die reaksiemengsels is saamgestel tot 'n finale volume van 400 µl.

3.8.1 KOMPLEKS II EN III: SUKSINAAT-SITOCHROOM C OKSIDOREDUKTASE

Die reaksiemengsel is in die kuvette saamgestel en het bestaan uit 40 mM kaliumfosfaatbuffer, 20 mM suksinaat, 0.5 mM EDTA, 2 mM KCN, water en 30 µg/ml mitochondriale proteïen. Die reaksiemengsel is vir 10 minute lank by 30 °C geïnkubeer en daarna is die blanko lesing geneem. Die reaksie is geïnisieër deur 30 µM sitochroom c by

te voeg en die lineêre absorbansie verhoging is elke 10 sekondes vir 7 minute lank waargeneem by golflengte 550 minus 540 nm (ekstinksie koeffisiënt 19.0 $mM^{-1}cm^{-1}$)

3.8.2 KOMPLEKS IV: FERROSITOCHROOM C: SUURSTOF OKSIDOREDUKTASE EC 1.9.3.1. SITOCHROOM C OKSIDASE

Die reaksiemengsel is weereens in die kuvette saamgestel en het bestaan uit 10 mM kaliumfosfaatbuffer met 0.025% lauriel-maltosied, water en 10 μg mitochondriale proteïen. Die blankolesing is bepaal en 20 μM gereduseerde sitochroom c is by die reaksiemengsel gevoeg om die reaksie te begin. Die afname in absorbansie is vir 7 minute lank elke 10 sekondes bepaal by golflengte 550 minus 540 nm (ekstinksie koeffisiënt 19.0 $mM^{-1}cm^{-1}$)

3.8.3 SITRAATSINTASE EC 4.1.3.7

Sitraatsintase is nie betrokke by elektrontransport nie. Juis om dié rede kan sitraatsintase as merkerensiem gebruik word om te verseker dat defekte in die komplekse van die elektrontransportketting wel waargeneem word en dat dit nie net 'n foutiewe reaksiemengsel is wat verantwoordelik vir die resultate is nie. Die reaksiemengsel is in die kuvette saamgestel en het bestaan uit 0.1 M Tris-HCl pH 8.0, 0.3 mM asetiel KoA, 0.1 mM DTNB, gedistilleerde water en 10 μg mitochondriale proteïen. Die reaksiemengsel is vir 10 minute by 30 °C geïnkubeer waarna die blankolesing geneem is. Die reaksie is begin deur 0.5 mM oksaloasetaat by te voeg en die verloop van die reaksie is waargeneem by golflengte 412 minus 360 nm (ekstinksie koeffisiënt 13.6 $mM^{-1}cm^{-1}$) deur die absorbansie verandering vir 7 minute lank elke 10 sekondes waar te neem.

3.9 SAMEVATTING

In Hoofstuk 3 is al die metodes wat gebruik is tydens die uitvoering van die projek aangetoon. In Hoofstuk 4 word die resultate wat met hierdie metodes verkry is, gegee.

HOOFSTUK 4

Resultate

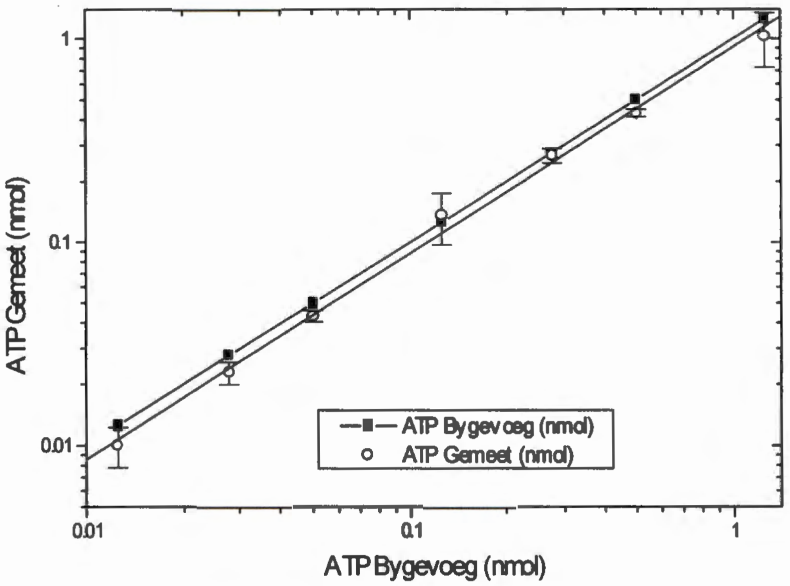
4.1 INLEIDING

In Hoofstuk 3 is die standaardisering van die metodes vir die toetsing van die ATP-produserende aktiwiteit van die verskillende komplekse beskryf. In Hoofstuk 4 word die resultate wat verkry is tydens die ontwikkeling van die metode gegee en word hierdie metodes gebruik om die aktiwiteit van die elektrontransportketting te toets in pasiënte wat vermoedelik 'n elektrontransportkettingdefek het.

4.2 RESULTATE VAN DIE OPTIMALISERING VAN DIE KONDISIES VIR DIE *IN SITU* KWANTIFISERING VAN MITOCHONDRIALE RESPIRASIE

4.2.1 BEPALING VAN DIE LINEÊRE GEBIED VIR ATP KWANTIFISERING MET LUSIFERASE-LUSIFERIEN.

Die lineêre gebied vir ATP kwantifisering met die lusiferase-lusiferien ensiem is bepaal soos beskryf in Afdeling 3.4.2 en die resultate word in Figuur 4.1 gegee. In Figuur 4.1 kan daar gesien word dat die lineêre deteksiegebied van die lusiferase-lusiferien strek van ongeveer 15 pmol ATP tot 1 nmol ATP. Nie net is die gebied baie lineêr nie (r = 0.999), maar stem die hoeveelheid ATP wat gemeet is baie ooreen met die hoeveelheid ATP wat in die sisteem ingevoeg is. Die metingsmetode is dus baie akkuraat.

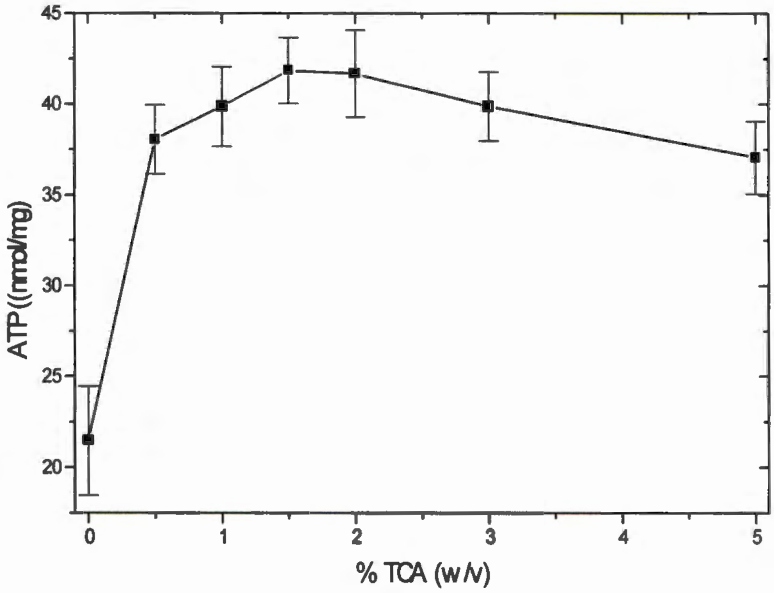


Figuur 4.1 Lineêre gebied van die luminometriese kwantifisering van ATP Die resultate word uitgedruk as 'n gemiddeld ± S.A. (n = 3)

4.2.2 BEPALING VAN DIE HOEVEELHEID TCA WAT BENODIG WORD OM ATP UIT N-2α NEUROBLASTOMASELLE VRY TE STEL.

Die bepaling van die hoeveelheid TCA wat benodig word om ATP effektief uit die N 2α neuroblastomaselle vry te stel, is gedoen volgens die metode beskryf in Afdeling 3.4.3.1 en die resultate word in Figuur 4.2 gegee. In Figuur 4.2 kan 'n skerp verhoging in die vrystelling van ATP vanuit die N-2α neuroblastomaselle gesien word vanaf 0.5 % (w/v) TCA. Ongeveer 2 % (w/v) TCA het die ATP die beste vrygestel. Vanaf 2 % (w/v) TCA het die hoeveelheid ATP wat vrygestel is afgeneem met die toename in die TCA konsentrasie. Hierdie verskynsel kan toegeskryf word aan die invloed van die TCA met die lusiferase ensiemaktiwiteit eerder as wat TCA nie die ATP effektief vrystel nie. Dit is onwaarskynlik dat die hoeveelheid ATP wat deur 4% (w/v) TCA vrygestel is veel sal verskil met die hoeveelheid ATP wat met 2% (w/v) TCA vrygestel is. Aangesien daar van eksterne standaardisasie gebruik gemaak word wanneer die hoeveelheid ATP gekwantifiseer word, is daar besluit dat 4 % (w/v) TCA 'n beter keuse is om te verseker dat

die maksimum hoeveelheid ATP altyd uit die N-2α neuroblastomaselle vrygestel word. Die ekstraksie is altyd in die teenwoordigheid van 2 mM EDTA gedoen.

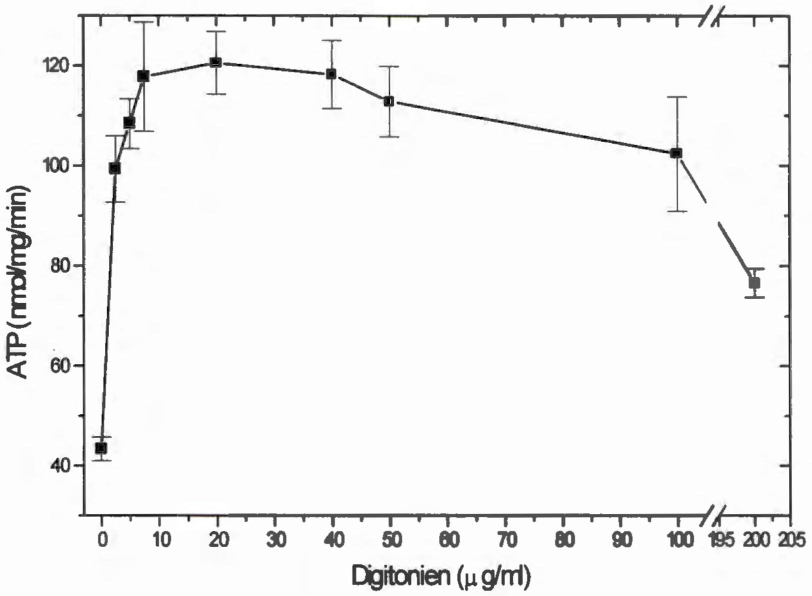


Figuur 4.2 Ekstraksie van ATP by verskillende TCA-konsentrasies
Resultate word uitgedruk as 'n gemiddeld ± S.A. (n = 3)

4.2.3 BEPALING VAN DIE OPTIMUM DIGITONIENKONSENTRASIE OM N-2α NEUROBLASTOMASELLE SELEKTIEF DEURLAATBAAR TE MAAK.

Die metode wat gebruik is vir die bepaling van die optimum digitonienkonsentrasie word in Afdeling 3.4.4 beskryf. Die resultate word in Figuur 4.3 gegee en hierin kan 'n baie skerp styging in die hoeveelheid ATP wat geproduseer word gesien word met slegs 2.5 μg/ml digitonien teenwoordig. Vanaf 20 tot 40 μg /ml digitonien word die meeste ATP geproduseer waarna die hoeveelheid ATP geproduseer vanaf 50 tot 200 μg/ml digitonien afneem. Die waarneming kan toegeskryf word aan die feit dat die digitonien komplekse

vorm met die cholestrole in die mitochondriale membrane en dat die membrane nou so beskadig is dat elektrontransport ontkoppel is. Na aanleiding van die resultaat is besluit om 'n finale digitonienkonsentrasie van 40 μg/ml te gebruik om die plasmamembrane van die N-2α neuroblastomaselle selektief deurlaatbaar te maak. Die konsentrasie stem ook ooreen met die hoeveelheid digitonien wat Wanders *et al.* (1993) as die optimum hoeveelheid digitonien beskryf het om fibroblastselle selektief deurlaatbaar te maak.



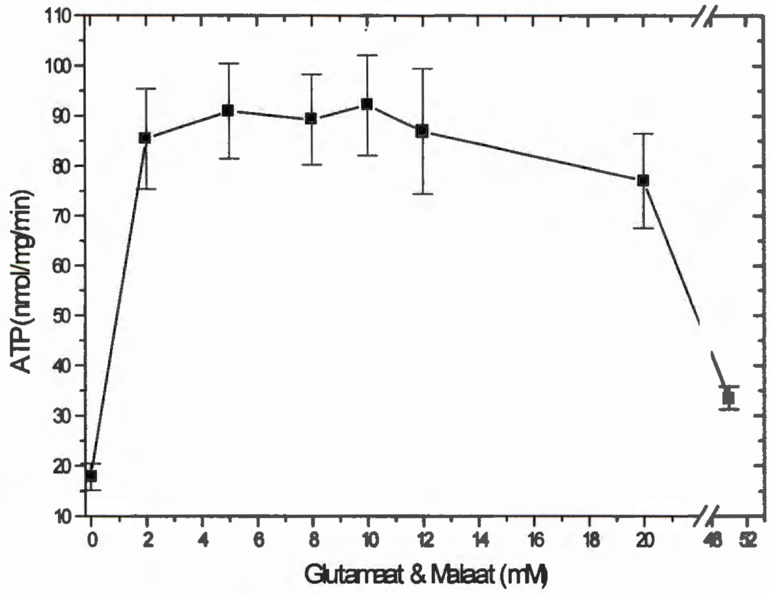
Figuur 4.3 Effek wat 'n toenemende digitonienkonsentrasie op ATP produksie het Die resultate word uitgedruk as 'n gemiddeld ± S.A. (n = 3)

4.2.4 OPTIMUM KONDISIES VIR ATP PRODUKSIE DEUR KOMPLEKS I

4.2.4.1 Kompleks I substraatkonsentrasie

Die bepaling van die optimum kompleks I substraatkonsentrasie word in Afdeling 3.4.5.1 beskryf en die resultate word in Figuur 4.4 gegee. In hierdie figuur kan 'n skerp toename in ATP produksie gesien word soos wat die malaat en glutamaat konsentrasies styg. Vanaf

5 tot 10 mM glutamaat en malaat styg die hoeveelheid ATP geproduseer nie meer nie en daar kan selfs 'n afname in ATP produksie gesien word vanaf 12 mM glutamaat en malaat. Die waarneming kan toegeskryf word aan die feit dat die sellulêre sisteme heeltemal oorlaai is en dat effektiewe ATP produksie nie moontlik is nie. Uit die resultate wil dit dus blyk dat 'n substraatkonsentrasie van 10 mM glutamaat en malaat die optimum kondisies is vir ATP produksie deur kompleks I is. Die konsentrasies glutamaat en malaat stem ook ooreen met die konsentrasies wat Wanders *et al.* (1993) as die optimum konsentrasies beskryf het om ATP vanaf kompleks I in digitonien behandelde fibroblastselle te produseer.

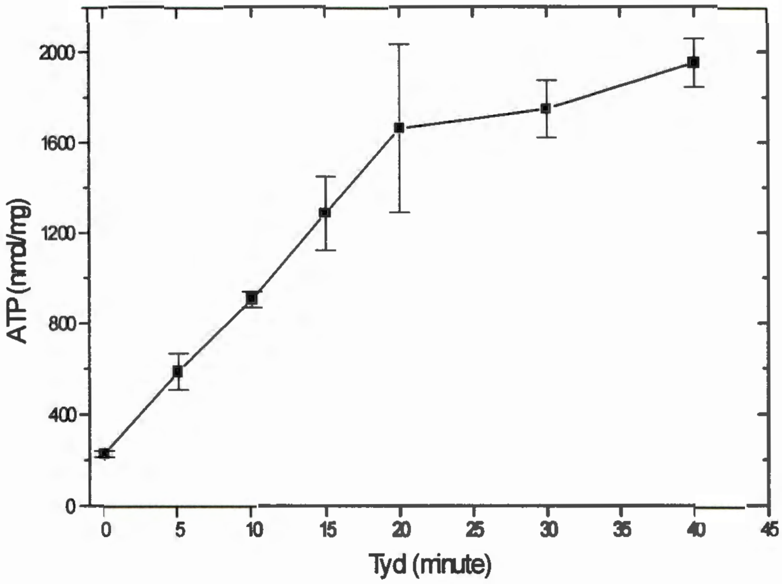


Figuur 4.4 Verwantskap tussen glutamaat- en malaatkonsentrasies en die hoeveelheid ATP geproduseer
Resultate word uitgedruk as 'n gemiddeld ± S.A. (n = 3)

4.2.4.2 LINEËRITEIT VAN ATP PRODUKSIE DEUR KOMPLEKS I.

Die metode wat gebruik is om die lineêriteit van ATP produksie deur kompleks I te bepaal is in Afdeling 3.4.5.2 beskryf en die resultate word in Figuur 4.5 gegee. In Figuur 4.5 kan

gesien word dat ATP produksie deur kompleks I met 10 mM glutamaat en malaat as substrate lineêr is vir 20 minute waarna die kurwe afplat.



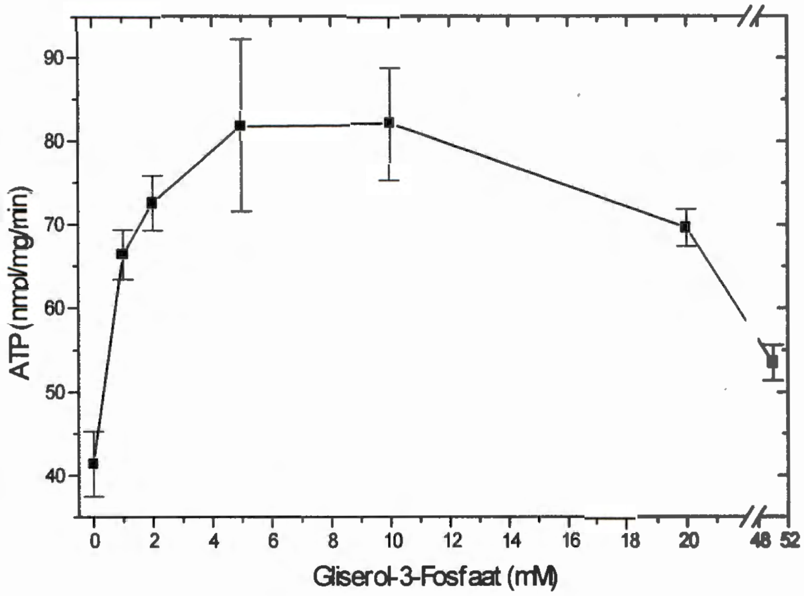
Figuur 4.5 Lineêriteit van ATP produksie deur kompleks I
Die resultate word gegee as 'n gemiddeld ± S.A. (n = 3)

4.2.5 OPTIMALISERING VAN KONDISIES VIR ATP PRODUKSIE DEUR KOMPLEKS III DEUR GLISEROL-3-FOSFAAT DEHIDROGENASE.

4.2.5.1 Kompleks III substraatkonsentrasie

Die bepaling van die optimum kompleks III substraatkonsentrasie word in Afdeling 3.4.6.1 beskryf en die resultate word in Figuur 4.6 gegee. In Figuur 4.6 kan 'n sterk styging in die hoeveelheid ATP geproduseer deur kompleks III gesien word soos wat die konsentrasie gliserol-3-fosfaat toeneem. Die maksimum ATP produksie kom voor vanaf 5 tot 10 mM gliserol-3-fosfaat. Met meer as 10 mM gliserol-3-fosfaat neem die hoeveelheid ATP wat

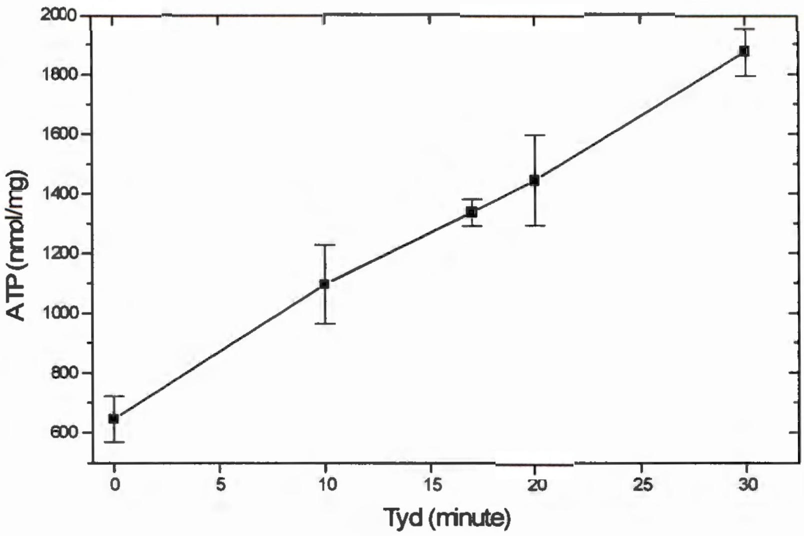
geproduseer is weer af. Daar is besluit om 10 mM gliserol-3-fosfaat te gebruik vir optimum ATP produksie deur kompleks III.



Figuur 4.6 Verwantskap tussen die gliserol-3-fosfaat konsentrasie en die hoeveelheid ATP geproduseer
Resultate word gegee as 'n gemiddeld ± S.A. (n = 3)

4.2.5.2 Lineêriteit van ATP produksie deur kompleks III deur gliserol-3-fosfaatdehidrogenase

Die metode wat gebruik is om die lineêriteit van ATP produksie deur kompleks III te bepaal is in Afdeling 3.4.6.2 beskryf en die resultate word in Figuur 4.7 gegee. In Figuur 4.7 kan gesien word dat ATP produksie deur kompleks III met 10 mM gliserol-3-fosfaat as substraat is lineêr regdeur die tydreeks wat in die eksperiment gebruik is. Daar kan dus aangeneem word dat ATP produksie deur kompleks III lineêr is vir ten minste 30 minute.

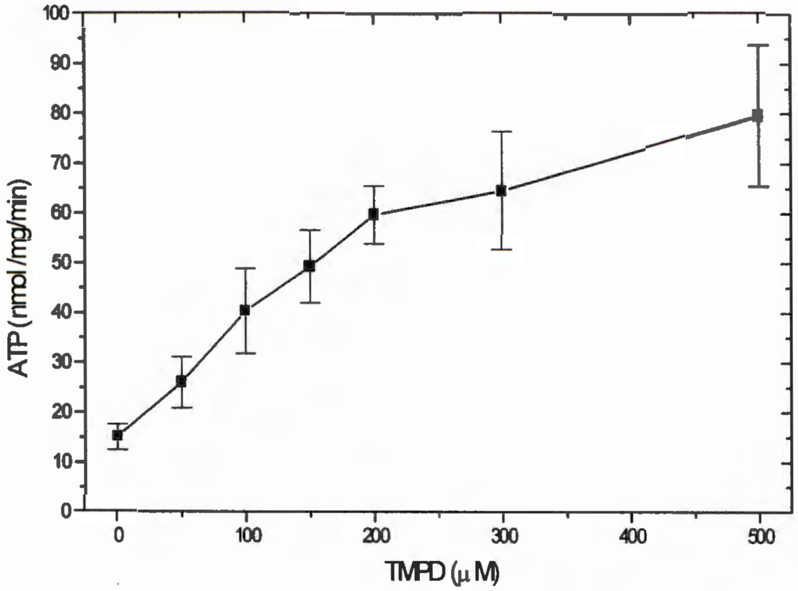


Figuur 4.7 Lineêriteit van ATP produksie deur kompleks III deur gliserol-3-fosfaatdehidrogenase
Die resultate word gegee as 'n gemiddeld ± S.A. (n=3)

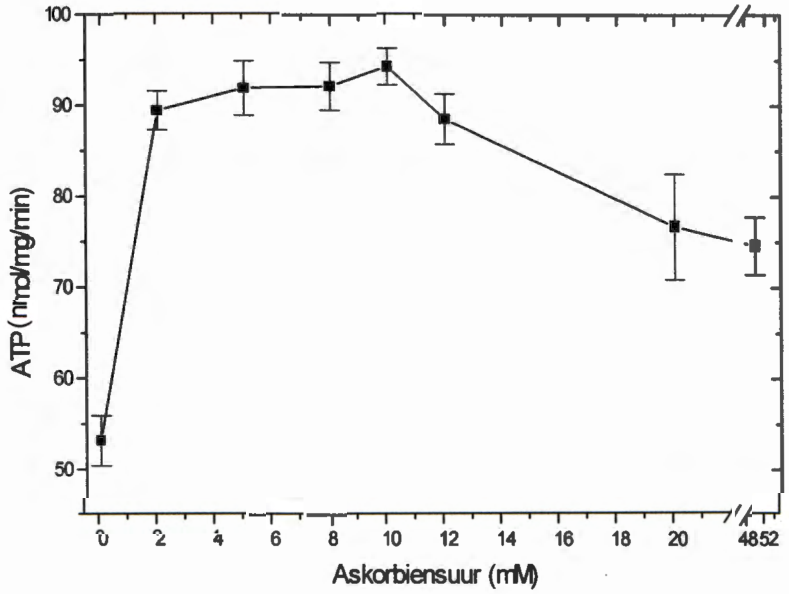
4.2.6 OPTIMALISERING VAN KONDISIES VIR ATP PRODUKSIE DEUR KOMPLEKS IV

4.2.6.1 Kompleks IV substraatkonsentrasie

Die bepaling van die optimum kompleks IV substraatkonsentrasie word in Afdeling 3.4.7.1 beskryf en die resultate word in Figuur 4.8 en Figuur 4.9 gegee. In die teenwoordigheid van 10 mM askorbiensuur, verhoog die ATP produksie deur kompleks IV lineêr tot en met 200 μM TMPD, waarna daar 'n effense afname in die helling voorkom. Konsentrasies van 100 μM TMPD (Robinson, 1996) en 200 μM TMPD (Hofhaus *et al.*, 1996) word in die literatuur saam met askorbiensuur gebruik vir ATP produksie deur kompleks IV. Op grond van die literatuur en die resultate van Figuur 4.8, het ons besluit om 200 μM TMPD vir ATP produksie deur kompleks IV te gebruik.



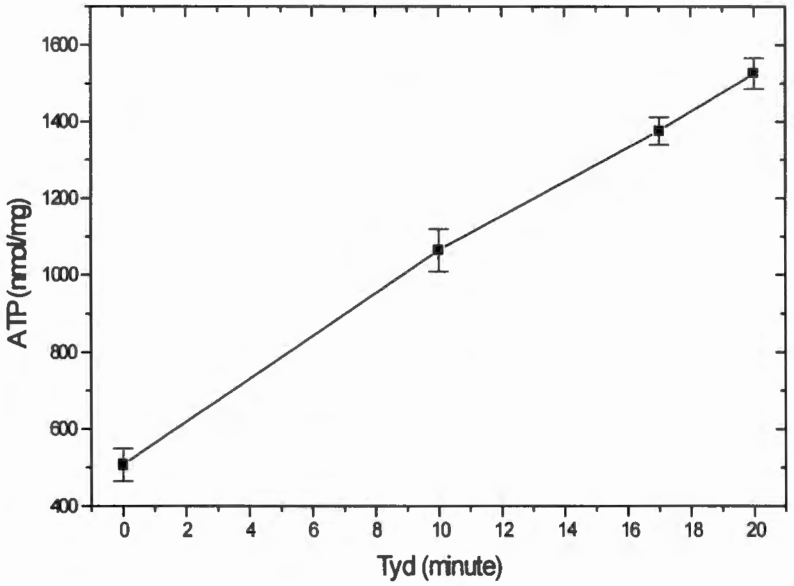
Figuur 4.8 Verwantskap tussen TMPD konsentrasie en die hoeveelheid ATP geproduseer in die teenwoordigheid van 10 mM askorbiensuur. Resultate word uitgedruk as 'n gemiddeld ± S.A. (n = 3)



Figuur 4.9 Verwantskap tussen die askorbiensuurkonsentrasie en die hoeveelheid ATP geproduseer in die teenwoordigheid van 200 μM TMPD Resultate word as gemiddeld ± S.A. gegee (n = 3)

Met die optimum TMPD- konsentrasie bepaal, is die optimum askorbiensuurkonsentrasie vervolgens bepaal. Net soos met ATP produksie deur kompleks I en kompleks III, word 'n skerp verhoging in ATP produksie waargeneem soos wat die askorbiensuurkonsentrasie verhoog word (Figuur 4.9). 'n Plato in die ATP produksie word bereik tussen 2 en 10 mM askorbiensuur, waarna die produksie van ATP afneem. Dit kan wees as gevolg van die nie-spesifieke reduserings eienskappe van askorbiensuur. Op grond van die resultate in Figuur 4.9 en die hoeveelheid askorbiensuur wat in die literatuur (Hofhaus *et al.* 1996) aangedui word, is daar besluit om 10 mM askorbiensuur saam met 200 µM TMPD as optimum substraatkonsentrasies vir ATP produksie deur kompleks IV in N-2α neuroblastomaselle te gebruik.

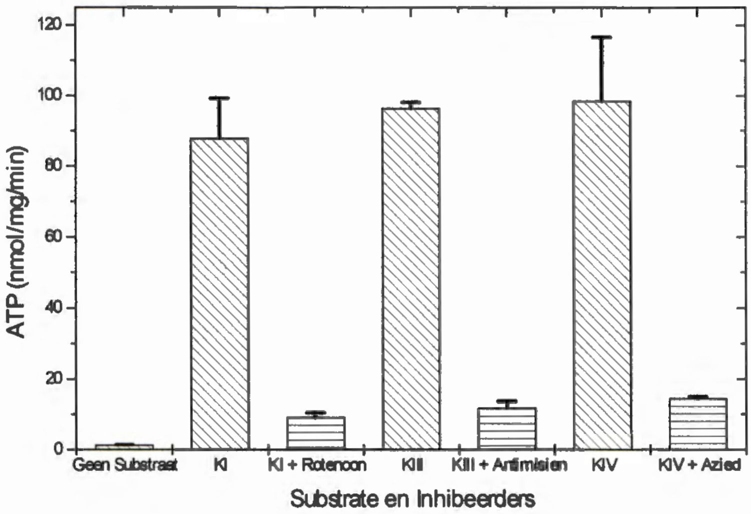
4.2.6.2 Lineêriteit van ATP produksie deur kompleks IV



Figuur 4.10 Lineêriteit van ATP produksie deur kompleks IV met 10 mM askorbiensuur en 200 µM TMPD as substrate
Resultate word as 'n gemiddeld ± S.A. uitgedruk (n = 3)

Die metode wat gebruik is om die lineêriteit van ATP produksie deur kompleks IV te bepaal is in Afdeling 3.4.7.2 beskryf en die resultate word in Figuur 4.10 gegee en in die figuur kan daar gesien word dat ATP produksie deur kompleks IV lineêr is, regdeur die tydreeks (20 minute) wat in die eksperiment gebruik is.

4.2.7 ATP PRODUKSIE IN DIE TEENWOORDIGHEID VAN KOMPLEKS SPESIFIEKE INHIBEERDERS

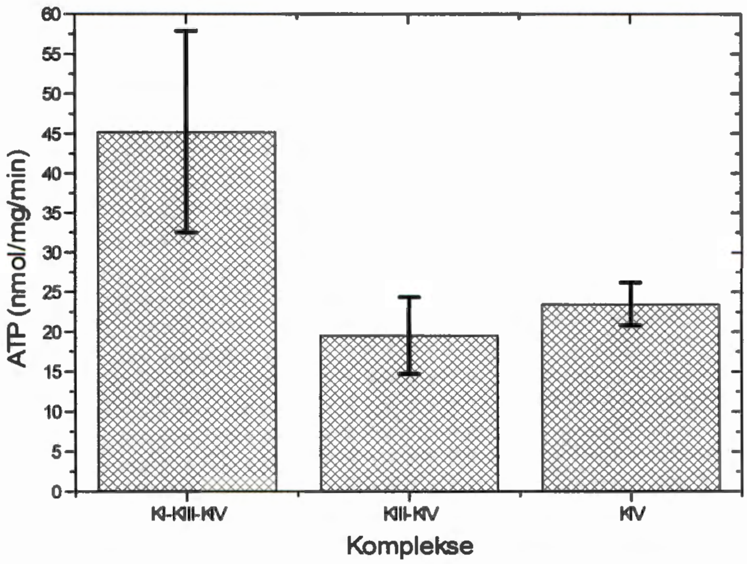


Figuur 4.11 ATP produksie deur die mitochondriale komplekse in die teenwoordigheid van kompleks spesifieke inhibeerders. Die resultate word uitgedruk as 'n gemiddeld ± S.A. (n = 3)

Die metode waarvolgens ATP produksie in die teenwoordigheid van komplekspesifieke inhibeerders getoets is, is in Afdeling 3.4.8 gegee. In Figuur 4.11 kan gesien word dat wanneer geen substrate teenwoordig is nie, daar byna geen ATP deur die komplekse geproduseer word nie. In die teenwoordigheid van die optimum substraatkonsentrasies is vanaf al die komplekse ongeveer 100 nmol ATP per mg sellulêre proteïen per minuut geproduseer. Rotenoon het die ATP produksie vanaf kompleks I met 90 % verminder. Antimisien het die ATP produksie vanaf kompleks III met gliserol-3-fosfaat as substraat

met 89 % verminder terwyl die azied die ATP produksie vanaf kompleks IV met askorbiensuur en TMPD as substraat met 87 % verminder het (Figuur 4.11). Uit die resultate van Figuur 4.11 kan daar afgelei word dat dit wel mitochondriale oksidatiewe fosforilasie is wat verantwoordelik is vir ATP produksie deur die verskillende komplekse.

4.2.8 OPTIMALISERING VAN DIE *IN SITU* KWANTIFISERING VAN MITOCHONDRIALE RESPIRASIE IN FIBROBLASTE



Figuur 4.12 Normaalwaardes vir ATP-produksie soos bepaal in Fibroblaste (N=3)

Gebaseer op die ooreenkomste tussen die geoptimaliseerde kondisies vir *in situ* mitochondriale respirasie in N-2α neuroblastomaselle en die wat gepubliseer is vir fibroblaste, is die metode wat in Afdeling 3.4.9 beskryf en gestandaardiseer is vir N-2α neuroblastomaselle is gevolglik toegepas op fibroblaste. Die normaalwaardes wat vir fibroblaste bepaal is word in Figuur 4.12 gegee. Dit wil voorkom of mitochondriale respirasie laer is in fibroblaste (Figuur 4.12) as in N-2α neuroblastomaselle (Figuur 4.11).

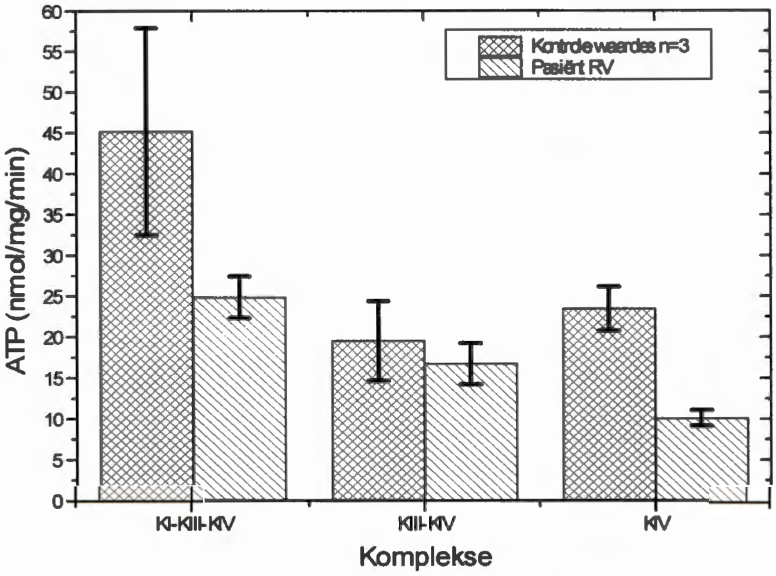
N-2α neuroblastomaselle is kankeragtige selle en is bekend om baie vinnig *in situ* te vermeerder. Fibroblaste, aan die anderkant, is weer bekend daarvoor om stadig *in situ* te vermeerder (Galjaard, 1986). Die waargenome verskille in terme van mitochondriale respirasie tussen die twee seltipes (Figuur 4.11 – neuroblastomaselle en Figuur 4.12 – fibroblaste) kan moontlik verklaar hoekom die seltipes verskillende *in situ* groei tempo's het.

4.3 *IN SITU* MITOCHONDRIALE RESPIRASIE ANALISES.

Fibroblastselle van babas RV en CT (Sien Afdeling 3.6 vir kliniese beelde) is op die standaard metode opgekweek (Afdeling 3.4) en die *in situ* mitochondriale respirasie toets (Afdeling 3.4.9) is op die selkulture uitgevoer. Die resultate van die eksperiment word in die Figuur 4.13 en Figuur 4.14 gegee.

In Figuur 4.13 word die resultate van baba RV gegee. Die respirasiewaardes word in die grafiek vergelyk met kontrolewaardes. Die eerste twee stawe in Figuur 4.13 dui die hoeveelheid ATP wat geproduseer is deur die ATP produksie vanaf kompleks I. Die hoeveelheid ATP deur die selle van baba RV geproduseer is, was 24.9 nmol ATP per mg fibroblast selle per minuut (± 2.58), terwyl kontrole selle 45.2 nmol ATP/mg/min (± 12.7) lewer. Die selle van baba RV het dus 45% minder ATP deur kompleks I geproduseer as kontroleselle. Die derde en vierde staaf verteenwoordig die hoeveelheid ATP wat geproduseer is vanaf kompleks III. Hier is die waarde van baba RV 16.75 (± 2.52) nmol ATP/mg/min, terwyl die kontrolewaardes 19.55 (± 4.85) nmol ATP/mg/min is. Alhoewel nie statisties beduidend, het die selle van baba RV 14 % minder ATP as die kontroleselle geproduseer vanaf kompleks III. Die laaste twee stawe verteenwoordig die hoeveelheid ATP geproduseer vanaf kompleks IV alleen. Die selle van baba RV het 'n waarde van 10.41 (± 0.97) nmol ATP/mg/min gelewer terwyl die kontrole selle 'n waarde van 23.48 (± 2.7) nmol ATP/mg/min gelewer het. Die selle van baba RV lewer dus 56% minder ATP vanaf kompleks IV as die kontroleselle. Al die waardes van baba RV is heelwat laer as die

van die kontrole persone, behalwe die waardes van die respirasie deur kompleks III. Hierdie resultate dui sterk op 'n defek van kompleks IV terwyl defekte in komplekse I en III (Afdeling 3.3.2) nie buite rekening gelaat kan word nie.



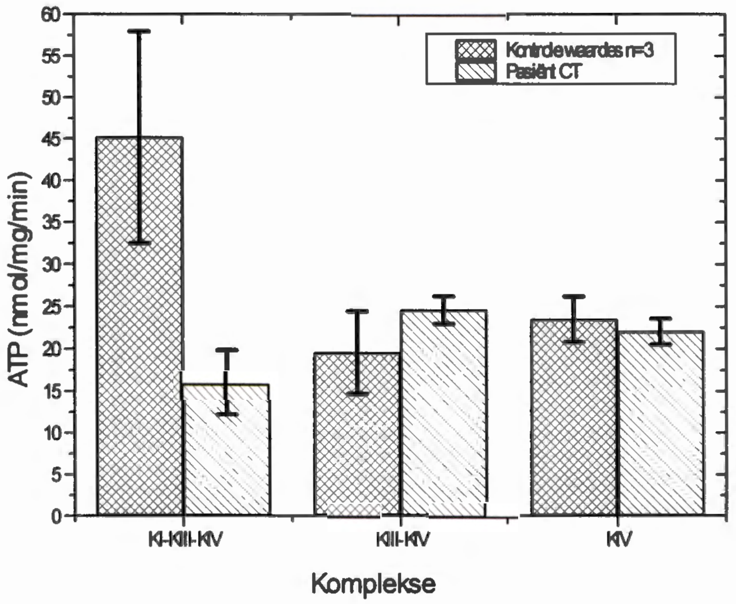
Figuur 4.13 *In situ* Mitochondriale respirasie analise: Baba RV.

Die respirasiewaardes van baba RV word in die grafiek vergelyk met die waardes wat van kontrole persone verkry is.

In Figuur 4.14 word die resultate van baba CT gegee. Die respirasiewaardes word in die grafiek vergelyk met die van kontrolewaardes en die eerste twee stawe dui die hoeveelheid ATP wat deur kompleks I geproduseer is. Die hoeveelheid ATP deur baba CT se selle geproduseer is 16.0 (± 3.83)nmol ATP per mg fibroblast selle per minuut, terwyl kontrole selle 45.2 (± 12.7) nmol ATP/mg/min lewer. Die selle van baba CT lewer hier 65% minder ATP vanaf kompleks I geproduseer as die kontroleselle.

Die derde en vierde staaf toon die hoeveelheid ATP deur kompleks III geproduseer. Hier is die waarde van baba CT 24.57 (± 1.64) nmol ATP/mg/min, terwyl die kontrolewaardes 19.55 (± 4.85) nmol ATP/mg/min is. Die laaste twee stawe toon die hoeveelheid ATP wat deur kompleks IV geproduseer is. Die selle van baba CT het 'n waarde van 22.03 (± 1.55) nmol ATP/mg/min gelewer (kontrole waarde 23.48 ± 2.7 nmol ATP/mg/min). Die

waardes van ATP produksie deur kompleks III en kompleks IV verskil nie statisties van die kontrolewaardes nie en blyk normaal te wees.



Figuur 4.14 *In situ* Mitochondriale respirasie analise: Baba CT

Die respirasiewaardes van baba RV word in die grafiek vergelyk met die waardes wat van kontrole persone verkry is.

In Figuur 4.14 kan daar duidelik gesien word dat die respirasie tempo van kompleks I heelwat laer is as die van die normaalwaardes. Die respirasie tempo van kompleks III en kompleks IV val in die normaalgrense terwyl die tempo van kompleks III respirasie selfs hoër as die normaalwaardes is, maar nog steeds in die normaalgrense val. Uit die resultate kan gesien word dat al die respirasie analises waar kompleks I by betrokke is laer waardes gelewer het. Die res van die analises van baba CT het almal in die normaalgrense van die kontrolewaardes geval. Dit is daarom onwaarskynlik dat die komplekse defektief is. Uit die resultate blyk dit dat baba CT 'n kompleks I defek besit.

4.4 *IN VITRO* MITOCHONDRIALE RESPIRASIE ANALISES

Om te bepaal of die defek van Baba RV wel moontlik by kompleks IV voorkom, is van die mitochondriale komplekse uit die fibroblaste van die pasiënt geïsoleer (Afdeling 3.7) en die aktiwiteite van die komplekse is afsonderlik bepaal (Afdeling 3.8). Sitraatsintase (EC 4.1.3.7) is deurgaans as matriks merkerensiem gebruik. Die reduksie van DTNB word gemeet. Die reduksie van DTNB is gekoppel aan die reduksie van koënsiem A deur die sitraatsintase reaksie. Die reaksie vind dus onafhanklik van die elektrontransportketting plaas. KIV/CS is die verhouding van die kompleks IV aktiwiteit ten opsigte van die sitraatsintase (CS) aktiwiteit. KII-KIII/CS verteenwoordig die gekoppelde aktiwitiet van kompleks II en kompleks III ten opsigte van die sitraatsintase aktiwiteit. Die resultate word in tabel 4.1 saamgevat.

Tabel 4.1 ***In vitro*** **Kwantifisering van Mitochondriale-Komplekse**

Kompleks/Sitraatsintetase	Normaal waardes (n=3)	Pasiënt RV (n = 3)
KIV/CS	1.61 – 3.65	1.2 ± 0.3
KII-KIII/CS	1.10 – 1.56	0.99 ± 0.34

In Tabel 4.1 kan gesien word dat die pasiënt RV se KIV/CS-verhouding laer as die normaalwaardes is. Die resultaat dui moontlik op 'n kompleks IV defek. KII-KIII/CS-aktiwiteit van die pasiënt RV stem ooreen met die normaalwaardes.

Resultate met betrekking tot kompleks I is nie verkry nie en daar kan nie 'n verdere bespreking ten opsigte van baba CT gemaak word nie.

4.5 SAMEVATTING

In hierdie hoofstuk is die resultate wat tydens die standaardisering, uitvoering en toepassing van die metode vir die *in situ* kwantifisering van ATP verkry is, beskryf. In hoofstuk 5 word 'n kritiese bespreking van die resultate gedoen.

HOOFSTUK 5

Bespreking

5.1 INLEIDING

Vanuit die literatuuroorsig in Hoofstuk 2 is daar aangetoon dat defekte van die mitochondriale respiratorieseketting verantwoordelik is vir baie kliniese simptome wat onder kinders waargeneem word (Sengers *et al.* 1984; Shoffner & Wallace, 1995; Munnich *et al.* 1996). Daar is ook aangetoon dat dit nie maklik is om dié defekte te diagnoseer nie aangesien die komplekse van die elektrontransportketting deur beide kern sowel as mitochondriale DNA gekodeer word (Scholte *et al.* 1987; Zheng *et al.* 1990). Die kliniese simptome wat die pasiënte toon verskil geweldig van mekaar en daar kan nie spesifieke defekte aan spesifieke kliniese beelde gekoppel word nie (Munnich *et al.* 1996).

Vir die lokalisering van mitochondriale respiratoriesekettingdefekte is dit nodig om onder andere die hoeveelheid ATP wat deur die respiratorieseketting geproduseer word, te kwantifiseer. Vir die studie is daar besluit om mitochondriale respirasie *in situ* te ondersoek deur middel van ATP kwantifisering. Die metode wat tydens die studie gestandaardiseer is, word vervolgens krities bespreek. Daar word ook krities gekyk na die resultate wat verkry is vanaf pasiënte wat moontlik 'n mitochondriale respirasiekettingdefek het en met behulp van die gestandaardiseerde metode ondersoek is.

5.2 KWANTIFISERING VAN MITOCHONDRIALE RESPIRASIE

Soos genoem in Afdeling 3.2 word die kwantifisering van mitochondriale respirasie gewoonlik benodig vir pediatriese pasiënte. *In situ* kwantifisering van mitochondriale respirasie bied 'n verskeidenheid voordele bo ander bestaande metodes. In die eerste plek word baie min biologiese materiaal van die pasiënt vereis. Waar ander metodes hoofsaaklik spierweefsel benodig (Afdeling 3.2.1) (Scholte *et al.* 1987; Bakker *et al.* 1994;

Rustin *et al.* 1994; Trounce *et al.* 1996), kan van die pasiënt se fibroblaste gebruik word vir *in situ* mitochondriale respirasie kwantifisering. Waar ander metodes gewoonlik 300 mg spierweefsel (onder verdowing met behulp van chirurgie verwyder) benodig vir die bestudering van mitochondriale respirasie defekte (Afdeling 3.2.1), word slegs 'n velbiopsie van die pasiënt benodig (Afdeling 3.2.2) vir die uitvoering van *in situ* mitochondriale respirasie toetse. Aangesien die analises *in situ* uitgevoer word, is geen ingewikkelde mitochondriale isoleringstappe nodig nie. Die weefsel hoef ook nie in gespesialiseerde vertrekke bewerk te word nie (Afdeling 3.2.3). Die kwantifisering van ATP deur middel van lusiferase (Afdeling 3.2.3) dra ook by tot die voordele van die gestandaardiseerde metode deurdat die metode baie sensitief is ten opsigte van ATP kwantifisering maar ook relatief eenvoudig is om uit te voer. Maar, die tegniek het ook nadele. Siende dat ATP gekwantifiseer word, word veronderstel dat kompleks V wel normaal funksioneer. Voorts beteken dit ook dat die betrokkenheid van kompleks V in die lewering van die betrokke kliniese beeld nie met hierdie tegniek ondersoek kan word nie. Verder, indien kompleks IV defektief is, kan daar nie bepaal word of kompleks I of kompleks III ook defektief is nie. Die tegniek, soos op die oomblik gestandaardiseer, neem nie die weefselspesifieke uitdrukking van 'n bepaalde mitochondriale defek in ag nie.

Die gebruik van digitonien om toegang tot die mitochondria *in situ* te verkry hou ook 'n aantal voordele in. Een van die belangrikste voordele is dat die mitochondria intakt bly en dus in sy natuurlike omgewing kan funksioneer (Afdeling 3.3.1) (Colbeau *et al.* 1971; Fiskum *et al.* 1980; Mooney, 1988; Wolvetang *et al.* 1990). Slegs die sitosoliese kompartement van die sel word beskikbaar gestel vir manupilasie (Afdeling 3.3.1) (Mooney, 1988). Die deurlaatbaargemaakte selle kan nou van substrate en inhibeerders voorsien word en sodoende kan *in situ* mitochondriale respirasie gekwantifiseer word (Afdeling 3.3.2).

Die lineêre gebied vir ATP kwantifisering is bepaal soos beskryf in Afdeling 3.4.2. In Afdeling 4.2.1 is gesien dat die lineêre ATP deteksiegebied van die lusiferase-lusiferien

ensiemtoets strek vanaf 15 pmol ATP tot 1 nmol ATP (Figuur 4.1). Die deteksie van ATP is lineêr (r = 999) en die hoeveelheid ATP wat gekwantifiseer is deur die metode stem goed ooreen met die hoeveelheid ATP wat tot die sisteem toegevoeg is (Afdeling 4.2.1, Figuur 4.1). Die luminometriese metode vir ATP kwantifisering is dus baie akkuraat en is ook sensitief. Die metode voldoen dus aan die eerste vereiste (Afdeling 3.2.1) wat daar gestel is ten opsigte van sensitiwiteit, akkuraatheid en eenvoud.
Die hoeveelheid TCA wat benodig word om ATP effektief uit die selle te ekstraheer, is in Afdeling 3.4.3.1 (Figuur 4.2) beskryf. In Figuur 4.2 kan gesien word dat die hoeveelheid ATP geëkstraheer (nmol/mg) styg vanaf 0 tot en met 2 % (w/v) TCA/2 mM EDTA. Alhoewel dit blyk dat 2 % (w/v) TCA/2 mM EDTA die optimum konsentrasies is vir die ekstraksie van ATP, is daar besluit om eerder 4 % (w/v) TCA/2 mM EDTA te gebruik vir die ekstraksie van ATP. Die hoeveelheid ATP geëkstraheer met 5 % TCA/2 mM EDTA verskil nie veel van die konsentrasie ATP geëkstraheer deur 2 % (w/v) TCA/2 mM EDTA nie en moontlik kan 4% (w/v) TCA/2 mM EDTA onder alle omstandighede verseker dat ATP maksimaal vanuit eukariotiese selle geëkstraheer word. Die konsentrasie TCA behoort nie 'n effek op die meting van die hoeveelheid ATP te hê nie, aangesien die TCA konsentrasie verdun is tot minder as 0.1 % met Volledige buffer (Afdeling 3.4.3.1).

Die optimum digitonienkonsentrasie wat benodig word om die selle selektief deurlaatbaar te maak, is in Afdelings 3.4.4 en 4.2.3 bepaal. Die maksimum hoeveelheid ATP is geproduseer met die gebruik van 20 tot 40 µg/ml digitonien om die selle deurlaatbaar te maak vir die deurbeweging van komplekspesifieke substrate (Figuur 4.3). Daar is besluit om 'n finale digitonienkonsentrasie van 40 µg/ml te gebruik om die selle selektief deurlaatbaar te maak. 40 µg/ml Digitonien sal heel waarskynlik onder alle omstandighede selektiewe deurlaatbaarmaking van die selmembraan verseker. By 40 µg/ml wil dit ook voorkom of die mitochondria nog intakt is aangesien daar geen afname in ATP produksie plaasvind nie. Hierdie konsentrasie (40 µg/ml digitonien) stem ook ooreen met die hoeveelheid digitonien wat Wanders *et al.* (1993) as die optimum hoeveelheid digitonien bevind het om fibroblaste selektief deurlaatbaar te maak.

Die optimum kompleks I substraatkonsentrasie is in Afdelings 3.4.5.1 en 4.2.4.1 bepaal. In Figuur 4.4 kan gesien word dat die ATP produksie styg vanaf 0 tot en met 5 mM glutamaat en malaat as substraat. Vanaf 5 tot en met 10 mM glutamaat en malaat bly die hoeveelheid ATP (nmol/mg/min) geproduseer ongeveer dieselfde, maar vanaf 10 tot en met 50 mM glutamaat en malaat neem die hoeveelheid ATP wat geproduseer is, af. By hierdie konsentrasie glutamaat en malaat kan die afname in ATP produksie toegeskryf word daaraan dat sommige nie-spesifieke sellulêre sisteme heeltemal oorlaai is deur die genoemde substrate en dat effektiewe ATP produksie nie moontlik is nie. Uit die resultate wil dit dus blyk dat 'n substraatkonsentrasie van 10 mM glutamaat en malaat die optimum kondisies is vir ATP produksie deur kompleks I. Die konsentrasies glutamaat en malaat stem ook ooreen met die konsentrasies wat Wanders *et al.* (1993) as die optimum konsentrasies beskryf het om ATP vanaf kompleks I in digitonien behandelde fibroblastselle te produseer. Die reaksie verloop ook lineêr vir die eerste 20 minute (Afdeling 4.2.4.2, Figuur 4.5).

Die optimum kompleks III substraatkonsentrasie is in Afdelings 3.4.6.1 en 4.2.5.1 bepaal. In Figuur 4.6 kan gesien word dat die hoeveelheid ATP (nmol/mg/min) styg vanaf 0 tot en met 6 mM gliserol-3-fosfaat as substraat. Vanaf 6 tot en met 10 mM gliserol-3-fosfaat bly die hoeveelheid ATP (nmol/mg/min) geproduseer, konstant. Vanaf 10 mM tot en met 50 mM gliserol-3-fosfaat neem die ATP produksie af. Daar is besluit om 10 mM gliserol-3-fosfaat as substraat te gebruik vir optimum ATP produksie vanaf kompleks III aangesien dit die konsentrasie is waarby die maksimum hoeveelheid ATP geproduseer word. Die reaksie is lineêr vir die eerste 30 minute (Afdeling 4.2.5.2 Figuur 4.7).

Die optimum kompleks IV substraatkonsentrasie is in Afdeling 3.4.7.1 en 4.2.6.1 bepaal. In die teenwoordigheid van 10 mM askorbiensuur, verhoog die ATP produksie deur kompleks IV lineêr vanaf 0 tot en met 200 μM TMPD as substraat, waarna daar 'n effense afname in die helling voorkom (Figuur 4.8). Volgens die literatuur het Hofhaus *et al.* (1996) ook van

200 μM TMPD gebruik gemaak vir ATP produksie deur kompleks IV in die teenwoordigheid van askorbiensuur. Op grond van die literatuur en die resultate van Figuur 4.8, is daar besluit om 200 μM TMPD saam met askorbiensuur te gebruik vir ATP produksie deur kompleks IV.

Die optimum askorbiensuurkonsentrasie is vervolgens bepaal (Afdeling 3.4.8.1 en Afdeling 4.2.6.1). Vanaf 0 tot en met 2 mM askorbiensuur/200 μM TMPD, styg die hoeveelheid ATP geproduseer (nmol/mg/min) skerp (Figuur 4.9). Tussen 2 en 10 mM askorbiensuur/ 200 μM TMPD bly die hoeveelheid ATP geproduseer min of meer dieselfde, maar vanaf 10 mM askorbiensuur/200 μM TMPD neem die ATP produksie weer af. Die afname kan wees as gevolg van die nie-spesifieke reduserings eienskappe van askorbiensuur wat moontlik die normale werking van sommige sellulêre sisteme belemmer. Op grond van die resultate in Figuur 4.9 en die hoeveelheid askorbiensuur wat in die literatuur (Hofhaus *et al.* 1996) aangedui word, is daar besluit om 10 mM askorbiensuur saam met 200 μM TMPD as optimum substraatkonsentrasies vir ATP produksie deur kompleks IV in N-2α neuroblastomaselle te gebruik. Die reaksie verloop lineêr vir 20 minute (Figuur 4.10, Afdeling 4.2.6.2).

Die metode waarvolgens ATP produksie in die teenwoordigheid van kompleksspesifieke inhibeerders getoets is, is in Afdeling 3.4.8 gegee. Alhoewel in Afdeling 3.4.1 weergegee word dat die N-2α neuroblastomaselle na isolering vir 15 minute by 37 °C geïnkubeer was om te verseker dat sellulêre ATP uitgeput word, was hierdie benadering vir die eerste keer toegepas tydens die kwantifisering van ATP produksie in die teenwoordigheid van kompleksspesifieke inhibeerders (Figuur 4.1). In Figuur 4.11 kan gesien word dat wanneer geen substrate teenwoordig is nie, daar byna geen ATP geproduseer word nie. Tydens die standaardiseringsreaksies was die sellulêre ATP nie uitgeput nie. Dit kan die relatief hoë ATP konsentrasies verklaar in die afwesigheid van substraat of by tyd nul (Figure 4.2 tot 4.10). In die teenwoordigheid van die optimum substraatkonsentrasies (Figuur 4.11) is

vanaf al die komplekse ongeveer 100 nmol ATP per mg sellulêre proteïen per minuut geproduseer. Rotenoon het die ATP produksie vanaf kompleks I met 90 % verminder. Antimisien het die ATP produksie vanaf kompleks III met gliserol-3-fosfaat as substraat met 89 % verminder terwyl azied die ATP produksie vanaf kompleks IV met askorbiensuur en TMPD as substrate met 87 % verminder het (Figuur 4.11). Uit die resultate van Figuur 4.11 kan daar afgelei word dat dit wel mitochondriale oksidatiewe fosforilasie is wat verantwoordelik is vir ATP produksie deur die verskillende komplekse, want wanneer daar 'n kompleksspesifieke inhibeerder teenwoordig is in die reaksiemengsel, is die betrokke kompleksgedrewe ATP produksie amper totaal geïnhibeer. Daar is ook gesien (Figuur 4.11) dat wanneer daar nie substraat teenwoordig is in die reaksiemengsel nie, daar weglaatbaar min ATP geproduseer word. Indien die ATP wat gemeet is van 'n ander bron as mitochondriale oksidatiewe fosforilasie afkomstig was, sou die hoeveelheid ATP gemeet sonder dat daar substraat teenwoordig is, ongeveer dieselfde gewees het as wanneer daar substrate teenwoordig is. Die hoeveelheid ATP gemeet sou ook nie minder gewees het in die teenwoordigheid van inhibeerders nie.

Om praktiese redes is besluit om al die kompleksgedrewe ATP reaksies vir slegs 15 minute te inkubeer. Die produksie van ATP deur al die komplekse verloop vir ten minste 20 minute lineêr (Afdeling 4.2.4.2 Figuur 4.5; Afdeling 4.2.5.2 Figuur 4.7; Afdeling 4.2.6.2 Figuur 4.10).

5.3 *IN SITU* EN *IN VITRO* MITOCHONDRIALE RESPIRASIE ANALISES

5.3.1 BABA RV

In Afdeling 4.3 is die *in situ* mitochondriale respirasie resultate van baba RV en baba CT gegee, soos wat dit verkry is vanaf die *in situ* mitochondriale respirasie analise (Afdeling 3.4.9).

In Figuur 4.13 is gesien dat kompleks I en kompleks IV van baba RV se ATP-produserende aktiwiteit aansienlik laer is as die van die kontrolewaardes. Kompleks I gedrewe ATP produksie is net 55% aktief, terwyl kompleks IV gedrewe ATP produksie net 44% aktief is. Dit kan dus beteken dat die pasiënt moontlik 'n kompleks IV defek besit alhoewel daar nie 'n uitspraak gelewer kan word oor die betrokkenheid van die res van die komplekse nie soos ook byvoorbeeld kompleks V. In Afdeling 3.3.2 is beskryf hoe NADH aan die matriks verskaf word deur glutamaat en malaat (kompleks I substrate). Die elektrone, wat verkry word vanaf NADH, vloei deur die elektrontransportketting en gevolglik word ATP geproduseer. In die geval van baba RV vind ATP produksie vanaf kompleks I en IV nie normaal plaas nie. ATP produksie word dus belemmer ongeag van waar die elektrone die elektrontransportketting binnedring. Die blok kan dus moontlik by kompleks IV voorkom, maar geen uitspraak kan gemaak word oor die betrokkenheid van die ander komplekse nie. Die posisie van die moontlike mitochondriale defek is beter toegelig deur die *in vitro* mitochondriale respirasie analises (Afdeling 3.8 en Afdeling 4.4) Die aktiwiteite van die geïsoleerde mitochondriale komplekse is bepaal en kompleks IV het net 45% aktiwiteit getoon ten opsigte van kontrole waardes (Tabel 4.1). Die gekombineerde aktiwiteit van kompleks II en kompleks III het in die normaalgrense van die kontrolewaardes geval. Uit beide die resultate kan daar gesien word dat die aktiwiteit van kompleks IV heelwat laer is as die van die kontrolewaardes en daar kan met redelike sekerheid aangeneem word dat baba RV 'n milde kompleks IV defek besit. Die defek word as 'n milde kompleks IV defek beskou aangesien die ATP produserende aktiwiteit van kompleks IV nog 45 % aktief was (Lowerson *et al.* 1992). Die betrokkenheid van 'n milde kompleks V defek in die lewering van die resultaat kan die uitgesluit word nie. Alhoewel die aktiwiteit van kompleks III as normaal beskou kan word (gebaseer op die *in vitro* gekombineerde kompleks II en III aktiwiteit), kan die betrokkenheid van 'n defektiewe kompleks I by die pasiënt nie

uitgesluit word nie. Dit was egter nie moontlik om kompleks I van die pasiënt *in vitro* te ondersoek nie. Soos genoem in Afdeling 3.7, word ses 75 cm^2 flesse fibroblastselle per pasiënt benodig om genoeg materiaal te verkry vir die isolering van mitochondriale komplekse. Die weefselkulture van die pasiënte het egter baie stadig gegroei in vergelyking met kontrole fibroblastkulture (Galjaard, 1986). Na 8 weke van kweek het die pasiënt se selle feitlik nie meer *in situ* vermeerder nie. Gevolglik is die hoeveelheid weefselkultuurmateriaal beskikbaar benut vir die isolering van mitochondriale komplekse. Genoeg materiaal was beskikbaar vir *in vitro* analises van kompleks IV en kompleks II – III. In teenstelling hiermee, is die een 75 cm^2 fles fibroblastselle per pasiënt wat benodig was vir die *in situ* mitochondriale respirasie analise, gemaklik verkry en 'n mitochondriale respirasie defek is aangetoon. Die effektiwiteit van die gestandaardiseerde *in situ* mitochondriale respirasie analise word hierdeur verder beklemtoon

5.3.2 BABA CT

In Figuur 4.14 (Afdeling 4.3) is gesien dat kompleks I gedrewe ATP produksie van baba CT aansienlik laer is as die van kontrolewaardes, terwyl die res van die komplekse normale ATP produksie geïnduseer het. Kompleks I lewer slegs 35% aktiwiteit ten opsigte van die kontrolewaardes. In Afdeling 3.3.2 is beskryf hoe NADH aan die matriks verskaf word deur glutamaat en malaat (kompleks I substrate). Die elektrone, wat verkry word vanaf NADH, vloei deur die elektrontransportketting en gevolglik word ATP geproduseer. In die geval van baba CT vind ATP produksie vanaf kompleks I nie normaal plaas nie. Wanneer gliserol-3-fosfaat aan die sisteem verskaf word, dring elektrone die sisteem binne by kompleks III en gevolglik word ATP geproduseer (Afdeling 3.3.2). In die geval van baba CT is die ATP-produksie vanaf kompleks III normaal. Die afleiding kan gemaak word dat baba CT 'n milde kompleks I defek het. Die defek word as 'n milde kompleks I defek beskou aangesien kompleks I nog steeds ATP produserende aktiwiteit toon. Die res van

die komplekse lewer normale ATP produksie ten opsigte van die kontrolewaardes en daar kan afgelei word dat die komplekse nie defekte bevat wat ATP produksie beïnvloed nie.

Soos verduidelik vir baba RV, is die opkweek van voldoende fibroblastmateriaal vir die isolering van mitochondriale komplekse baie moeilik. In die geval van baba CT kon daar nie daarin geslaag word om meer as een 75 cm^2 fles fibroblastselle *in situ* te kweek nie. Die fles selle was aangewend vir die *in situ* mitochondriale respirasie analise. Die resultaat verkry stem ooreen met 'n *in situ* kompleks I defek soos gepubliseer deur Robinson, (1996). Alhoewel dit nie *in vitro* bevestig kon word nie, wil dit blyk of baba CT moontlik 'n kompleks I defek het.

Die verhoogde laktaat en piruvaatvlakke wat by die twee pasiënte waargeneem is, is ook waargeneem by die meeste pasiënte met mitochondriale respirasie defekte (Afdeling 2.3). Die voedsel wat ingeneem word, word afgebreek en onder andere word piruvaat gevorm (Afdeling 2.1, Figuur 2.1). Die piruvaat vorm asetiel koA wat in die sitroensuursiklus inbeweeg. Die sitroensuursiklus vorm onder andere NADH en $FADH_2$ wat weer verantwoordelik is vir die verskaffing van elektrone aan die elektrontransportketting (Murray *et al.* 1996). Wanneer daar dus nou 'n defek in die elektrontransportketting voorkom by kompleks I, kan die NADH nie die elektrone aan die elektrontransportketting oordra nie. Die NADH word gevolglik nie gebruik nie en die sitroensuursiklus vind ook stadiger plaas omdat NADH sitraat dehidrogenase inhibeer (Mathews & Van Holde, 1990; Voet & Voet, 1995). α Ketogluteraat-dehidrogenase word ook deur NADH geïnhibeer inhibeer (Mathews & Van Holde, 1990; Voet & Voet, 1995). Aangesien die sitroensuursiklus nou nie meer optimaal plaasvind nie, styg die piruvaatvlakke in die liggaam ook aangesien asetiel koA nie meer in die sitroensuursiklus inbeweeg nie. As gevolg van die verhoogde vlakke van pirovaat en NADH vorm laktaatdehidrogenase meer laktaat. Piruvaat + NADH + H^+ $\rightleftharpoons$ L-laktaat + NAD^+ inhibeer (Mathews & Van Holde, 1990). Sodoende neem die laktaatvlakke in die pasiënte ook toe. Aangesien die sitroensuursiklus nie korrek funksioneer nie, neem die asetiel koA vlakke ook toe.

Wanneer asetiel koA in so 'n mate toeneem dat dit nie vir vetsuursintese gebruik word nie, word ketoonliggame gevorm deur ketogenese inhibeer (Mathews & Van Holde, 1990; Voet & Voet, 1995). Asetiel koA word deur 'n reeks reaksies omgeskakel in β-hidroksie-β-metielglutariel-koA (HMG-koA). In die mitochondria word HMG-koA deur HMG-koA liase omgeskakel in asetoasetaat inhibeer (Mathews & Van Holde, 1990). Asetoasetaat vorm op sy beurt weer β-hidroksiebuteraat en in 'n mindere mate asetoon. Asetoasetaat, asetoon en β hidroksiebuteraat staan as ketoonliggame bekend (Mathews & Van Holde, 1990; Voet & Voet, 1995). Dit verklaar dan ook die voorkoms van 3-OH Bottersuur en asetoasetaat wat voorkom by baba CT.

5.4 WEEFSELSPESIFIEKE UITDRUKKING VAN MITOCHONDRIALE DEFEKTE

Die proses van oksidatiewe fosforilasie is nie beperk tot een spesifieke weefseltipe nie. Defekte van die mitochondriale respiratorieseketting kan dus enige orgaan of weefsel aantas (Rustin *et al.* 1994). In die artikel van Munnich *et al.* (1996) word daar duidelik aangetoon dat 'n wye verskeidenheid van organe en weefsel deur mitochondrialerespirasiedefekte geraak word. Wanneer die defek in een spesifieke orgaan voorkom kan dit wees dat die pasiënt 'n weefselspesifieke isoform van die defek besit (Rustin *et al.* 1994). Die uitdrukking van die defek in 'n spesifieke weefsel kan ook die gevolg wees van 'n potensiële mitochondriale DNA heteroplasmie waar beide normale en gemuteerde DNA in die selle voorkom. As gevolg van die weefselspesifieke uitdrukking kan daar dus probleme ontstaan met die diagnose van 'n mitochondriaal geassosieerde defek. Die ideaal is dus om vir die defek te toets in die weefsel waarin die defek voorkom.

Wanneer die weefsel egter moeilik verkrygbaar is, is dit goed om van fibroblaste gebruik te maak aangesien die defekte gewoonlik ook in fibroblaste uitgedruk word (Munnich *et al.* 1996). Die gebruik van fibroblaste verleen dus aan die metode 'n redelike kans om moontlike defekte uit te wys.

5.5 SAMEVATTING

Uit die voorafgaande kan die afleiding gemaak word dat die breë doelstelling wat aan die begin van die studie gestel is ten opsigte van die "**Kwantifisering van Mitochondriale Respirasie om Aangebore Mitochondriale Defekte te Ondersoek**" (Afdeling 2.4), bereik is. Verskeie metodes vir die kwantifisering van mitochondriale respirasie is teoreties ondersoek en daar is besluit om van die *in situ* mitochondriale respirasie analise vir ATP kwantifisering gebruik te maak. Die metode is suksesvol gestandaardiseer soos beskryf in Hoofstuk 3 (Afdeling 3.4). Normaalwaardes is bepaal in fibroblaste (Afdeling 4.2.8) en twee pasiënte met aangebore mitochondriale defekte is getoets met die *in situ* mitochondriale metode vir ATP kwantifisering (Afdeling 4.3) en sommige van die resultate is geverifieer deur *in vitro* toetse (Afdeling 4.4).

Daar is grootliks aan al die doelwitte wat vir hierdie studie gestel is, voldoen. Dit is baie duidelik dat die metode nog baie potensiaal het vir uitbreiding. In die eerste plek kan die ATP produserende aktiwiteit van kompleks II en piruvaatdehidrogenase ook op dieselfde manier, soos beskryf in Afdeling 3.4, gestandaardiseer word. Die metode kan ook oorgedra word na leukosiete aangesien dit baie eenvoudig is om van die pasiënt te verkry. Leukosiete se voorbereiding is ook baie eenvoudiger en die analise kan dus baie vinniger na die verkryging van die materiaal uitgevoer word. Daarna kan ander weefsel soos spiere ook betrek word. Soos gesê in Afdeling 2.3 en Afdeling 5.4 kom weefselspesifieke isovorme van die defekte voor. Dit sal dus nuttig wees indien die analise ook in spiere uitgevoer kan word indien die analise op leukosiete en fibroblaste nie voldoende uitsluitsel

voldoende uitsluitsel lewer oor die voorkoms van 'n defek nie. Die verkryging van spierweefsel bly moeilik en sal verkieslik as laaste opsie oorweeg word. Saponien word algemeen gebruik vir die karakterisering van mitochondriale oksidatiewe fosforilasie in menslike spierweefsel (Kunz *et al.* 1993: Kunz *et al.* 1994). Saponien word gebruik om die sarkolemma deurlaatbaar te maak. Die plasmamembraan van die weefsel word ook deurlaatbaar gemaak, maar die intaktheid van die mitochondria word nie beïnvloed nie (Kunz *et al.* 1993: Kunz *et al.* 1994) net soos in die geval met digitonien.

Bylaag 1

B.1.1 STERIELE 10 X PBS-OPLOSSING.

NaCl	(Mw = 58.44)	Merck	80 g
KCl	(Mw = 74.56)	Saarchem-Holpro Analytic (Pty) Ltd	2 g
Na_2HPO_4	(Mw = 177.99)	Merck	9.2 g
KH_2PO_4	(Mw = 136.09)	BDH Chemicals Ltd.	2 g
$MgCl_2$	(Mw = 203.30)	Saarchem-Holpro Analytic (Pty) Ltd	1 g

Los die reagense op in dubbel gedistilleerde water (H_2O dd) en vul aan tot 1 *l* met H_2O dd. Moenie die 10 x PBS-oplossing outoklaveer nie. Stoor by 4 °C. Neem 20 ml van die 10 x PBS-oplossing en verdun tot 200 ml met H_2O dd vir 'n 1 x PBS-oplossing. Outoklaveer die 1 x PBS-oplossing en toets vir steriliteit. Stoor by 4 °C.

B.1.2 STERIELE MEDIUM

Vir 80 ml medium met antibiotika:

Ham se F10 Voedingsmedium met 15 mM HEPES	Gibco	70.4 ml
(Ham se F12 Voedingsmedium vir N-2α neuroblastomaselle)		
Fetale kalfserum	Sterilab	8.0 ml
Pen-Strep (antibiotika)	Gibco	0.8 ml
Anti-PPLO	Gibco	0.8 ml

Die medium bevat 10% serum. Indien dit nie nodig is dat die selle vinnig groei nie of as flesse naby volgroei is, kan die hoeveelheid serum verminder word. Die medium is vir steriliteit getoets voordat dit by 4 °C in die donker gestoor is.

Vir medium sonder antibiotika is dieselfde metode gebruik. Die hoeveelheid Pen-Strep en Anti-PPLO word net deur Ham se F10/F12 voedingsmedium vervang

B.1.3 STERIELE 0.1% EDTA

EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)	0.1 g
SIGMA Kat. no E-5134 (MW = 372.2)	
H_2O dd	100 ml

Stel eers die pH van die oplossing in tot 8 deur gebruik te maak van 1 M NaOH. Die pH is ingestel om te verseker dat die EDTA oplos. Vul daarna die volume op tot 100 ml. Outoklaveer die oplossing en toets vir steriliteit. Stoor by 4 °C.

B.1.4 STERIELE TRIPSIEN / 0.1% EDTA- MENGSEL

Vir 'n 20 ml oplossing:

Tripsien (0.25 %) Highveld Biologicals	8 ml
0.1% EDTA- oplossing (B.1.3)	12 ml

Toets die oplossing se steriliteit. Stoor by 4 °C in die donker.

B.1.5 1.086 μg/ml PERCOLL

Vir 'n 50 ml mengsel:
30.6 ml (1.131 g/ml) Percoll SIGMA Kat. No. P-1644

Vul die mengsel op tot 50 ml met H_2O dd. Voeg 0.15 M NaCl by. Weeg 0.44 g NaCl af vir 'n 50 ml mengsel. Indien die mengsel geoutoklaveer moet word, moet die NaCl (aq) afsonderlik geoutoklaveer word en na die tyd by die Percoll verdunning gevoeg word.

B.1.6 LISERINGSMENGSEL

Vir 'n 1 liter mengsel:

NH_4Cl (Mw = 53.49) Merck	8.29 g
$NaHCO_3$ (Mw = 84.01) Merck	1 g
EDTA (Mw = 372.2) SIGMA Kat. No. E-5134	37.5 mg

Die reagense is in H_2O dd opgelos. Die mengsel se pH is tot 7.4 ingestel.

B.1.7 PROTEÏENBEPALINGSREAGENS

Bicinchoniniensuur (SIGMA, Kat. no. B-9643)
Koper (II) sulfaat (SIGMA, Kat. no. C-2284)

Meng die Bicinchoniniensuur oplossing en die koper (II) sulfaatoplossing in die verhouding van 50:1 volgens die vervaardiger se voorskrifte.

Vir 'n 2 ml oplossing:

Bicinchoniniensuur	1960 ml
Koper (II) sulfaat	40 ml

Meng die twee reagense goed. Die mengsel is liggroen van kleur. Maak elke dag vars aan.

B.1.8 SITOSOLMENGSEL

Gebaseer op artikel van Wanders *et. al.* (1993)

Die volgende reagense word benodig:

250 mM KCl (Mw = 74.56) Saarchem-Holpro Analytic (Pty.) Ltd.

3.33 mM EDTA (Mw = 372.2) SIGMA Kat. no. E-5134

125 mM Trisma Base (Mw = 121.1) SIGMA Kat. no. T-1503

16.67 mM KH_2PO_4 (Mw = 136.09) BDH Chemicals Ltd.

0.167% (w/v) BSA (Albumien Fraksie V; Vetsuurvry) Boehringer Mannheim Kat. no. 775827

66.67 µg/ml Digitonien (Mw = 1229.3) SIGMA Kat. no. D-1407

Vir 'n 40 ml oplossing:

0.746 g KCl

0.05 g EDTA

0.606 g Trisma base

0.091 g KH_2PO_4

Voeg bogenoemde reagense bymekaar en vul aan tot ± 30 ml met H_2O dd. Stel die pH in tot 7.4 met ±3.5 ml 1N HCl.

Voeg die volgende reagense by bogenoemde mengsel:

0.067 g BSA

2.667 mg Digitonien

Toets weer die pH van die oplossing. Vul die fles aan tot 'n finale volume van 40 ml met H_2O dd.

B.1.9 0.5 M GLUTAMAAT

Los 0.085 g Glutamaat (Mw = 169.1) (L-Glutamic Acid Monosodium Salt) SIGMA Kat. no. G-5889 op in 1 ml H_2O dd. Stoor by -20 °C.

B.1.10 0.5 M MALAAT

Los 0.089 g Malaat (Mw = 178.1) (L-Malic acid disodium salt) SIGMA Kat. no M-9138 op in 1 ml H_2O dd. Stoor by -20 °C.

B.1.11 0.5 M PIRUVAAT

Los 0.055 g Piruvaat (Mw = 110.0) (Pyruvic Acid Sodium Salt) SIGMA Kat. no. P-2256 op in 1 ml H_2O dd. Stoor by - 20 °C.

B.1.12 0.5 M SUKSIENSUUR

Los 0.675g Suksiensuur (Mw = 270.1) (Succinic Acid disodium salt Hexahydrate) SIGMA Kat. no. S-9637 op in 5 ml H_2O dd. Verdeel die hoeveelheid in 5 Eppendorfbuisies. Stoor by - 20 °C.

B.1.13 50 mM ADP

Los 0.011 g ADP (Mw = 427.2) (Adenosine 5`-Diphosphate) SIGMA Kat. no A-9665 op in 500 µl Mg^+ (aq) (B.1.27). Stoor by -20 °C.

B.1.14 0.5 M GLISEROL-3-FOSFAAT

Los 0.185 g Gliserol-3-fosfaat (Mw = 370.4) op in 1 ml H_2O dd. Verdeel die volume in 200 µl hoeveelhede en stoor by – 20 °C.

B.1.15 750 µM PALMITOÏELKARNITIEN

Los 3.3 x 10^{-4} g Palmitoïelkarnitien (Mw = 436.1) (Palmitoyl-DL-Carnitine Chloride) SIGMA Kat. no. P-4509 op in 1 ml 2% (w/v) Vetsuurvrye BSA oplossing (B.1.16).

B.1.16 2% (w/v) VETSUURVRYE BSA- OPLOSSING

Los 40 mg BSA (Albumin Fraction V, Vetsuurvry) Boehringer Mannheim Kat. no. 775827 op in 2 ml H_2O dd

B.1.17 0.5 M ASKORBIENSUUR (VITAMIEN C)

Los 0.495 g Vitamien C (Mw = 198.1) (L-Ascorbic acid sodium salt) SIGMA Kat. no. A-4034 op in 5 ml H_2O dd. Maak elke dag vars aan.

B.1.18 0.5 M SITOCHROOM C

Los 0.313 g Sitochroom c (Mw = 12 500) Boehringer Mannheim Kat. No. 103 861 op in 50 µl H_2O dd. Berei vars direk voor gebruik.

B.1.19 10 mM TMPD

Los 1mg TMPD (Mw = 237.2) (N,N,N',N'-Tetraethyl-ρ-Phenylenediamine, dihydrochloride) SIGMA Kat. no. T-3134 op in 422 µl H_2O dd. Berei elke dag vars voor gebruik. Bedek die Eppendorfbuis met tinfoelie.

B.1.20 1 mg/ml ROTENOON.

Los 1 mg Rotenoon (Mw = 394.4) SIGMA Kat. no. R-8875 op in 1 ml 99 % etanol.

B.1.21 1 mg/ml ANTIMISIEN

Los 1 mg Antimisien op in 1 ml H_2O dd. Stoor by –20 °C.

B.1.22 1 mg/ml OLIGOMISIEN

Los 1 mg Oligomisien op in 1 ml H_2O dd. Stoor by –20 °C.

B.1.23 0.5 M NATRIUMAZIED

Los 0.033g NaN_3 (Mw = 65.01) Merck op in 1 ml H_2O dd. Stoor by – 20°C.

B.1.24 8% (w/v) TCA/2 mM EDTA

Los 4 g TCA (Mw = 163.4) Merck asook 0.037 g EDTA SIGMA Kat. no. E-5134 (Mw = 372.2) op in 50 ml H_2O dd.

B.1.25 TRIS-ACC-BUFFER

Die volgende reagense is gebruik:

100 mMTrisma Base (Mw = 121.1) SIGMA Kat. no. T-1503

2 mM EDTA (Mw = 372.2) SIGMA Kat. no. E-5134

75 µM DDT (Mw = 154.3) Dithiotreitol Boehringer Mannheim Kat. No. 197 777

7 mM $MgSO_4$ (Mw = 246.48) Saarchem-Holpro Analytic (Pty) Ltd

0.1% (w/v) NaN_3 (Natriumasied) (Mw = 65.01) Merck

Vir 'n 200 ml oplossing:

2.42 g Trisma base

2 ml 0.2 M EDTA

2.31×10^{-3} g DDT

0.345 g $MgSO_4$

0.2 g NaN_3

Los die reagense op in H_2O dd en stel die pH in tot 7.75 met ± 360 µl gekonsentreerde asynsuur.

B.1.26 VOLLEDIGE BUFFER

0.125% (w/v) BSA word by die Tris-Acc-Buffer (B.1.26) gevoeg. Vir 200 ml Volledige Buffer word 0.25 g BSA by die Tris-Acc-Buffer gevoeg.

B.1.27 2 µmol $MgSO_4$-OPLOSSING

Vir 'n 100 ml oplossing word 4.93 x 10^{-4} g $MgSO_4$ (Mw = 246.48) Saarchem-Holpro Analytic (Pty) Ltd gebruik. Los die $MgSO_4$ op in H_2O dd.

B.1.28 0.1 µM ATP EKSTERNE STANDAARD

Vir 'n 2.5 µM ATP oplossing word 1.51 mg ATP (Mw = 605.2) afgeweeg en by 998 µl $MgSO_4$-oplossing (B.1.27) gevoeg. Van die 2.5 µM ATP oplossing word 4 µl geneem en by 996 µl $MgSO_4$-oplossing (B.1.27) gevoeg.

B.1.29 0.64 mg/ml LUSIFERASE-LUSIFERIEN

0.64 mg Lusiferase-lusiferien ensiem SIGMA Kat. no. L-0633 word afgeweeg en in 1 ml Volledige Buffer (B.1.26) opgelos. Die ensiemoplossingword elke dag vars voorberei en by 4 °C in die donker gestoor.

B.1.30 MITOMIX

Die volgende reagense word gebruik:
250 mM Sukrose (Mw = 342.3) BDH Chemicals Ltd.
2 mM HEPES (Mw = 238.3) Boehringer Mannheim
0.1 mM EGTA (Mw = 380.4) SIGMA Kat. no. E -4378 Ethylene glycol Bis-(β-Aminoethylether) N,N,N',N' Tetraacetic acid

Vir 'n 200 ml oplossing is die volgende hoeveelhede gebruik:
17.115 g Sukrose
0.95 g HEPES

76 mg EGTA.

Die reagense word opgelos in H_2O dd en die pH word ingestel tot 7.4 met ongeveer 300 µl 1 N NaOH. Bewaar by 4 °C.

B.1.31 2 x KOMPLEKS I BUFFER

500 mM Sukrose (Mw = 342.3) BDH Chemicals Ltd.

2 mM EDTA (Mw = 372.2) SIGMA Kat. no. E-5134

100 mM Trisma base (Mw = 121.1) SIGMA Kat. no. T-1503

Vir 'n 5 ml oplossing:

0.856 g Sukrose

50 µl 0.2 M EDTA

0.61 g Trisma Base

Die reagense word in H_2O dd opgelos en die pH word ingestel tot 7.4. Bewaar by 4 °C.

B.1.32 0.2 M KCN

0.020 g KCN (Mw = 65.12) Merck word afgeweeg en in 1.5 ml H_2O dd opgelos. Stoor by –20 °C.

B.1.33 1 mM NADH

0.28 g NADH (Mw = 709.4) SIGMA Kat. no. N-8129 β-Nicotinamide adenine dinucleotide word opgelos in 400 µl H_2O dd. Maak elke dag vars aan.

B.1.34 1 mM DESIELUBIQUINOON

0.32 g Desielubiquinoon (Mw = 322.4) SIGMA Kat. no. D-7911 2,3-dimethoxy -5-methyl-6 decyl 1,4 benzoquinone word opgelos in 1 ml H_2O dd. Bewaar by –20 °C.

B.1.35 5 mM DCPIP

0.163 g DCPIP (Mw = 326.11) Merck Art. 3028 2,6-Dichlorphenolindophenol word opgelos in 1 ml H_2O dd. Die mengsel word elke dag vars opgemaak.

B.1.36 1 mM SITOCHROOM C

0.00625g Sitochroom c (Mw = 12 500) Boehringer Mannheim Kat. no. 103 861 word opgelos in 500 µl H_2O dd. Die mengsel word elke dag vars aangemaak.

B.1.37 GEREDUSEERDE SITOCHROOM C

100 mg Sitochroom c word opgelos in 10 mM kaliumfosfaatbuffer (pH 7.4) en daarby word 1 ml 0.1 M L-askorbiensuur gevoeg om die sitochroom c te reduseer. Die mengsel word op 'n 20 ml Sephadex G-25 kolom gelaai wat vooraf gewas is met 100 ml ontgasde 10 mM kaliumfosfaatbuffer (pH 7.4). Die verskillende fraksies word opgevang en die stok konsentrasie bereken. Die stokoplossing word in kleiner fraksies verdeel en die suurstof word verplaas onder stikstof. Die fraksies word by –70 °C gestoor en is vir ten minste 12 maande stabiel.

B.1.38 125 mM TRIS-HCl

0.99 g Tris-HCl (Mw = 157.6) SIGMA word opgelos in 5 ml H_2O dd. Die pH word ingestel tot 8 met 1N HCl.

B.1.39 6 mM ASETIEL KoA

0.496 g Asetiel koA (Mw = 827.4) word opgelos in 1 ml H_2O dd. Bewaar by –20 °C.

B.1.40 2 mM DTNB

0.00079 g DTNB (Mw = 396.4) word opgelos in 1 ml H_2O dd. Bewaar by –20 °C.

B.1.41 10 mM OKSALOASETAAT

0.00052 g Oksaloasetaat (Mw = 132.1) Boehringer Mannheim Kat. no.107 999 word opgelos in 400 µl H_2O dd. Bewaar by –20 °C.

Literatuurverwysings

ABRAHAMS, J.P., LESLIE, A.G.W., LUTTER, R. & WALKER, J.E. 1994. Structure at 2.8 Å resolution of F_1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature*, 370:621-628.

ÄDELROTH, P., SIGURDSON, H., HALLÉN, S. & BRZEZINSKI, P. 1996. Kinetic coupling between electron and proton transfer in cytochrome c oxidase: Simultaneous measurements of conductance and absorbance changes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93:12292-12297.

ALEDORT, L.M., WEED,R.I. & TROUP,S.B. 1966. Ionic effects on firefly bioluminesence assay of red blood cell ATP. *Analytical Biochemistry*, 17:268-277.

ALTAMURA, N., CAPITANIO, N., BONNEFOY, N., PAPA, S. & DUJARDIN, G. 1996. The *Saccharomyces cerevisiae OXA1* gene is required for the correct assembly of cytochrome c oxidase and oligomycin-sensitive ATP synthase. *FEBS Letters*, 382:111-115.

AMZEL, L.M. & PEDERSEN, P.L. 1983. Proton ATPases: Structure and mechanism. *Annual Review of Biochemistry*, 52:801-824.

ATP Analiserings Pakket Handleiding 12343-107, SIGMA.

BAKKER, H.D., SCHOLTE, H.R., JENESON, J.A.L., BUSCH, H.F.M., ABELING, N.G.G.M. & VAN GENNIP, A.H. 1994. Vitamin-responsive complex I deficiency in a myopathic patient with increased activity of the terminal respiratory chain and lactic acidosis. *Journal of Inherited Metabolic Diseases*, 17:196-204.

BARTH, P.G., VAN DEN BOGERT, C., BOLHUIS, P.A., SCHOLTE, H.R., VAN GENNIP, A.H., SCHUTGENS, R.B.H. & KETEL, A.G. 1996. X-linked cardioskeletal myopathy and neutropenia (Barth syndrome): Respiratory-chain abnormalities in cultured fibroblasts. *Journal of Inherited Metabolic Diseases*, 19:157-160.

BATES, T.E., HEALES, S.J.R., DAVIES, S.E.C., BOAKYE, P. & CLARK, J.B. 1994. Effects of 1-methyl-4-phenylpyridinium on isolated rat brain mitochondria: Evidence for a primary involvement of energy depletion. Journal of Neurochemistry, 63:640-648.

BEINERT, H. & ALBRACHT, S.P.J. 1982. New insights, ideas and unanswered questions concerning iron-sulfur clusters in mitochondria. Biochemica et Biophysica Acta, 683:245-277.

BELEZNAI, Z., SZALAY, L. & JANCSIK, V. 1988. Ca^{2+} and Mg^{2+} as modulators of mitochondrial L-glycerol-3-phosphate dehydrogenase. European Journal of Biochemistry, 170:631-636.

BIO-ORBIT. Luminescence Analysis. Bio-Orbit, Your Luminescence System, Application Note 100.

BIO-ORBIT. The extraction of ATP from biological material. Bio-Orbit, Your Luminescence System, Application Note 200.

BOYER, P.D. 1987. The unusual enzymology of ATP Synthase. Biochemistry, 26(26):8503-8507, December.

BOYER, P.D. 1992. The binding change mechanism for ATP synthase- Some probabilities and possibilities. Biochemica et Biophysica Acta, 1140:215-250.

BREMER, J. & DAVIS, E.J. 1975. Studies on the active transfer of reducing equivalents into mitochondria via the malate-aspartate shuttle. Biochimica et Biophysica Acta, 376:387-397.

BROWN, R.E., JARVIS, K.I. & HYLAND, K.J. 1989. Protein measurement using Bicinchoninic acid: Elimination of interfering substances. _Analytical Biochemistry_, 180:136-139.

BRUNORI, M. & WILSON, M.T. 1982. Cytochrome oxidase. _Trends in Biochemical Sciences_, 7:295-299.

CAPALDI, R.A., MALATESTA, F. & DARLEY-USMAR, V.M. 1983. Structure of cytochrome c oxidase. _Biochemica et Biophysica Acta_, 728:135-148.

CHITTOCK, R.S., HAWRONSKYJ, J-M., HOLAH, J. & WHARTON, C.W. 1998. Kinetic aspects of ATP amplification reactions. _Analytical Biochemistry_, 255:120-126.

CHRETIEN, D., POURRIER, M., BOURGERON, T., SÉNÉ, M., RÖTIG, A., MUNNICH, A. & RUSTIN, P. 1995. An improved spectrophotometric assay of pyruvate dehydrogenase in lactate dehydrogenase contaminated mitochondrial preparations from human skeletal muscle. _Clinica Chimica Acta_, 240:129-136.

CHRISTENSEN, E., BRANDT, N.J., SCHMALBRUCH, H., KAMIENIECKA, Z., HERTZ, B. & RUITENBEEK, W. 1993. Muscle cytochrome *c* oxidase deficiency accompanied by a urinary organic acid pattern mimicking multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency. _Journal of Inherited Metabolic Disease_, 16:553-556.

CHRZANOWSKA-LIGHTOWLERS, Z.M.A., TURNBULL, D.M. & LIGHTOWLERS, R.N. 1993. A microtiter plate assay for cytochrome c oxidase in permeabilized whole cells. _Analytical Biochemistry_, 214:45-49.

COLBEAU, A., NACHBAUR, J., VIGNAIS, P.M. 1971. Enzymic characterization and lipid composition of rat liver subcellular membranes. _Biochimica et Biophysica Acta_, 249:462-492.

CUILLA, T.A., NORTH, K., McCABE, O., ANTHONY, D.C., KORSON, M.S. & PETERSEN, R.A. 1995. Bilateral infantile cataractogenesis in a patient with deficiency of complex I, a mitochondrial electron transport chain enzyme. Journal of Pediatric Opthamology and Strabismus, 32(6):378:382.

DEGLI ESPOSTI, M., NGO, A., McMULLEN, G.L., GHELLI, A., SPARLA, F., BENELLI, B., RATTA, M. & LINNANE, A.W. 1996. The specificity of mitochondrial complex I for ubiquinones. Biochemical Journal, 313:327-334.

EATON, S., POURFARZAM, M. & BARTLETT, K. 1996. The effect of respiratory chain impairment on β-oxidation in rat heart mitochondria. Biochemical Journal, 319:633-640.

FISKUM, G., CRAIG, S.W., DECKER, G.L. & LEHNINGER, A.L. 1980. The cytoskeleton of digitonin-treated rat hepatocytes. Proceedings of the National Academy of Sciences, 77:3430-3434.

FRERMAN, F.E. & GOODMAN, S.I. 1995. Nuclear-encoded defects of the mitochondrial respiratory chain, including Glutaric Acidemia type II. (In: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. & Valle, D., eds. The metabolic and molecular bases of inherited disease. 7th ed. New York, McGraw-Hill, Inc. 1:1611-1625.)

FROUD, R.J. & RAGAN, C.I. 1984 Cytochrome *c*-mediated electron transfer between ubiquinol-cytochrome *c* reductase and cytochrome *c* oxidase. Biochemical Journal, 217:551-560.

GALJAARD, H. 1986. Genetic metabolic diseases: early diagnosis and prenatal analysis. Amsterdam, Elsevier.

GRANGER, D.L. & LEHNINGER, A.L. 1982. Sites of inhibition of mitochondrial electron transport in macrophage-injured neoplasitc cells. *The Journal of Cell Biology*, 95:527-535.

HARRIS, S.I., BALABAN, R.S., BARRETT, L. & MANDEL, L.J. 1981. Mitochondrial respiratory capacity and Na^+- and K^+-dependent adenosine triphosphatase-mediated ion transport in the intact renal cell. *The Journal of Biological Chemistry*, 256:10319-10328.

HATEFI, Y. 1985. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annual Review of Biochemistry*, 54:1015-1069.

HINKLE, P.C., KUMAR, M.A., RESETAR, A. & HARRIS, D.L. 1991. Mechanistic stoichiometry of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochemistry*, 30:3576-3582.

HOFHAUS, G., SHAKELEY, R.M. & ATTARDI, G. 1996. Use of polarography to detect respiration defects in cell cultures. *Methods in Enzymology*, 264, 476-483.

HOLMSEN, H., STORM, E., DAY, H.J. 1972. Determination of ATP and ADP in blood platelets: A modification of the firefly luciferase assay for plasma. *Analytical Biochemistry*, 46:489-501.

HORTON, H.R., MORAN, L.A., OCHS, R.S., RAWN, J.R. & SCRIMGEOUR, K.G. 1996. *Principles of Biochemistry*, **2nd ed.** London: Prentice-Hall International, Inc. p411-433

JAMES, A.M., WEI, Y-H., PANG, C-Y. & MURPHY, M.P. 1996. Altered mitochondrial function in fibroblasts containing MELAS or MERRF mitochondrial DNA mutations. *Biochemical Journal*, 318:401-407.

KAPSA, R., THOMPSON, G.N., THORBURN, D.R., DAHL, H.-H.M., MARZUKI, S., BYRNE, E. & BLOK, R.B. 1994. A novel mtDNA deletion in an infant with Pearson Syndrome. *Journal of Inherited Metabolic Diseases*, 17:521-532.

KRICKA, L.J., & DE LUCA, M. 1982. Effect of solvents on the catalytic activity of firefly luciferase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 217:674-681.

LEE, G.Y., ZHU, J., YU, L. & YU, C-A. 1998. Reconstitution of cytochrome *b*-560 (QPs1) of bovine heart mitochondrial succinate-ubiquinone reductase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1363:35-46.

LENAZ, G. & FATO, F. 1986. Is ubiquinone diffusion rate-limiting for electron transfer? *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 18:369-401.

LOWERSON, S.A., TAYLOR, L., BRIGGS, H.L. & TURNBULL, D.M. 1992. Measurement of the activity of individual respiratory chain complexes in isolated fibroblast mitochondria. *Analytical Biochemistry*, 205:372-374.

LUDER, A. & BARASH, V. 1994. Complex I deficiency with diabetes, Fanconi syndrome and mtDNA deletion. *Journal of Inherited Metabolic Diseases*, 17:298-299.

MAJAMAA, K., RUSANEN, H., REMES, A. & HASSINEN, I.E. 1997. Metabolic interventions against complex I deficiency in MELAS syndrome. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 174:291-296.

MAJANDER, A., RAPOLA, J., SARIOLA, H., SUOMALAINEN, A., POHJAVUORI, M. & PIHKO, H. 1995. Diagnosis of fatal infantile defects of the mitochondrial respiratory chain: age dependence and post mortem analysis of enzyme activities. *Journal of Neurological Sciences*, 134:95-102.

MANELLA, C.A. 1982. Structure of the outer mitochondrial membrane: Ordered arrays of porelike subunits in outer-membrane fractions from *Neurospora crassa* mitochondria. *The Journal of Cell Biology*, 94:680-687, September.

MATSUNO-YAGI, A. & HATEFI, Y. 1996. Ubiquinol-Cytochrome c oxidoreductase. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(11):6164-6171, March

MITCHELL, P. 1979. Keilin's respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences. *Science*, 206:1148-1159, December.

MOONEY, R.A. 1988. Use of digitonin-permeabilized adipocytes for cAMP studies. *Methods of Enzymology*, 159:193-202.

MORRIS, A.A.M., LEONARD, J.V., BROWN, G.K., BIDOUKI, S.K., BINDOFF, L.A., WOODWARD, C.E., HARDING, A.E., LAKE, B.D., HARDING, B.N., FARREL, M.A., BELL, J.E., MIRAKHUR, M. & TURNBULL, D.M. 1996. Deficiency of respiratory chain complex I is a common cause of Leigh disease. *Annals of Neurology*, 40(1):25-35. July

MUNNICH, A., RÖTIG, A., CHRETIEN, D., SAUDUBRAY, J., CORMIER, V. & RUSTIN, P. 1996. Clinical presentations and laboratory investigations in respiratory chain deficiency. *European Journal of Pediatrics*, 155(4):262-274, April.

MURRAY, R.K., GRANNER, D.K., MAYES, P.A. & RODWELL, V.W. 1996. *Harper's Biochemistry*, **24th** ed. Prentice-Hall International, Inc. p 123-134.

NOLTE, L. 1997. *Die ontwikkeling van elektrosproei massaspektrometrie vir die bepaling van karnitienpalmitoïeltransferase I-aktiwiteit in fibroblaste en leukosiete.* Verhandeling vir M.Sc.-graad, PU vir CHO.

PEDERSEN, P.L. & AMZEL, L.M. 1993. ATP Synthases. The Journal of Biological Chemistry, 268(14):9937-9940, May.

PRESCOTT, D.M. Cells- Principals of molecular struture and function, Boston: Jones and Bartlett Publishers p. 135-143.

RAGAN, C.I., WILSON, M.T., DARLEY-USMAR, V.M. & LOWE, P.N. 1987. Sub-fractionation of mitochondria and isolation of the proteins of oxidative phosphorylation. In Mitchondria, a practical approach, Chapter 4, V.M. Darley-Usmar, D. Rickwood, M.T. Wilson, eds. (Oxford: IRL Press), p. 79-83.

RICKWOOD, D., WILSON, M.T. & DARLEY-USMAR, V.M. 1987. Isolation and characteristics of intact mitochondria. In Mitchondria, a practical approach, Chapter 1, V.M. Darley-Usmar, D. Rickwood, M.T. Wilson, eds. (Oxford: IRL Press), p. 1-7.

ROBINSON, B.H. 1996. Use of fibroblast and lymphoblast cultures for detection of respiratory chain defects. Methods of Enzymology, 264:454-465.

ROBINSON, K.M. & LEMIRE, B.D. 1996. Covalent attachment of FAD to the yeast succinate dehydrogenase flavoprotein requires import into mitochondria, presequence removal and folding. The Journal of Biological Chemistry, 271(8):4055-4060.

RUSTIN, P., CHRETIEN, D., BOURGERON, T., GÉRARD, B., RÖTIG, A., SAUDUBRAY, J.M. & MUNNICH, A. 1994. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. Clinica Chimica Acta, 228:35-51.

SCALLEN, T.J. & DIETERT, S.E. 1969. The quantitative retention of cholesterol in mouse liver prepared for electron microscopy by fixation in a digitonin-containing aldehyde solution. The Journal of Cell Biology, 40:803-813.

SCHOLTE, H.R., BUSCH, H.F.M., LUYT-HOUWEN, I.E.M., VAANDRAGER-VERDUIN, M.H.M., PRZYREMBEL, H. & ARTS, W.F.M. 1987. Defects of oxidative phosphorylation. Biochemical investigations in skeletal muscle and expression of the lesion in other cells. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 10:81-97.

SCHOONEN, W.G.E.J., WANAMARTA, A.H., VAN DER KLEI-VAN MOORSEL, J.M., JAKOBS, C. & JOENJE, H. 1990. Respiratory failure and stimulation of glycolysis in Chinese hamster ovary cells exposed to normobaric hyperoxia. *The Journal of Biological Chemistry,* 265:11118-11124.

SENIOR, A.E. 1983. Secondary and tertiary structure of membrane proteins involved in proton translocation. *Biochemica et Biophysica Acta*, 726:81-95.

SENGERS, R.C.A., STADHOUDERS, A.M. & TRIJBELS, J.M.F. 1984. Mitochondrial myopathies: Clinical, morphological and biochemical aspects. *European Journal of Pediatrics*, 141:192-207.

SHOFFNER, J.M. & WALLACE, D.C. 1995. Oxidative phosphorylation diseases. (*In*: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. & Valle, D., *eds*. The metabolic and molecular bases of inherited disease. **7th ed**. New York, McGraw-Hill, Inc. 1:1535-1545.)

SMITH, P.K., KROHN, R.I., HERMANSON, G.T., MALLIA, A.K., GARTNER, F.H., PROVENZANO, M.D., FUJIMOTO, E.K., GOEKE, N.M., OLSON, B.J., KLENK, D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, 150:76-85.

STANLEY, P.E. 1986. Extraction of adenosine triphosphate from microbial and somatic cells. In *Methods in Enzymology*, Vol 133, Biolouminescence and Chemiluminescence, Part B, M.A. DeLuca, w.D. McElroy, eds. (New York: Academic press), p. 14-22.

SWERDLOW, R.H., PARKS, J.K., MILLER, S.W., TUTTLE, J.B., TRIMMER, P.A., SHEEHAN, J.P., BENNETT, J.P., DAVIS, R.E. & PARKER, W.D. 1996. Origin and functional consequences of the complex I defect in Parkinson's disease. Annals of Neurology, 40(4):663-671.

TRAUTSCHOLD, I., LAMPRECHT, W. & SCHWEITZER, G. 1985. UV-method with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. In Methods of Enzymatic Analysis, Third edition, Vol VII, H.U. Bergmeyer, J. Bergmeyer, M. Graßl, eds. (USA: VCH Publishers), p. 346-347.

TROUNCE, I.A., KIM, Y.L., JUN, A.S. & WALLACE, D.C. 1996. Assessment of Mitochondrial Oxidative phosphorylation in patient muscle biopsies, lymphoblasts and transmitochondrial cell lines. Methods of Enzymology, 264:484-509.

TRUMPOWER, B.L. 1990. The protonmotive Q cycle: Energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by cytochrome bc_1 complex. The Journal of Biological Chemistry, 265(20):11409-11412, July.

TZAGOLOFF, A. 1982. Cytochrome Oxidase. In Mitochondria, P. Siekevitz, ed. (New York and London: Plenum Press), p.111-113.

VAN DER WESTHUIZEN, F.H. 1993. Klonering en uitdrukking van die mensgeen vir interleukin-5 (IL-5). Verhandeling vir M.Sc.-graad, PU vir CHO.

VENTURA, F.V., RUITER, J.P.N., IJLST, L., ALMEIDA, I.T. & WANDERS, R.J.A. 1995. Inhibition of oxidative phosphorylation by palmitoyl-CoA in digitonin permeabilized fibroblasts: implications for long-chain fatty acid β-oxidation disorders. Biochimica et Biophysica Acta, 1272:14-20.

WALLACE, D.C., LOTT, M.T., SHOFFNER, J.M. & BROWN, M.D. 1992. Diseases resulting from mitochondrial DNA point mutations. Journal of Inherited Metabolic Diseases, 15:472-479.

WANDERS, R.J.A., RUITER, J.P.N. & WIJBURG, F.A. 1993. Studies on mitochondrial oxidative phosphorylation in permeabilized human skin fibroblasts: application to mitochondrial encephalomyopathies. Biochimica et Biophysica Acta, 1181:219-222.

WANDERS, R.J.A., RUITER, J.P.N. & WIJBURG, F.A. 1994. Mitochondrial oxidative phosphorylation in digitonin-permeabilized Chorionic Villus fibroblasts: A new method with potential for prenatal diagnosis. Journal of Inherited Metabolic Diseases, 17:304-306.

WANDERS, R.J.A., RUITER, J.P.N. & WIJBURG, F.A. 1996. Prenatal diagnosis of systemic disorders of the respiratory chain in cultured chorionic villus fibroblasts by study of ATP-synthesis in digitonin-permeabilized cells. Journal of Inherited Metabolic Diseases, 19:133-136.

WANG, J.H. 1983. Coupling of proton flux to the hydrolysis and synthesis of ATP. Annual review of biophysica and bioenginering, 12:21-34.

WEISS, H., FRIEDRICH, T., HOFHAUS, G. & PREIS, D. 1991. The respiratory-chain NADH dehydrogenase (complex I) of mitochondria. European Journal of Biochemistry, 197:563-576.

WENDEL, U., RUITENBEEK, W., BENTLAGE, H.A.C.M., SENGERS, R.C.A. & TRIJBELS, J.M.F. 1995. Neonatal De Toni-Debrè-Fanconi syndrome due to a defect in complex III of the respiratory chain. European Journal of Pediatrics, 154:915-918.

WOLFE, S.L. 1981. Biology of the Cell, 2nd ed. Belmont, California: Wadsworth Publishing Company, p 134-168

WOLVETANG, E.J., TAGER, J.M. & WANDERS, R.J.A. 1990. Latency of the peroxisomal enzyme acyl-coA:dihydroxyacetonephosphate acyltransferase in digitonin-permeabilized fibroblasts: The effect of ATP and ATPase inhibitors. *Biochemical and biophysical research communications*, 170:1135-1143.

WULFF, K. & DÖPPEN, W. 1985. Luminometric Method. In *Methods of Enzymatic Analysis*, Third edition, Vol VII, H.U. Bergmeyer, J. Bergmeyer, M. Graßl, eds. (USA: VCH Publishers), pp. 357-364.

ZHENG, X., SHOFFNER, J.M., VOLJAVEC, A.S. & WALLACE, D.C. 1990. Evaluation of procedures for assaying oxidative phosphorylation enzyme activities in mitochondrial myopathy muscle biopsies. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1019:1-10.

Lys van Afkortings

A	absorbansie
ADP	Adenosiendifosfaat
ATP	Adenosientrifosfaat
BCA	Bicinchoniniensuur
BSA	Beesserumalbumien
$CaCl_2$	Kalsiumchloried
cm^2	Kubieke sentimeter
CO_2	Koolstofdioksied
DDT	Dithiotreitol
DNA	Deoksiribonukleïensuur
DHAF	Dihidroksiasetoonfosfaat
DTNB	5,5'–ditiobis(2-nitrobensoësuur)
EDTA	Etileendiamientetra-asynsuur
EGTA	Etileenglikol-bis(β-aminoetiel-eter)tetra-asynsuur
ETF	Elektronoordrag flavoproteïen
ETF:QO	Elektronoordraf flavoproteïen: Ubiquinoon oksidoreduktase
FAD	Flavienadenien dinukleotied (geoksideerde vorm)
FADH	Flavienadenien dinukleotied (gereduseerde vorm)
G-3-P	Gliserol-3-Fosfaat
x g	Gravitasie eenhede ontwikkel tydens sentrifugering
HCl	Waterstofchloried (soutsuur)
HEPES	4-(2-hidroksiëtiel)-1-piperasien-etaansulfoonsuur

H_2O dd	Dubbel gedistileerde water (gedeïoniseerde hoogsuiwer water)
Kat. no.	Katalogus nommer
KCl	Kaliumchloried
KCN	Kaliumsianied
kDa	Kilodalton
KH_2PO_4	Kaliumdiwaterstoffosfaat
K_2HPO_4	Dikaliumwaterstoffosfaat
KoA	Koënsiem A
L/P	Laktaat tot piruvaat verhouding
MELAS	mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic asidosis and stroke-like episodes
MERRF	myoclonic epilepsy and ragged red fibres
Mg^+ (aq)	Magnesiumsulfaatoplossing
$MgCl_2$	Magnesiumchloried
$MgSO_4$	Magnesiumsulfaat
mtDNA	Mitochondriaal gekodeerde DNA
mV	Millivolt
Mw	Molekulêre gewig
N	Normaal
NaCl	Natriumchloried
NAD	Nikotienamied adenien dinukleotied (geoksideerde vorm)
NADH	Nikotienamied adenien dinukleotied (gereduseerde vorm)
$NaHCO_3$	Natriumwaterstofkarbonaat
Na_2HPO_4	Natriumwaterstoffosfaat
NaN_3	Natriumazied
NaOH	Natriumhidroksied

NH_4Cl	Ammoniumchloried
nmol	Nanomol
$nmol.mg^{-1}.min^{-1}$	Nanomol per milligram per minuut
O_2	Molekulêre suurstof
PBS	Fosfaat-gebufferde fisiologiese soutoplossing
PDH	Piruvaatdehidrogenase
Pen-Strep	Pennisillien-streptomisien
Pi	Fosfaatgroep
PPLO	Eng: pleuropneumonia-like organisms
Q	Koënsiem Q (geoksideerde vorm), ubiquinoon
QH_2	Koënsiem Q (gereduseerde vorm), ubiquinol
rpm	Rotasies per minuut
Sit c	Sitochroom c
SS-siklus	Sitroensuursiklus
SSV	Serebrospinaalvog
TCA	Trichloorasynsuur
TMPD	N,N,N',N'-tetrametiel-(-fenieldiamien)
Tris	Tris-(hidroksimetiel)-aminometaan
Tris HCl	Tris-(hidroksimetiel)-aminometaan hidrochloried
Tris-Acc Buffer	Tris asetaat buffer
µg	Mikrogram
µg/ml	Mikrogram per milliliter
µg/µl	Mikrogram per mikroliter
UHBDT	5 Undesiel-6 hidroksie-4,7-hidroksinaftoquinoon

μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μmol	Mikromol
V	Vyf
(v/v)	Volume per volume
(w/v)	Massa per volume