

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2022

Jana Kulnigová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Buněčná smrt závislá na mitochondriích
Bakalářská práce

2022

Jana Kulnigová

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

Mitochondria-dependent Cell Death
Bachelor Thesis

2022

Jana Kulnigová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Jana Kulnígová**
Osobní číslo: **C19252**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Buněčná smrt závislá na mitochondriích**
Téma práce anglicky: **Mitochondria-dependent Cell Death**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Zpracujte literární rešerši zaměřenou na popis programované buněčné smrti. Ve své práci nejprve popište stručně druhy buněčných smrtí, charakterizaci programované smrti buněk, popř. vysvětlete další, k tématu relevantní pojmy. Následně podrobně popište roli mitochondrií v procesu buněčné smrti se zaměřením na mitoptózu. U tohoto typu smrti buněk detailně popište princip, regulaci, výskyt, a aktuální pohled na význam mitoptózy v lidském organismu.
2. Ke zpracování kompilace využijte elektronických vědeckých databází, jako jsou např. *ScienceDirect*, *NCBI Pubmed*, apod.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Pavla Staňková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant bakalářské práce: **doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Datum zadání bakalářské práce: **18. prosince 2021**
Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2022**

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc. v.r.
děkan

L.S.

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2022

Prohlašuji:

Tuto práci s názvem Buněčná smrt závislá na mitochondriích jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. X/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 1.7.2022

Jana Kulnigová

PODĚKOVÁNÍ:

Tímto bych ráda poděkovala své vedoucí bakalářské práce, Mgr. Pavle Staňkové Ph.D. za odborné vedení, za vstřícný přístup a čas při konzultacích, věcné připomínky a cenné rady, které mi při zpracování práce poskytla. Dále bych chtěla poděkovat svým přátelům, za jejich podporu během celého studia a na závěr samozřejmě rodině, za jejich trpělivost a podporu po celou dobu.

ANOTACE

Tato bakalářská práce popisuje mitochondrie, jejich vliv na buněčnou smrt a jejich zánik. V úvodní části jsou stručně popsány základní informace a evoluční vývoj mitochondrií, dále jejich struktura, transport proteinu přes mitochondriální membrány, dynamika, a především funkce mitochondrií se zaměřením na syntézu ATP. V druhé kapitole je popsána buněčná smrt, apoptóza a nekróza. V první části této podkapitoly jsou základními informacemi o apoptóze, nejdůležitější proteiny do ní zapojené, kaspázy a Bcl-2, a dále byly popsány obě cesty apoptózy. V třetí kapitole je popsána mitoptóza tedy program smrti postihující mitochondrie. V první části je stručný popis mitoptózy vnitřní a vnější mitochondriální membrány. V druhé části je vysvětlen mechanismus uvolňování mitochondrií z buňky a mitoptóza spojená s likvidací mitochondrií uvnitř buňky. V poslední kapitole jsou popsána mitochondriální onemocnění způsobená mutacemi v mitochondriální DNA.

KLÍČOVÁ SLOVA

Mitochondrie, mtDNA, apoptóza, mitoptóza, ATP

TITLE

Mitochondria-dependent Cell Death

ANNOTATION

This bachelor thesis describes mitochondria, their influence on cell death and their demise. In the introductory part is the basic information and evolutionary development of mitochondria are briefly described, as well as their structure, protein transport across mitochondrial membranes, dynamics, and especially mitochondrial function with a focus on ATP synthesis. The second chapter describes cell death, apoptosis and necrosis. In the first part of this subchapter are described basic information about apoptosis, the most important proteins involved in it, caspases and Bcl-2, and the two pathways of apoptosis. In the third chapter is described mitoptosis, a death program affecting mitochondria. In the first part is given a brief description of mitoptosis of the inner and outer mitochondrial membrane. The second part explains the mechanism of mitochondrial release from the cell and the mitoptosis associated with the destruction of mitochondria inside the cell. In the last chapter are described mitochondrial diseases caused by mutations in mitochondrial DNA.

KEYWORDS

Mitochondria, mtDNA, apoptosis, mitoptosis, ATP

OBSAH

1. ÚVOD	15
2. TEORETICKÁ ČÁST	16
2.1 MITOCHONDRIE	16
2.1.1 Základní informace a evoluční vývoj mitochondrie	16
2.1.2 Struktura mitochondrie	17
2.1.3 Transport proteinu přes mitochondriální membrány	21
2.1.4 Mitochondriální dynamika.....	22
2.1.5 Funkce mitochondrie	24
2.1.5.1 Syntéza ATP.....	24
2.1.5.2 Reaktivní formy kyslíku.....	28
2.1.5.3 Mitochondriální vápníková signalizace.....	30
2.1.5.4 Syntézy hemu	31
2.1.5.5 Syntéza Fe/S klastrů	31
2.2 BUNĚČNÁ SMRT.....	32
2.2.1 Apoptóza.....	33
2.2.1.1 Kaspázy	33
2.2.1.2 Bcl-2 proteiny.....	34
2.2.1.3 Vnější cesta apoptózy.....	36
2.2.1.4 Vnitřní cesta apoptózy.....	38
2.2.2 Nekróza.....	41
2.3 MITOPTÓZA.....	42
2.3.1 Mitoptóza vnitřní mitochondriální membrány.....	42
2.3.2 Mitoptóza vnější mitochondriální membrány.....	42
2.3.3 Mechanismy spojené s uvolňováním mitochondrií z buňky	43
2.3.3.1 Mitoptóza vyvolaná odpojením oxidativní fosforylace.....	43
2.3.3.2 Mitoptóza a apoptóza	45
2.3.3.3 Mitoptóza indukována mediátory zánětu	45
2.3.4 Mitoptóza spojená s likvidací mitochondrií uvnitř buňky	46
2.3.4.1 Mitoptóza při terminální diferenciaci.....	46
2.3.4.2 Mitoptóza a metabolická přestavba.....	47
2.4 MITOCHONDRIÁLNÍ ONEMOCNĚNÍ.....	47

2.4.1	Onemocnění způsobená mutacemi v mtDNA	48
2.4.1.1	Defekty v syntéze mitochondriálních proteinů	49
2.4.1.2	Defekty genů kódujících proteiny	51
3.	ZÁVĚR.....	52
4.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	53

SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Obrázky:

Obrázek 1: Stavba mitochondrie u živočichů

Obrázek 2: Komplex MICOS v místě spojení krist

Obrázek 3: Schematické znázornění mitochondriální DNA

Obrázek 4: Syntéza ATP

Obrázek 5: Mitoptóza vnější mitochondriální membrány

Obrázek 6: Různé mechanismy mitoptózy

Obrázek 7: Schéma dýchacího řetězce

Tabulky:

Tabulka I: Proteiny vnější dráhy apoptózy

Tabulka II: Proteiny vnitřní dráhy apoptózy

SEZNAM ZKRATEK

Acetyl-CoA	Acetylkoenzym A
ADP	Adenosindifosfát
ApoL	Apo ligand
ATP	Adenosintrifosfát
ATPáza	Adenosin trifosfatáza
Bad	Bcl-2 asociovaný agonista buněčné smrti (<i>Bcl-2 associated agonist of cell death</i>)
Bak	Bcl-2 homologní antagonist/zabiják (<i>Bcl-2 homologous antagonist/killer</i>)
Bax	Bcl-2 asociovaný X protein (<i>Bcl-2 associated X protein</i>)
Bcl-2	B-buněčný lymfom 2 (<i>B-cell lymphoma 2</i>)
Bcl-xL	B-buněčný lymfom extra velký (<i>B-cell lymphoma extra large</i>)
BH	Bcl-2 homologie (<i>Bcl-2 homology</i>)
Bid	Agonista smrti interagující s doménou BH3 (<i>BH3 interacting domain death agonist</i>)
Bik	Bcl-2 působící na smrt (<i>Bcl-2 interacting killer</i>)
Bmf	Bcl-2 modifikující faktor (<i>Bcl-2 modifying factor</i>)
DR	Receptor smrti (<i>Death Receptor</i>)
FADD	Fas-asociovaná doména smrti (<i>Fas-associated death domain</i>)
FADH ₂	Flavinadenindinukleotid
Fas/FasR	Receptor syntetázy mastných kyselin (<i>Fatty acid synthetase receptor</i>)
FasL	Ligand syntetázy mastných kyselin (<i>Fatty acid synthetase ligand</i>)
GTP	Guanosintrifosfát
GTPáza	Guanosin trifosfatáza
IAP	Inhibitor apoptózy (<i>Inhibitor of apoptosis</i>)
Mcl-1	Indukovaný protein myeloidní leukemické buňky (<i>Myeloid cell leukemia-1</i>)
MICOS	Mitochondriální kontaktní místo a systém uspořádání krist (<i>Mitochondrial contact site and cristae organizing system</i>)
mtDNA	Mitochondriální DNA
mtROS	Mitochondriální ROS
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NOX	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát oxidáza (<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase</i>)
Noxa	Protein 1 indukovaný forbol-12-myristátem-13-acetátem (<i>Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1</i>)
OPA1	Fúzní protein atrofie zraku 1 (<i>Fusion protein Optic atrophy type 1</i>)
PCD	Programovaná buněčná smrt (<i>Programmed cell death</i>)
Puma	p53-upregulovaný modulátor apoptózy (<i>p53-upregulated modulator of apoptosis</i>)
ROS	Reaktivní formy kyslíku (<i>Reactive oxygen species</i>)
rRNA	Ribozomální RNA
tRNA	Transférová RNA
SAM	Komplex třídění a sestavování (<i>Complex for sorting and assembling beta-barrel proteins from the intermembrane space side into the outer membrane</i>)
SOD	Superoxid dismutáza (<i>Superoxide dismutase</i>)

TIM	Translokázy vnitřní membrány (<i>Translocase of the inner membrane</i>)
TNF	Tumor nekrotizující faktor (<i>Tumor necrosis factor</i>)
TNFR1	Tumor nekrotizující faktor receptor 1 (<i>Tumor necrosis factor receptor 1</i>)
TOM	Translokáza vnější membrány (<i>Translocase of the outer membrane</i>)

1. ÚVOD

Mitochondrie jsou semiautonomní buněčné orgány, vyskytující se v eukaryotických buňkách. Základná strukturu mitochondrií tvoří dvě membrány. Vnější membrány je značně pórovitá, skutečnou bariéru představuje spíše vnitřní membrána, na níž a uvnitř ní se odehrávají ty nejdůležitější metabolické pochody. Základní funkcí mitochondrií je produkce a uvolňování energie pro organismus. Počet mitochondrií v buňce závisí na její aktuální energetické potřebě.

Buněčná smrt představuje jeden z klíčových fyziologických procesů. Ačkoli pro jednotlivou buňku představuje konečný bod existence, z hlediska mnohobuněčného organismu je proces buněčné smrti jednou z determinantů určujících správný vývoj jedince, homeostázu tkání i orgánů a přežití celého organismu.

Termín mitoptóza označuje programovanou smrt neboli likvidaci mitochondrií v živé buňce. Mitoptóza může mít různou podobu, buď může dojít k mitoptóze vnitřní membrány, vnější membrány nebo smíšené formě.

Mitochondriální onemocnění je označení pro poruchy mitochondriálního dýchacího řetězce, což je jediná metabolická dráha v buňce, která je pod dvojí kontrolou mitochondriálního genomu a jaderného genomu. Z genetického hlediska můžeme mitochondriální onemocnění rozdělit na poruchy způsobené mutací v mitochondriální DNA a v DNA.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 MITOCHONDRIE

2.1.1 Základní informace a evoluční vývoj mitochondrie

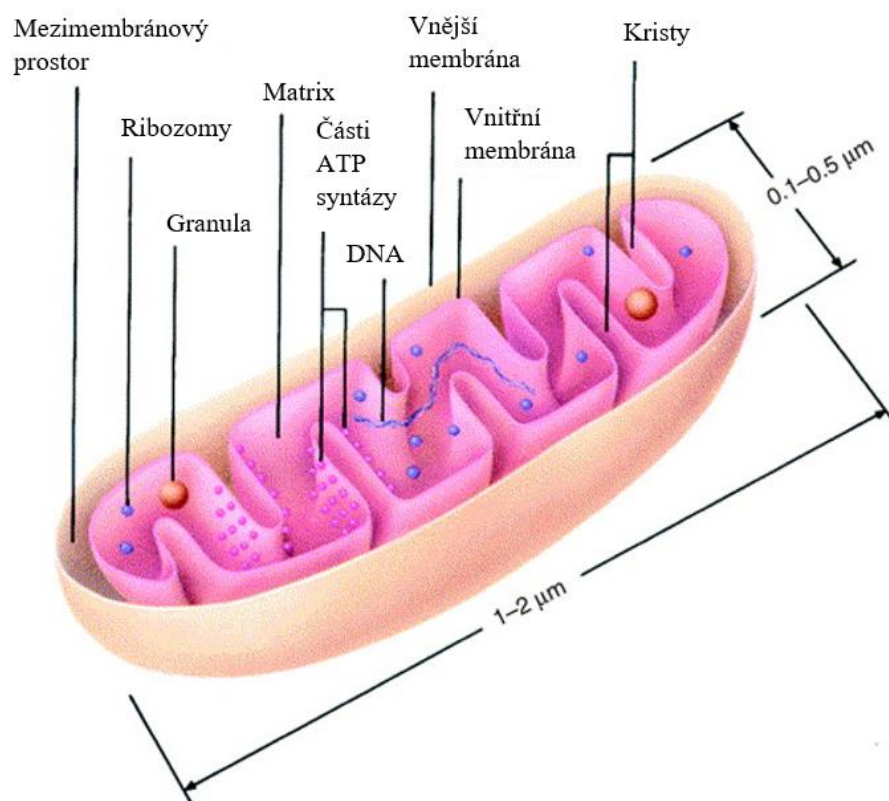
Mitochondrie představují membránou ohraničené semiautonomní organely obsahující enzymatické systémy, jež produkují základní energii buňky ve formě makroergních fosfátových vazeb. Nacházejí se prakticky ve všech buňkách a ve všech částech buňky. V jedné buňce se jejich počet pohybuje podle aktuálně potřebného množství energie od několika set až po mnoho tisíc. Mitochondrie se podílí na celé řadě procesů důležitých pro přežití buňky (*Schenkel, 2014*). Mitochondrie hrají zásadní roli v produkci energie, anabolickém a katabolickém metabolismu a v cestách programované buněčné smrti, lze je snadno purifikovat z modelových organismů a defekty v mitochondriálních proteinech mohou mít dramatický vliv na funkce buněk a orgánů (*Heazlewood, 2003*).

Protože mitochondrie nelze syntetizovat de novo, musí vznikat z již existujících a musí se předávat z generace na generaci. Nakonec všechny existující mitochondriální linie sahají až k dávné endosymbióze alfa-proteobakterie do archebakteriálního hostitele (*Aanen et al., 2014*). Mitochondriální DNA (mtDNA) má vysokou míru mutací a dědí se nemendelovským způsobem pouze od matky (*Stewart et al., 2008*). Otcovská mtDNA je degradována během oplodnění. Bylo zjištěno, že k odstranění paternální mtDNA během oplození přispívá mitofágie a endonukleáza G (*Yan, 2019*).

Předpokládá se, že mitochondrie vznikly z volně žijících alfa-proteobakterií, které si vytvořily symbiotický vztah s hostitelskou buňkou. Pro tento scénář nyní existují přesvědčivé fylogenetické důkazy, podpořené fakty, že mitochondrie mají vlastní DNA, označovanou mtDNA, a že některé mitochondriální proteiny mají rovněž bakteriální původ. Podobně jako u bakterií jsou tyto organely spojeny vnější a vnitřní membránou. Vnější membrána umožňuje výměnu metabolitů mezi vnitřní membránou a cytosolem, ale také může mitochondrie uzavřít před uvolňováním škodlivých látek do cytosolu, jako jsou reaktivní formy kyslíku (ROS) a mtDNA. Nicméně v subtoxickém množství slouží mitochondriální ROS po uvolnění do cytosolu jako signální molekuly (*Bartolák-Suki, 2017*).

2.1.2 Struktura mitochondrie

Tvar mitochondrií je na řezu nejčastěji válcovitý nebo eliptický. Základní strukturu mitochondrií tvoří dvě lipidoproteinové membrány, přičemž vnitřní z nich je zřasena v kristy. Fosfolipidy jako jedna z hlavních tříd lipidů v lipidové dvojvrstvě membrán buněk a organel jsou zodpovědné za udržování strukturální integrity buňky i prostorové oddělení subcelulárních kompartmentů. Hlavní třídy fosfolipidů, které se nacházejí v mitochondriální membráně, jsou podobné ostatním membránám, jedná se o fosfatidylcholin, fosfatidyletanolamin, fosfatidylnositol, fosfatidylserin a kyselina fosfatidová, některé jsou výhradně součástí mitochondriální membrány jako například kardiolipin a fosfatidylglycerol (Schenkel, 2014). Vnitřní prostor mitochondrie vyplňuje gelovitá mitochondriální matrix obsahující řadu enzymů, mtDNA, mitochondriální granula, ribozomy, kapénky lipidů a glykogenová granula (obr. 1). Mezi vnější a vnitřní membránou je zevní prostor o velikosti 8-10 nm. Obě mitochondriální membrány se značně liší svou strukturou a složením (Walther, 2009).



Obrázek 1: Stavba mitochondrie u živočichů. (Upraveno dle Frey, 2000)

Vnější membrána je topologicky jednoduchá a liší se tvarem v závislosti na tom, zda je mitochondrie v buňce nebo izolovaná v suspenzi (Mannella, 2006).

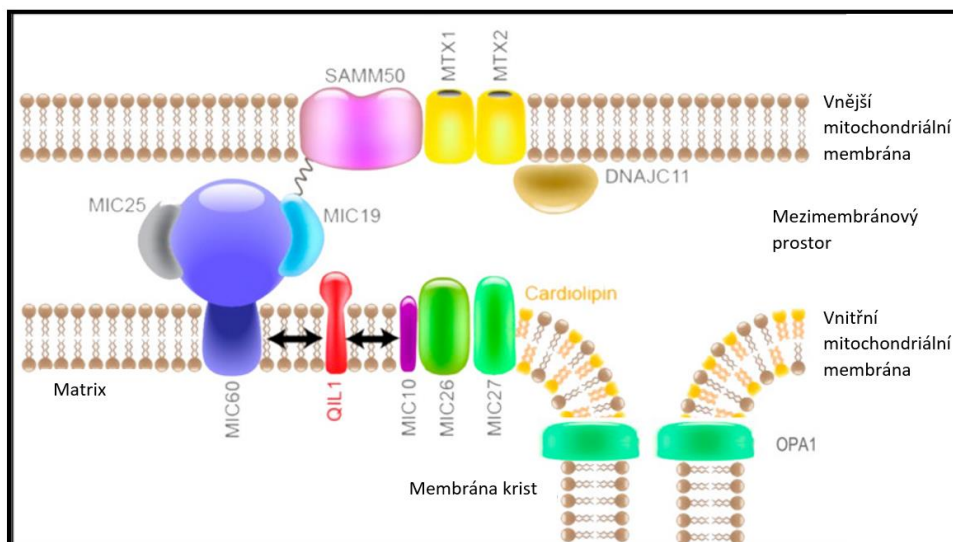
Vnější mitochondriální membrána zprostředkovává četné interakce mezi mitochondriálním metabolickým a genetickým systémem a zbytkem eukaryotické buňky. Obvykle obsahuje 8-10 % všech proteinů organely. Vnější mitochondriální membrána má homogennější strukturu, obsahuje podstatně méně kardiolipinů. Všechny známé proteiny ve vnější membráně jsou kódovány v jádře a syntetizovány na cytosolických ribozomech. (Walther, 2009).

Mezimembránový prostor mitochondrií je uzavřen vnější a vnitřní membránou organely. Vzhledem k tomu, že obě mitochondriální membrány jsou od sebe vzdáleny jen několik nanometrů, je mezimembránový prostor mitochondrií poměrně malým oddílem buňky. Nicméně složky mezimembránového prostoru plní řadu klíčových funkcí v různých procesech, například při transportu proteinů, elektronů nebo iontů kovů, při sestavování proteinů vnitřní membrány, při buněčném dýchání a dalších metabolických procesech. Kromě toho je v mitochondriálním mezimembránovém prostoru sekvestrováno několik apoptotických složek, dokud jejich uvolnění nespustí programovanou buněčnou smrt (Herrmann, 2007).

Vnitřní membrána, která má větší povrch než vnější membrána, obsahuje prvky označované jako kristy (Mannella, 2006). Uvnitř mitochondrií se mohou kristy významně přetvářet v reakci na podněty a stresy prostředí. Například dostupnost energeticky bohatých substrátů moduluje architekturu mitochondriálních krist, což následně řídí sestavování respiračních komplexů a buněčný růst závislý na mitochondriích (Bartolák-Suki, 2017). Vnitřní mitochondriální membrána je aktivním místem pro elektronový transportní řetězec a produkci adenosintrifosfátu (ATP). Interakce mezi fosfolipidy a proteiny je důležitá zejména ve vnitřní mitochondriální membráně. Významnou část proteinů asociovaných s vnitřní membránou tvoří proteiny zapojené do oxidativní fosforylace a jejich aktivita závisí na fosfolipidovém složení membrány. Změny ve složení fosfolipidů mohou ovlivnit mitochondriální dýchání, což je spojeno s řadou lidských onemocnění, jako je například ischemie a srdeční selhání (Schenkel, 2014).

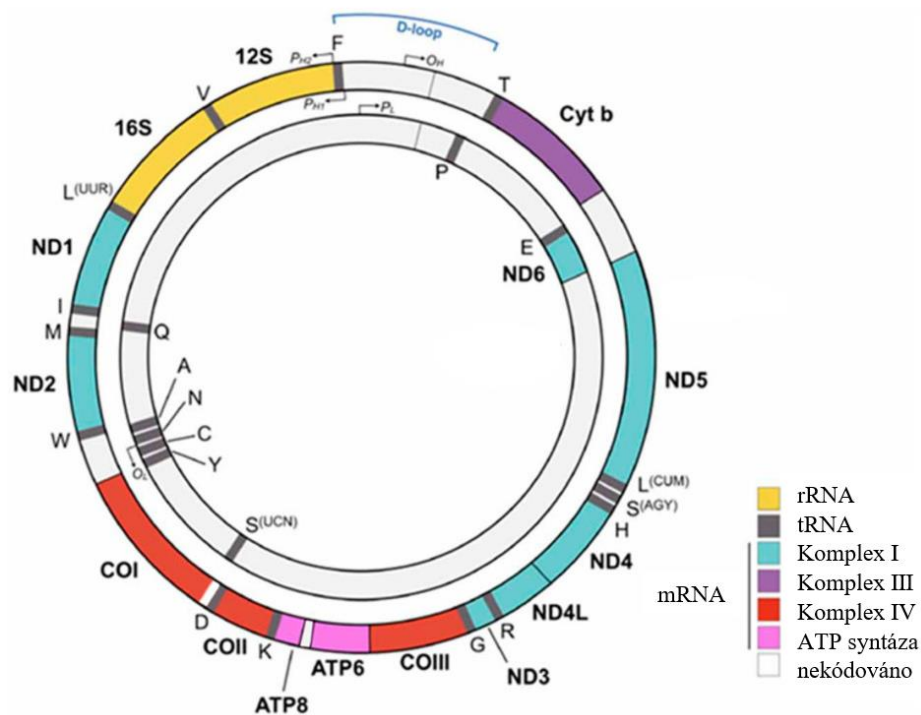
Mitochondrie jsou vnitřně uspořádány do krist, invaginací vnitřní mitochondriální membrány, které se mohou dynamicky reorganizovat v závislosti na různých podnětech, jako jsou změny energetických požadavků nebo apoptotické signály, a stávají se více či méně kompaktními (Cogliati, 2016). Tvorba a udržování těchto struktur je složitý proces, který vyžaduje účast mnoha proteinů, včetně systému mitochondriálního kontaktního místa a systému uspořádání krist (MICOS) a fúzního proteinu atrofie zraku typu 1 (OPA1). MICOS a OPA1 jsou široce spojovány s regulací architektury krist, konkrétně

na křivku junction (*Cogliati, 2016*). Komplex MICOS byl původně charakterizován a z velké části studován u kvasinek, kde se skládá ze šesti podjednotek: Mic10/MINOS1, Mic12/Aim5, Mic19/CHD3, Mic26/ApoO, Mic27/ApoOL a Mic60/Mitofilin. U savců je tento systém složitější a byly popsány další dvě podjednotky: Mic25/CHCHD6 a Mic13/QIL1. Všechny tyto podjednotky jsou transmembránové proteiny, s výjimkou Mic19 a Mic25. Mic60 a Mic10 jsou základními podjednotkami dvou podkomplexů tvořících architekturu MICOS (obr. 2). Z jedné strany se Mic60 přímo dotýká Mic19 a Mic25, zatímco zbývající podjednotky se sdružují s Mic10. Mic10 interaguje s Mic26 a Mic27 a je stabilizován QIL1. Bylo prokázáno, že Mic10 je schopen vyvolat zakřivení membrány i v nepřítomnosti ostatních podjednotek MICOS. Oba podkomplexy jsou nezbytné pro tvorbu a stabilizaci křivky na křivku junction. Modul Mic60/Mic19 je rovněž spojen s vnější mitochondriální membránou. Bylo totiž prokázáno, že Mic19 tvoří můstek mezi Mic60 a podjednotkou SAM50, proteinem vnější membrány, který reguluje import a sestavování β -barevných proteinů (*Protasoni, 2021*), a vytváří tak těsná kontaktní místa vnější a vnitřní mitochondriální membrány. S tímto spojením vnější a vnitřní mitochondriální membrány jsou specificky spojeny i další proteiny, například Metaxin-1 a 2 a DNAJ homolog podrodiny C člen 11 (*Huynen, 2016*). Tyto interakce vytvářejí specifické prostředí uzavřeného přiložení obou membrán příznivé pro import proteinů a transport lipidů a fosfolipidů. Imunoprecipitační experimenty ukazují, že Mic19 i Mic60 interagují s OPA1. OPA1 je protein vnitřní mitochondriální membrány s dvojitou úlohou v dynamice a architektuře mitochondrií, podílí se na mitochondriální fúzi vnitřní membrány a účastní se remodelace křivky. Bylo totiž prokázáno, že OPA1 stojí v čele a je epistatický vůči Mic60 a je jediným regulátorem šířky a průměru a počtu křivky (*Protasoni, 2021*). A konečně se předpokládá, že tvorba okrajů křivky souvisí také s dimerizací ATP syntázy. Dimery komplexu V se totiž nacházejí na vrcholu křivky a při zrušení dimerizace vnitřní mitochondriální membrány ztrácí typickou tubulární organizaci křivky a místo toho vytváří cibulovité struktury, což je typický rys spojený s deregulací MICOS (*Paumard, 2002*).



Obrázek 2: Komplex MICOS v místě spojení krist. (Upraveno dle Protasoni, 2021)

Struktura mtDNA se výrazně liší od struktury jaderné DNA, nicméně podobně jako bakteriální chromozom tvoří mtDNA téměř u všech metazoi uzavřený kruh dvouvláknové DNA. Smysluplné a protismyslné vlákno mtDNA se nazývají těžké a lehké vlákno. V lidských buňkách se mtDNA skládá z 16 569 párů bází a kóduje 37 genů, včetně 13 polypeptidů, dvou ribozomálních RNA (rRNA) a 22 transferových RNA (tRNA). Jeden polypeptid a osm tRNA se nachází na vlákně lehkém a ostatních 12 polypeptidů, dvě rRNA a 14 tRNA jsou kódovány vláknem těžkým. MtDNA obsahuje také nekódující oblast, která se nazývá vytěšňovací smyčka a ukrývá téměř všechny známé replikace a transkripce mtDNA. Třináct polypeptidů je základní podjednotkou komplexů oxidativní fosforylace I, III, IV a V a jsou nezbytné pro její činnost (obr. 3). Mitochondriální rRNA a tRNA představují stroj pro syntézu 13 peptidů (Yan, 2019).



Obrázek 3: Schematické znázornění mitochondriální DNA. Každý gen kódující protein je označen barevným pruhem a všechny geny kódující podjednotky stejného komplexu jsou znázorněny stejnou barvou. rRNA jsou označeny žlutě a tRNA šedě. (Upraveno dle Protasoni, 2021)

2.1.3 Transport proteinu přes mitochondriální membrány

Mechanismy transportu proteinů a iontů přes vnější a vnitřní mitochondriální membrány se v mnoha ohledech liší (Protasoni, 2021). Vnitřní mitochondriální membrána je mnohem méně propustná než vnější membrány a je charakterizována α -helikálními transportními proteiny, jako jsou proteinové translokázy a další přenašeče metabolitů a iontů. Vnější mitochondriální membrány naopak obsahuje proteiny vytvářející kanály, jako jsou β -barrel transmembránové hydrofilní póry, které umožňují průchod prekurzorových proteinů, malých hydrofilních metabolitů a iontů.

Lidská mtDNA obsahuje pouze 37 genů, zatímco se odhaduje, že mitochondriální proteom se skládá přibližně z 1200 proteinů (Sickmann, 2003). V důsledku toho je většina potřebných proteinů kódována jadernými geny, překládána v cytosolu a transportována do organely. Nově syntetizované proteiny nesoucí mitochondriální cílový signál jsou totiž transportovány do vnější mitochondriální membrány pomocí chaperonů a podle povahy jejich signálu mohou být vloženy do vnější mitochondriální membrány, importovány do mitochondriálního mezimembránového prostoru nebo transportovány do vnitřní mitochondriální membrány translokáz. Na vnější mitochondriální membránu zajišťují

transport proteinů dva hlavní komplexy: komplex translokace vnější membrány (TOM) a komplex pro třídění a sestavování beta-barrel proteinů ze strany mezimembránového prostoru do vnější membrány (SAM) (*Protasoni, 2021*). Při vkládání proteinů do vnější mitochondriální membrány se integrální proteiny obsahující jednu nebo více rozpínacích šroubovic neimportují, ale vkládají se do vnější membrány prostřednictvím počáteční interakce s TOM70, zatímco β -barrel proteiny procházejí přes a následně jsou transportovány chaperony do SAM. Hlavní složkou SAM je SAM50, β -barrel protein, který interaguje s novým proteinem, přizpůsobí se jeho skládání a vloží jej laterálně do membrány (*Stroud, 2011*).

Proteiny lokalizované v SAM mohou mít různý osud: mohou projít modifikacemi, které mají stabilizovat protein a zabránit retrográdnímu transportu, například vložení hemové skupiny nebo oxidací cysteinových zbytků za účelem vytvoření disulfidového můstku cestou Mia40. Kromě toho mohou být modifikované proteiny se specifickým cílovým peptidem směřovány do vnitřní mitochondriální membrány nebo matrix prostřednictvím translokázy vnitřní membrány 23 (TIM23).

Proteiny, které mají být vloženy do vnitřní mitochondriální membrány, jsou dopraveny chaperony mezimembránového prostoru TIM9-10 do komplexu vnitřní mitochondriální membrány insertáza/translokáza TIM22, což je hlavní cesta pro import polytopních proteinů vnitřní membrány. Import prostřednictvím TIM22 vyžaduje mitochondriální membránový potenciál, který je zodpovědný za elektroforetický účinek na kladně nabitě cílové sekvence těchto proteinů, ale není řízen ATP. A konečně konzervovaný membránový protein zprostředkovává vkládání jaderných i mitochondriálně kódovaných prekurzorů do vnitřní mitochondriální membrány (*Protasoni, 2021*).

V případě proteinů cílených na matici se na tomto procesu podílí translokáza TIM23 a transport pohánějí tři různé síly: membránový potenciál, zvyšující se afinita prekurzorových proteinů ke složkám na trans straně translokázy ve srovnání s afinitou na cis straně a motorická síla generovaná při hydrolýze ATP chaperonem mtHsp70 a jeho přidruženými podjednotkami (*Demishtein-Zohary, 2017*).

2.1.4 Mitochondriální dynamika

Mitochondrie jsou dynamické organely, které tvoří složitou síť trubicovitých struktur (*Garone, 2018*). Podléhají protichůdným fúzím a štěpením, aby vytvořily

specifickou morfologickou sít' mitochondrií podle energetických potřeb buňky, metabolického stavu buňky nebo aby se přizpůsobily buněčným podnětům. Mitochondriální fúze umožňuje organelám sdílet metabolity, proteiny a mtDNA a hyperfúzní morfologie mitochondrií je spojena s obranným mechanismem, který zvyšuje přežití buňky. Naproti tomu, zatímco fragmentace mitochondrií je často spojována s mitochondriální dysfunkcí a buněčnou smrtí, je tento proces také nutný pro pohyblivost mitochondrií nebo segregaci poškozených částí retikula k degradaci prostřednictvím procesu známého jako mitofagie (*Pickles, 2018*).

Mitochondriální dynamika je řízena proteiny guanosintrifosfatázy (GTPázy) patřícími do rodiny proteinů dynamin, kde hydrolyza GTP vede ke strukturálním změnám, které následně řídí remodelaci membrán (*Kraus, 2017*). Během mitochondriálního dělení dochází k zúžení tubulu a rozštěpení membrány jedné mitochondrie na dvě samostatné organely prostřednictvím náboru cytosolické GTPázy dynamin-related/-like protein 1 do míst kontaktu mitochondrie a endoplazmatického retikula, a to prostřednictvím interakce s fission proteinem 1 a mitochondriálním fission faktorem (*Garone, 2018*). V těchto místech Drp1 oligomerizuje do prstencové struktury a po hydrolyze GTP pohání mitochondriální dělení. Mitochondriální fúze naopak probíhá dvoustupňovým mechanismem, kdy GTPázy mitofusin 1 a 2 lokalizované ve vnější mitochondriální membráně zajišťují fúzi vnější mitochondriální membrány a GTPáza OPA1 zodpovídá za fúzi vnitřní mitochondriální membrány. Tvar a dynamika mitochondrií opět úzce souvisí s jejich bioenergetickým stavem. Selhávající mitochondrie se obvykle jeví jako fragmentované v důsledku převahy štěpného aparátu, zatímco mitochondrie hyperfúzí jako obranný mechanismus proti autofagii v podmínkách stresu, včetně bioenergetického stresu. Kromě toho se vyskytují specifické poruchy některých hlavních aktérů mitochondriálního dělení nebo fúze mohou být spojeny se selháním oxidativní fosforylace a zejména u některých mutací OPA1 s akumulací vícenásobně odstraněných druhů mtDNA a vícenásobnými defekty aktivit komplexu dýchacího řetězce. Kromě své profúzní role působí OPA1 také jako utěšňovač krist junctions a reguluje uspořádané rozmístění komplexů elektronového transportního řetězce podél mitochondriálních krist (*Protasoni, 2021*). Změny v mitodynamice jsou proto v současné době považovány za součást možných příčin nedostatku oxidativní fosforylace a bioenergetického selhání vedoucího k mitochondriálnímu onemocnění.

Mitochondrie se musí v buňce pohybovat a jejich lokalizace je klíčová pro různé funkce, jako je například buněčné dělení (*Frederick, 2007*). Řízený transport

mitochondrií probíhá na mikrotubulárních vláknech, obvykle prostřednictvím motorických proteinů vytvářejících sílu, které jsou klasifikovány do tří rodin: myoziny, kineziny a dyneiny (*Protasoni, 2021*). Milton, syntabulin a GTPáza Miro byly identifikovány jako molekuly specifické pro mitochondrie, které se podílejí na transportu založeném na mikrotubulech (*Frederick, 2007*).

Mitochondriální transport má zásadní význam pro stálý přísun zdravých mitochondrií generujících ATP ve správný čas a na správném místě, zejména v neuronálních buňkách, kde se organely musí pohybovat na dlouhé vzdálenosti podél axonu, od buněčného těla k presynaptickému terminálu (*Zheng, 2019*).

2.1.5 Funkce mitochondrie

Eukaryotické buňky si udržují složitou vnitřní strukturu, aby mohly plnit specializované úkoly, jako je migrace, kontrakce a dělení buněk, a také reagovat na různé chemické a mechanické podněty z prostředí. Všechny tyto činnosti vyžadují energii, která je primárně produkována mitochondriemi. Kromě této ústřední role mitochondrie také řídí apoptózu a přispívají k pufrování vápníku a produkci ROS (*Bartolák-Suki, 2017*).

2.1.5.1 Syntéza ATP

V mitochondriích se nacházejí hlavní enzymatické systémy používané k dokončení oxidace cukrů, tuků a bílkovin za vzniku využitelné energie ve formě ATP. Každý z těchto tří substrátů může být katabolizován na acetylkoenzym A (acetyl-CoA), který pak vstupuje do prvního z těchto procesů: cyklu kyseliny citronové, probíhajícího v mitochondriální matrix. Cukry vstupují do mitochondrií jako pyruvát poté, co prošly glykolýzou v cytosolu. Pyruvátdehydrogenáza usnadňuje jeho přeměnu na acetyl-CoA. Beta oxidace přeměňuje mastné kyseliny na acetyl-CoA uvnitř mitochondrií, zatímco existují různé enzymy pro přeměnu specifických aminokyselin na pyruvát, acetyl-CoA nebo přímo na jednotlivé meziprodukty cyklu kyseliny citronové (*Osellame, 2012*).

V cyklu kyseliny citronové, známém také jako cyklus kyseliny trikarboxylové nebo Krebsův cyklus, se dvouuhlíková acetylová skupina acetyl-CoA přenáší na čtyřuhlíkatý oxaloacetát a vzniká šestiuhlíkatá molekula citrát. V sérii sedmi následných enzymatických kroků je citrát oxidován zpět na oxaloacetát, přičemž přebytečný uhlík je odveden jako dvě molekuly oxidu uhličitého a elektrony odebrané v tomto procesu jsou předány kofaktorům nikotinamidadeninukleotidu (NADH)

a flavinadeninindinukleotidu (FADH₂). Oxaloacetát se nyní může opět účastnit cyklu, zatímco uvolněná volná energie je přenášena NADH a FADH₂ do mitochondriálního elektronového transportního řetězce.

Řetězec pro přenos elektronů, známý také jako dýchací řetězec, se skládá z řady vícesubjednotkových proteinových komplexů zabudovaných do vnitřní mitochondriální membrány. Zde se elektrony odebrané z cyklu kyseliny citronové pomocí NADH a FADH₂ používají k čerpání protonů z matrix do mezimembránového prostoru, čímž vzniká rozdíl potenciálů přes vnitřní mitochondriální membránu. Tento rozdíl potenciálů je nakonec použit k syntéze ATP v posledním kroku oxidativní fosforylace (obr. 4).

NADH přináší volnou energii do elektronového transportního řetězce tím, že se váže na největší z respiračních komplexů, NADH dehydrogenázu neboli komplex I. Tento enzym ve tvaru písmene L obsahuje hydrofobní doménu zabudovanou do vnitřní mitochondriální membrány a hydrofilní rameno vyčnívající do mitochondriální matrix, které obsahuje vazebné místo pro NADH. Celý komplex se skládá ze 45 podjednotek a má hmotnost téměř 1 MDa (*Hüttemann, 2001*). NADH odevzdává dva elektrony, odvedené z cyklu kyseliny citronové, na flavinovou mononukleotidovou prostetickou skupinu obsaženou v hydrofilním rameni komplexu I. Tyto elektrony jsou pak předávány dolů ramenem přes řadu železitých sirných klastrů na redoxní nosič koenzym Q rozpustný v lipidech.

S průchodem elektronů z NADH komplexem je spojena translokace čtyř protonů z matrix přes vnitřní mitochondriální membránu. Nedávné studie komplexu I z *Thermus thermophilus* a *Escherichia coli* poukázaly na mechanismus translokace protonů, kdy přenos elektronů vyvolává konformační změnu hydrofilního ramene. Toto mechanické napětí se pak přenáší na hydrofobní doménu, což způsobuje rekonfiguraci proteinu a s tím spojené čerpání protonů do mezimembránového prostoru (*Efremov, 2010*).

Zatímco NADH musí difundovat do komplexu I, aby mohl přivádět elektrony, které přenáší, do elektronového transportního řetězce, enzym katalyzující redukci FAD na FADH₂ v cyklu kyseliny citronové, sukcinátdehydrogenáza, je sám součástí elektronového transportního řetězce. Tento enzym o velikosti 123 kDa, známý také jako komplex II, je stejně jako komplex I umístěn na vnitřní mitochondriální membráně a obsahuje FAD jako prostetickou skupinu spolu s klastry železa a síry, které napomáhají předávání darovaných elektronů koenzymu Q (*Zhou, 2011*). Tento komplex, který je mezi

komplexy dýchacího řetězce jedinečný tím, že je celý kódován jadernou DNA, neodčerpává z mitochondriální matrix žádné protony.

Koenzym Q, redukovaný buď komplexem I, nebo komplexem II, je schopen volně difundovat vnitřní mitochondriální membránou a odevzdávat své elektrony třetímu komplexu elektronového transportního řetězce, cytochrom c reduktáze. Tento enzym, nejmenší ze čtyř komplexů pro přenos elektronů, oxiduje koenzym Q a uvolněné elektrony předává dvěma molekulám cytochromu c, ve vodě rozpustného redoxního proteinu o hmotnosti 13 kDa, který hraje klíčovou roli i v apoptóze. Dva protony získané oxidací koenzymu Q se ukládají v mezimembránovém prostoru a další dva protony jsou translokovány z mitochondriální matrix (*Osellame, 2012*).

Konečný osud elektronů předaných v řetězci spočívá v přeměně kyslíku na vodu. K tomu dochází v komplexu IV, cytochrom c oxidáze. Čtyři molekuly cytochromu c odevzdávají po jednom elektronu do aktivního místa enzymu železo/měď, kde se pak katalyzuje výroba dvou molekul H_2O z jedné molekuly O_2 . Současně s touto reakcí jsou z mitochondriální matrix do mezimembránového prostoru opět odčerpány čtyři protony (*Liu, 2011*).

Jak elektrony putují elektronovým transportním řetězcem, jejich volná energie klesá spolu s neustálým zvyšováním redoxního potenciálu jejich nosičů, až nakonec skončí u kyslíku s největším redoxním potenciálem ze všech. Energie uvolněná při cestě elektronu po "schodišti" volné energie je zdrojem energie pro termodynamicky nepříznivé čerpání protonů proti jejich koncentračnímu gradientu, ke kterému dochází v komplexech I, III a IV.

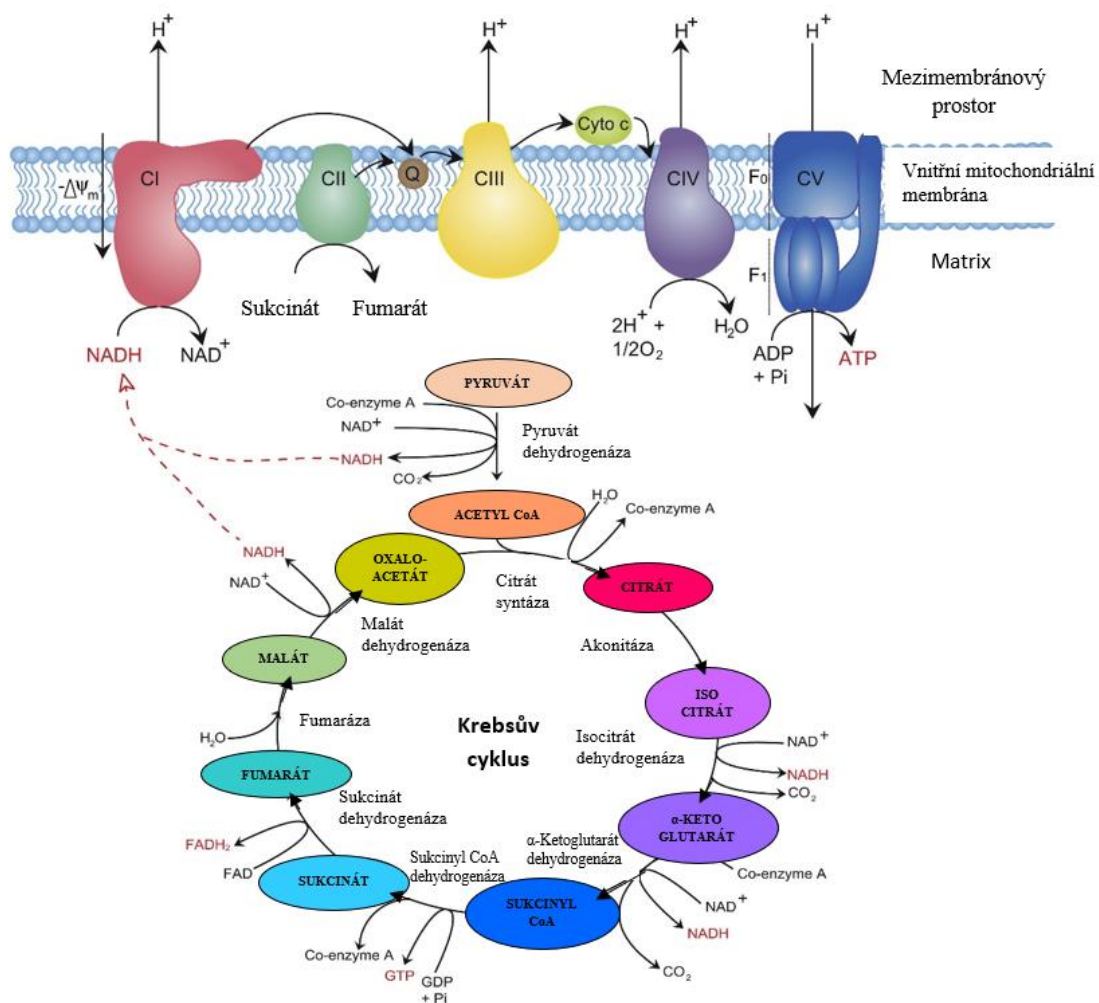
Po cyklu kyseliny citronové a elektronovém transportním řetězci zbývá k přeměně energie uložené v chemických vazbách substrátů na všudypřítomnou "energetickou měnu" ATP už jen spojení tohoto přibližně 200 mV membránového napětí s fosforylací adenosindifosfátu (ADP) (*Osellame, 2012*). Enzymem odpovědným za poslední krok mitochondriální oxidativní fosforylace je ATP syntáza (komplex V). Skládá se ze dvou domén - doména F₀ pokrývá vnitřní mitochondriální membránu, zatímco doména F₁ klesá do mitochondriální matrix - což dalo enzymu alternativní název F₀F₁ adenosintrifosfatáza (ATPáza).

Mechanismus fungování ATP syntázy poprvé prokázali Paul Boyer a John Walker, což vedlo k udělení Nobelovy ceny za chemii v roce 1997 "za objasnění enzymatického mechanismu, který je základem syntézy ATP". V tomto schématu funguje ATP syntáza jako rotační molekulární motor. Prodloužená periferní stopka ukotvuje

hlavu domény F₁ k vnitřní mitochondriální membráně a tvoří tak stator. Transmembránový protonový kanál domény F₀ a asymetrická stopka vyčnívající uvnitř hlavy domény F₁ tvoří rotor. Statická hlava domény F₁ má kvazi trojnásobnou rotační symetrii, přičemž každý prvek obsahuje vazebné místo pro ADP a fosfát. Jak protony deponované v mezimembránovém prostoru elektronovým transportním řetězcem proudí po svém elektrochemickém gradientu přes doménu F₀, rotor se otáčí uvnitř hlavy statoru. Jak rotující stator postupně prochází každým vazebným místem, dochází ke konformačním změnám, které činí kombinaci vázaného ADP a fosfátu na ATP energeticky výhodnou (Nakamoto, 2008). Každé otočení rotoru tak produkuje 3 molekuly ATP.

Odhady počtu protonů, které musí projít ATP syntázou, aby vznikla jedna molekula ATP, se pohybují mezi 2 a 5. Extrapolace tohoto počtu pro určení, kolik molekul NADH nebo FADH₂ je zapotřebí k výrobě jednoho ATP, je obtížná, protože protony mohou unikat přes mitochondriální membrány a rozptylovat svou energii jako teplo. Odvádění protonů z mezimembránového prostoru jinými cestami než ATP syntázou se nazývá odpojování. Odhaduje se, že na jednu molekulu NADH připadají 3 molekuly ATP vzniklé oxidativní fosforylací a na jednu molekulu FADH₂ 2 molekuly ATP. Méně molekul ATP vzniká oxidací FADH₂, protože komplex II nepřenáší žádné protony.

Kromě úniku protonů, který odpojuje membránové napětí od produkce ATP, mohou z komplexů elektronového transportního řetězce unikat elektrony. Předčasný únik elektronů umožňuje jejich přechod přímo na kyslík, místo aby byly předány kyslíku za vzniku vody v komplexu IV, čímž vzniká superoxid. Superoxid je vysoce reaktivní a jako takový je pro buňku vysoce toxický a způsobuje takzvaný "oxidační stres". Oxidační stres se podílí na mnoha patologických stavech, od aterosklerózy a diabetu až po neurodegenerativní onemocnění a rakovinu, a předpokládá se, že hraje významnou roli při stárnutí (Osellame, 2012).



Obrázek 4: Syntéza ATP. Bioenergetika elektronového transportního řetězce a Krebsova cyklu. Komplex I-V (CI-V). (Upraveno dle Osellame, 2012)

2.1.5.2 Reaktivní formy kyslíku

Reaktivní formy kyslíku jsou nedílnou součástí mnoha buněčných drah, které určují odpověď buněk na poruchy buněčné fyziologie, přestože nadměrné nebo nevhodně lokalizované ROS poškozují buňky. ROS fungují jako antimikrobiální efektorové molekuly a jako signální molekuly, které regulují takové procesy, jako je transkripční aktivita nukleárního faktoru kappa, tvorba DNA extracelulárních pastí neutrofilů a autofagie. Hlavními zdroji buněčných ROS jsou mitochondrie a nikotinamidadeninukleotidfosfát oxidázy (NOX) (Dan Dunn, 2015).

Tvorba ROS v mitochondriích je způsobena oxidací metabolických meziproductů elektronového transportního řetězce a je přísně regulována, aby se zabránilo oxidačnímu poškození buněčných procesů. Mitochondriální ROS (mtROS) vzniká v elektronovém transportním řetězci ve formě superoxidu, přičemž za hlavní zdroj je často považován komplex I (Sabharwal, 2014). Přesto je obtížné přiřadit tvorbu mtROS v buňce

ke konkrétnímu komplexu v elektronovém transportní řetězci. Quinlan a spolupracovníci ukázali, že na produkci mtROS se mohou významně podílet komplexy 2-oxokyselinová dehydrogenáza a pyruvátdehydrogenáza (Quinlan, 2014).

Cytosolické ROS, které mají původ v mitochondriích nebo jsou produkovány NOX, mohou stimulovat další produkci ROS prostřednictvím aktivace izoforem proteinkinázy C a kináz rodiny Src, které jsou citlivé na redox. V neutrofilech a endoteliálních buňkách vede aktivace proteinkinázy C a protoonkogen cSrc mtROS po její translokaci do cytosolu k produkci ROS pomocí NOX2. V cévních endoteliálních buňkách bylo zjištěno, že ROS produkované NOX2 v reakci na signalizaci angiotenzinu II způsobují zvýšenou produkci mtROS v návaznosti na aktivaci mitochondriálního ATP-senzitivního K⁺ kanálu zprostředkovanou proteinkinázou C. Je však důležité poznamenat, že NOX4, který může být v reakci na angiotenzin II zvýšeně regulován, se lokalizuje v mitochondriích a může přímo ovlivňovat produkci mtROS.

Hlavními faktory regulace mtROS jsou enzymy odstraňující ROS, které eliminují nadbytečné ROS. Tři Superoxid dismutázy (SOD) usnadňují přeměnu superoxidu na peroxid vodíku. SOD1 se nachází v mezimembránovém prostoru i v cytosolu, SOD2 je zaměřena na mitochondriální matrix a SOD3 je ukotvena v extracelulární matrix (Dan Dunn, 2015). Po přeměně superoxidu na peroxid vodíku provádějí kataláza, peroxiredoxiny a glutathionperoxidázy závěrečný redukční krok, při kterém přeměňují peroxid vodíku na vodu. Kromě své enzymatické aktivity se nedávno ukázalo, že SOD1 působí jako transkripční faktor v reakci na celkové zvýšení buněčných ROS. Po vystavení buněk peroxidu vodíku se SOD1 přemístil do jádra, navázal se na promotory a zvýšil expresi genů zapojených do oxidativní rezistence a reparace (Tsang, 2014).

Změny buď exprese, nebo lokalizace těchto enzymů pravděpodobně moduluji mtROS, a tím regulují různé signální dráhy. Mezi faktory, které se podílejí na této prostorové segregaci, patří napětově závislé aniontové kanály (Dan Dunn, 2015). Protože superoxid je membránově nepropustný, musí buď vznikat přímo v cytosolu, nebo difundovat přes pórový komplex, aby se mohl podílet na buněčné signalizaci nebo mít jakýkoli jiný účinek mimo mitochondrie.

Ačkoli produkce mtROS byla dříve považována za pouhý náhodný vedlejší produkt metabolismu kyslíku v mitochondriích, nyní je jasné, že ROS přispívá k různým signálním drahám (Collins, 2012). V závislosti na kontextu a spouštěcích podnětech může produkce mtROS vést k různým buněčným reakcím, jako je buněčná adaptace na hypoxii, buněčná diferenciaci, autofagie, zánět nebo imunitní odpověď. K nadprodukcí mtROS

může docházet i v nepřítomnosti infekce a je spojována s růstem nádorů a hypertenzí. Zatímco role mitochondrií a mtROS v imunitních reakcích začíná být dobře zdokumentována, mechanistická souvislost mezi imunitní signalizací a produkcí mtROS není dosud jasně objasněna (*Dan Dunn, 2015*).

2.1.5.3 Mitochondriální vápníková signalizace

Mitochondrie neustále komunikují s cytoelem a koordinují rovnováhu mezi energetickými požadavky buňky a produkcí energie oxidativní fosforylací. To je řízeno především prostřednictvím signalizace vápníku mezi cytoelem a matrix. Buněčná signalizace Ca^{2+} je zásadní pro většinu forem buněčných "aktivačních stavů": Ca^{2+} signály řídí většinu procesů, které jsou spojeny se zvýšenými nároky na energii - sekrece, kontrakce, motilita, elektrická excitabilita - všechny tyto procesy vyžadují zvýšené zásobování energií a jsou obvykle spojeny se zvýšením koncentrace cytosolického Ca^{2+} . Mitochondrie exprimují cestu pro příjem Ca^{2+} , mitochondriální vápníkový uniporter, což je Ca^{2+} selektivní kanál ve vnitřní mitochondriální membráně. Vzestup lokální koncentrace cytosolického vápníku podpoří příjem Ca^{2+} v mitochondriích, protože Ca^{2+} se pohybuje po gradientu elektrochemického potenciálu do matrix. Vzestup koncentrace Ca^{2+} v matrixi aktivuje tři rychlost limitující enzymy Krebsova cyklu - pyruvát, α -ketoglutarát a NAD-isocitrát dehydrogenázu. Zdá se, že vzestupem vápníku v matrixi dochází také k regulaci ATP syntázy, i když mechanismus zůstává nejasný. Tyto procesy společně vedou ke zvýšení zásobování dýchacího řetězce NADH, zvýšení respirace a v konečném důsledku ke zvýšení rychlosti syntézy ATP. Vzestup cytosolického vápníku také aktivuje glutamát/aspartátový transportér na vnitřní mitochondriální membráně, čímž se zvyšuje přísun substrátu, což je cesta, která nevyžaduje specifické mitochondriální vychytávání Ca^{2+} , a je tedy nezávislá na bioenergetické kompetenci mitochondrií. Takto tyto cesty spolupracují, aby elegantním a jednoduchým způsobem sladily přísun a potřebu energie. Ve většině buněk je vyplavování Ca^{2+} z mitochondriální matrix řízené výměníkem $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ relativně pomalé, takže změna vápníku v matrixi daleko přesahuje změnu cytosolického vápníku a metabolická odpověď pravděpodobně odpovídá časovému průběhu změny vápníku v matrixi. K vyrovnávání nabídky a poptávky po energii dochází v delším časovém měřítku přinejmenším ve svalech, kde je cvičení spojeno se zvýšením biogeneze mitochondrií zprostředkovaným Ca^{2+} . Aktivita, a tedy zvýšená poptávka po energii, je opět signalizována signály cytosolického vápníku, které interagují prostřednictvím Ca^{2+} / calmodulin-dependentní protein kináza

kináza β , aby aktivovaly peroxizomový proliferátor - aktivovaný receptor gama koaktivátor 1a, a tak vedly ke zvýšení mitochondriální hmoty ve svalech (*Osellame, 2012*).

2.1.5.4 Syntézy hemu

Hem je porfyrin obsahující železo, který je nezbytný v mnoha biologických procesech, jako je přenos a skladování kyslíku, metabolismus léčiv a steroidů, přenos signálu a zpracování mikroRNA. Kromě toho je hem začleněn do některých podjednotek elektronového transportního řetězce a je nezbytný pro buněčné dýchání.

Syntéza této sloučeniny probíhá částečně v mitochondriích i v cytosolu (*Protasoni, 2021*). Hem vzniká vložením železitého železa do tetrapyrrolového makrocyclu protoporfyrinu IX, které katalyzuje enzym mitochondriální matrix, tzv. ferrochelatáza. Protoporfyrin IX se vyrábí z glycinu a sukcinyl-CoA.

Většina produkce hemu probíhá v erytroidních progenitorech, po nichž následují játra pro tvorbu enzymů obsahujících hem (*Ajioka, 2006*). Cesta syntézy je u těchto dvou buněčných typů konzervována, zatímco její regulace se liší. Mechanismus syntézy hemu v játrech má rychlý obrat, aby mohl rychle reagovat na změny metabolických požadavků, zatímco syntéza ve vyvíjejících se červených krvinkách je vázána na dostupnost železa.

2.1.5.5 Syntéza Fe/S klastrů

Klastry železa a síry (Fe/S) jsou prostetické skupiny s různými biologickými funkcemi. Řada enzymů, jako jsou glykosylázy, helikázy, primázy a enzymy dýchacího řetězce, totiž pro svou aktivitu vyžaduje začlenění Fe/S center (*Maio, 2015*). Jak proteiny obsahující tato centra, tak proteiny, které jsou součástí biosyntetického aparátu, jsou vysoce konzervované u prokaryot i eukaryot, což naznačuje důležitou roli při vzniku života. Tyto kofaktory vznikly pravděpodobně v prostředí charakterizovaném nízkým obsahem kyslíku a koevolučně se vyvinuly, když se hladina kyslíku v atmosféře začala zvyšovat, což vedlo k adaptaci anaerobních elektronových transportních řetězců pro aerobní prostředí. Většina Fe/S proteinů obsahuje kosočtverečný $[\text{Fe}_2/\text{S}_2]$, kubický $[\text{Fe}_3/\text{S}_4]$ nebo kubický $[\text{Fe}_4/\text{S}_4]$ klastr. Nejčastějším proteinovým ligandem je cystein, ale vazbu mohou tvořit také histidin, serin a arginin.

U kvasinek probíhá syntéza Fe/S klastrů výhradně v mitochondriích, ale Fe/S klastr může být také exportován z mitochondrií pomocí specifického ABC transportéru

ve vnitřní mitochondriální membráně (*Protasoni, 2021*). Ústředním aktérem syntézní dráhy, který se nachází v eukaryotických mitochondriích, je tzv. enzym pro sestavování klastrů železa a síry, který funguje jako lešení pro počáteční syntézu klastru [2Fe-2S]. Tento klastr bude základem pro tvorbu mitochondriální i cytosolové skupiny Fe/S. Sulfidové ionty používané v tomto procesu se získávají z postranních řetězců cysteinu díky aktivitě enzymů zvaných cystein desulfurázy (*Roche, 2013*), zatímco není jasné, jak je železo dodáváno do enzymu pro sestavování klastrů železa a síry, ačkoli se na tom může podílet frataxin (*Protasoni, 2021*).

2.2 BUNĚČNÁ SMRT

Fyziologické mechanismy buněčné smrti využívají mnohobuněčné organismy k vývoji a morfogenezi, ke kontrole počtu buněk a jako obranou strategii k odstranění infikovaných, zmutovaných nebo poškozených buněk. Buněčná smrt je nutná pro normální vývoj téměř všech mnohobuněčných organismů a běžně zahrnuje produkci nadbytečných buněk a odstranění těch, které jsou postradatelné.

Pokud buňka v organismu odumře v důsledku procesu, který je v tomto organismu zakódován za účelem usmrcení vlastních buněk, lze tuto smrt považovat za fyziologický proces. Velká většina našich buněk je předurčena k tomu, aby zemřela právě takovým mechanismem. Relativně málo jich umírá v důsledku poranění nebo neschopnosti udržet si vlastní životaschopnost. U člověka vzniká každou sekundu asi sto tisíc buněk mitózou a podobný počet jich umírá fyziologickým sebevražedným procesem známým jako apoptóza. Většina buněk vzniklých během embryonálního vývoje savců projde fyziologickou buněčnou smrtí před koncem perinatálního období. Během našeho života projde stejným osudem více než 99,9 % našich buněk (*Vaux, 1999*).

Kdysi se mělo za to, že buněčná smrt je výsledkem jednoho ze dvou odlišných procesů, apoptózy, známé také jako programovaná buněčná smrt (PCD) (*D'arcy, 2019*), která vyžaduje energii (*Tower, 2015*) a nekrózy, nekontrolovatelné buněčné smrti (*D'arcy, 2019*), která energii nevyžaduje (*Tower, 2015*). V posledních letech však bylo objeveno několik dalších forem buněčné smrti, které zdůrazňují, že buňka může zemřít několika různými cestami (*D'arcy, 2019*).

2.2.1 Apoptóza

Kanonicou formou PCD je apoptóza, někdy nazývána PCD typu 1, při níž buňka prochází charakteristickou sérií molekulárních, biochemických a morfologických změn. Prvními viditelnými změnami apoptózy jsou smrštění buňky a kondenzace jádra a chromatinu nazývána pyknóza. Poté následuje fragmentace jádra a chromatinu zvaná karyorexe, krvácení buněčné membrány, a nakonec rozpad buňky na řadu membránových struktur zvaných apoptotická tělíska. Malá velikost apoptotických tělísek usnadňuje jejich pohlcení blízkými makrofágy a dalšími buňkami prostřednictvím fagocytózy, kde se materiál dále rozkládá ve fagolyzosomech a recykluje. Protože se do intersticiálního prostoru neuvolňuje žádný buněčný materiál a pohlcující buňky neuvolňují zánětlivé cytokiny, nedochází k imunitní reakci na apoptózu (*Tower, 2015*).

Při apoptóze spouštějí vnitřní nebo vnější podněty řadu vysoce kontrolovaných reakcí, které vedou k buněčné smrti. Dvě nejdůležitější skupiny proteinů zapojené do apoptózy jsou kaspázy a B-buněčný lymfom 2 (Bcl-2), účastní se všech cest apoptotické buněčné smrti (*Grilo, 2019*).

2.2.1.1 Kaspázy

Kaspázy jsou rodinou endoproteáz, které jsou důležitými články v regulačních sítích řídících zánět a buněčnou smrt. Aktivace těchto enzymů je přísně kontrolována jejich produkcí jako neaktivních zymogenů, které získávají katalytickou aktivitu po signálních událostech podporujících jejich agregaci do dimerů nebo makromolekulárních komplexů. Aktivace apoptotických kaspáz vede k inaktivaci nebo aktivaci substrátů a ke vzniku kaskády signalizačních událostí umožňujících řízenou demolici buněčných složek. Aktivace zánětlivých kaspáz vede k produkci aktivních prozánětlivých cytokinů a podpoře vrozených imunitních reakcí na různé vnitřní a vnější inzulty. Dysregulace kaspáz je základem lidských onemocnění včetně rakoviny a zánětlivých poruch.

Kaspázy jsou endoproteázy, které hydrolyzují peptidové vazby v reakci, která závisí na katalytických zbytcích cysteinu v aktivním místě kaspázy a probíhá pouze po určitých zbytcích kyseliny asparagové v substrátu. Ačkoli zpracování zprostředkované kaspázami může vést k inaktivaci substrátu, může také vytvářet aktivní signální molekuly, které se účastní uspořádaných procesů, jako je apoptóza a zánět. Podle toho byly kaspázy široce klasifikovány podle jejich známých rolí v apoptóze (kaspázy 3, 6, 7,

8 a 9) a v zánětu (kaspázy 1, 4, 5, 12). Funkce kaspáz 2, 10 a 14 jsou hůře zařaditelné. Kaspázy zapojené do apoptózy byly subklasifikovány podle mechanismu svého působení a jsou buď iniciátorové kaspázy (kaspázy 8 a 9), nebo exekuční kaspázy (kaspázy 3, 6 a 7).

Kaspázy se zpočátku vytvářejí jako neaktivní monomerní prokaspázy, které pro aktivaci vyžadují dimerizaci a často i štěpení. Sestavení do dimerů usnadňují různé adaptorové proteiny, které se vážou na specifické oblasti v prodoměně prokaspázy. Přesný mechanismus sestavování závisí na konkrétním adaptéru. Různé kaspázy mají ve svých prodoménách různé domény interakce protein-protein, což jim umožňuje komplexovat se s různými adaptéry. Například kaspázy 1, 2, 4, 5 a 9 obsahují kaspázovou náborovou doménu, zatímco kaspázy 8 a 10 mají doménu efektoru smrti (*Taylor, 2008*).

Iniciační kaspázy aktivují exekuční kaspázy, které následně koordinují svou činnost, aby zničily klíčové strukturální proteiny a aktivovaly další enzymy. Výsledkem jsou morfologické znaky apoptózy, včetně fragmentace DNA a krvácení membrán.

Iniciační kaspázy 8 a 9 normálně existují jako neaktivní monomery prokaspáz, které se aktivují dimerizací, nikoli štěpením. Tento proces je zobecněn jako "model indukované prokaspázy", v němž signální události v horním proudu indukují dimerizaci a aktivaci kaspázy. Dimerizace také usnadňuje autokatalytické štěpení monomerů kaspázy na jednu velkou a jednu malou podjednotku, což vede ke stabilizaci dimeru.

Nevhodné aktivaci exekučních kaspáz 3, 6 a 7 brání jejich produkce jako neaktivních dimerů prokaspáz, které musí být štěpeny iniciačními kaspázami. Toto štěpení mezi velkou a malou podjednotkou umožňuje konformační změnu, která spojí dvě aktivní místa dimeru katetrizační kaspázy a vytvoří funkční zralou proteázu. Po aktivaci může jedna katetrizační kaspáza štěpit a aktivovat další katetrizační kaspázy, což vede ke zrychlené zpětnovazební smyčce aktivace kaspáz (*McIlwain, 2013*).

2.2.1.2 Bcl-2 proteiny

Apoptóza je přísně regulována proteiny rodina Bcl-2, které působí jak na úrovni mitochondrií, tak na úrovni před nimi a integrují signály smrti a přežití. Proteiny Bcl-2 sdílejí různé stupně homologie v rámci čtyř konzervovaných oblastí označovaných jako domény Bcl-2 homologie (BH) 1-4. Na základě funkce je můžeme rozdělit do tří hlavních podtříd. První podtřída zahrnuje antiapoptotické proteiny Bcl-2, B-buněčný lymfom extra velký (Bcl-xL) a indukovaný protein myeloidní leukemické buňky (Mcl-1), které obsahují všechny čtyři domény BH. Druhá podtřída zahrnuje proapoptotické

multidomény Bcl-2 asociovaný X protein (Bax), Bcl-2 homologní antagonist/zabiják (Bak) a Bcl-2 příbuzný zabíjecí protein vaječníků, které obsahují domény BH1, BH2 a BH3. Třetí podtřída zahrnuje proapoptotické členy Bcl-2 spojený agonista buněčné smrti (Bad), Bcl-2 působící na smrt (Bik), Bcl-2 modifikující faktor (Bmf) a p53-upregulovaný modulátor apoptózy (Puma), které mají pouze doménu BH3, jsou to tzv. BH3-only proteiny (Guicciardi, 2013).

Proteiny antiapoptotické podskupiny, Bcl-2, Bcl-xL a Mcl-1, působí na membrány mitochondrií a endoplazmatického retikula, což usnadňuje hydrofobní membránová kotva/cílová doména v blízkosti karboxylového zakončení většiny homologů Bcl-2 a šroubovice (helix 5 a 6 mezi BH1 a BH2), u níž se předpokládá zasunutí do membrán (Basañez, 2008).

Ačkoli většina homologů Bcl-2 inhibuje buněčnou smrt, jedna podskupina je klasifikována jako proapoptotická. Proapoptotický Bax byl poprvé identifikován jako inhibiční vazebný partner Bcl-2. Proapoptotická funkce Bax se aktivuje v reakci na řadu škodlivých událostí uvnitř nebo vně buňky, což způsobuje, že Bax prochází konformačními změnami, membránovou inzercí a oligomerizací a vytváří kanál nebo jinou strukturu v mitochondriální vnější membráně. Všeobecně se předpokládá, že právě tudy cytochrom c opouští mitochondrie a spouští aktivaci kaspáz a buněčnou smrt. Úkolem antiapoptotických proteinů podobných Bcl-2 je inhibovat své proapoptotické partnery, což vedlo k původnímu modelu reostatu, v němž rovnováha mezi protichůdnými antiapoptotickými a proapoptotickými proteiny rodiny Bcl-2 určuje osud buňky. Ačkoli poměr antiapoptotických a proapoptotických proteinů rodiny skutečně obvykle koreluje s osudem buňky, včetně příležitostné interkonverze antiapoptotických a proapoptotických aktivit, existence dalších Bcl-2 interagujících proteinů, identifikace proteinů podobných Bcl-2, které nejsou schopny ovlivnit buněčnou smrt, a rychle rostoucí seznam alternativních neapoptotických funkcí členů rodiny Bcl-2, které mohou mít významný vliv na přežití buněk.

Třetí funkční podskupina trojúhelníku rodiny Bcl-2 je označována jako BH3-only, protože tyto proteiny mají pouze jeden ze čtyř různých BH motivů. Motivy BH jsou 10-20 aminokyselinové oblasti s největší podobností aminokyselinové sekvence napříč členy rodiny, ačkoli identita sekvence BH může být nízká a většina homologů Bcl-2 nemá alespoň jeden motiv BH. Motiv BH3 proapoptotických členů rodiny je nezbytný pro jejich prosmrtné aktivity. Osm proteinů s pouze BH3 má obecně velikost od 100 do 200 aminokyselin a jsou klasifikovány jako členové rodiny Bcl-2 na základě své

schopnosti vázat a inhibovat antiapoptotické proteiny Bcl-2, ačkoli jim chybí významná celková aminokyselinová sekvenční podobnost s proteiny Bcl-2 nebo mezi sebou navzájem. Proteiny obsahující pouze BH3 podporují apoptózu pomocí jedné nebo obou obecných strategií. Buď se vážou a přímo aktivují Bax a Bak, nebo podporují smrt nepřímo tím, že vloží svou šroubovici obsahující BH3 do hydrofobní drážky na specifických antiapoptotických proteinech Bcl-2. Tento trojúhelníkový model dále vysvětluje, že antiapoptotické proteiny Bcl-2, z nichž nejlépe charakterizovaný je Bcl-xL, chrání buňky tím, že vážou a inhibují přímé aktivační proteiny obsahující pouze BH3 a multi-BH proapoptotické proteiny Bax a Bak. Kromě šroubovice BH3 nejsou trojrozměrné struktury proteinů BH3-only vyřešeny, s výjimkou antagonisty smrti interagující s doménou BH3 (Bid), který zaujímá složení podobné Bcl-2, jež je společné pro členy rodiny antiapoptotické i proapoptotické (*Hardwick, 2013*). Předpokládá se tedy, že proteiny obsahující pouze BH3 jsou vnitřně neuspořádané, což pravděpodobně odráží jejich dynamické funkce a podporuje to rozsáhlá práce (*Hinds, 2007*).

Převládající model apoptózy Bcl-2, podle kterého jsou antiapoptotické proteiny inhibovány, když je jejich hluboká vazebná štěrbina obsazena BH3 šroubovicí proapoptotických členů rodiny, je silně podpořen účinky malé molekuly ABT-737, BH3 mimetika navrženého tak, aby obsadilo Bcl-xL žlábek (*Oltersdorf, 2005*). Deriváty ABT-737 jsou v klinických studiích jako protinádorové látky se slibnými prvními výsledky a hledají se další terapeutika specifická pro antiapoptotický Mcl-1, na který ABT-737 necílí (*Hardwick, 2013*).

2.2.1.3 Vnější cesta apoptózy

Vnější signální dráhy, které iniciují apoptózu, zahrnují interakce zprostředkované transmembránovými receptory. Jedná se o receptory smrti, které jsou členy nadrodiny receptorů pro tumor nekrotizující faktor (TNF) (*Locksley, 2001*). Členové rodiny receptorů TNF sdílejí podobné extracelulární domény bohaté na cytein a mají cytoplazmatickou doménu o délce přibližně 80 aminokyselin nazývanou "doména smrti". Tato doména smrti hraje klíčovou roli při přenosu signálu smrti z povrchu buňky do nitrobuněčných signálních drah. K dosud nejlépe charakterizovaným ligandům a odpovídajícím receptorům smrti patří ligand syntetázy mastných kyselin/receptor syntetázy mastných kyselin (FasL/FasR), tumor nekrotizující faktor alfa/tumor nekrotizující faktor receptor 1 (TNF- α /TNFR1), Apo3 ligand/receptor smrti 3 (Apo3L/DR3), Apo2L/DR4 a Apo2L/DR5.

Sled událostí, které definují vnější fázi apoptózy, je nejlépe charakterizován pomocí modelů FasL/FasR a TNF- α /TNFR1. V těchto modelech dochází ke shlukování receptorů a vazbě s homologním trimerním ligandem. Po vazbě ligandu se rekrutují cytoplazmatické adaptorové proteiny, které vykazují odpovídající domény smrti, jež se vážou s receptory. Vazba ligandu Fas na receptor Fas vede k vazbě adaptorového proteinu Fas-asociovaná doména smrti (FADD) a vazba ligandu TNF na receptor TNF vede k vazbě adaptorového proteinu domény smrti spojená s receptorem TNF s nábořem FADD a proteinu interagujícím s receptorem. FADD se poté spojí s prokaspázou 8 prostřednictvím dimerizace domény efektoru smrti. V tomto okamžiku se vytvoří signální komplex vyvolávající smrt, což vede k autokatalytické aktivaci prokaspázy 8.

Jakmile je kaspáza 8 aktivována, spustí se prováděcí fáze apoptózy. Apoptózu zprostředkovanou receptory smrti lze inhibovat proteinem zvaným kaspáza-8 a regulátor apoptózy podobný FADD, který se naváže na FADD a kaspázu 8, čímž je z neúčinní. Další bod potenciální regulace apoptózy zahrnuje protein zvaný Toso, u něhož bylo prokázáno, že blokuje apoptózu vyvolanou Fas v T buňkách prostřednictvím inhibice zpracování kaspázy 8 (Elmore, 2007). Hlavní proteiny vnější dráhy apoptózy s běžnými zkratkami (tab. I).

Tab. I: Proteiny vnější dráhy apoptózy.

Zkratka	Název proteinu
TNF- α	Tumor nekrotizující faktor alfa
TNFR1	Tumor nekrotizující faktor receptor 1
FasL	Ligand syntetázy mastných kyselin
FasR	Receptor syntetázy mastných kyselin
Apo3L	Apo3 ligand
DR3	Receptor smrti 3
Apo2L	Apo2 ligand
DR4	Receptor smrti 4
DR5	Receptor smrti 5
FADD	Fas-asociovaná doména smrti
TRADD	Doména smrti spojená s receptorem TNF
RIP	Protein interagující s receptorem
DED	Doména efektoru smrti
Kaspáza-8	Cysteinylní asparagová kyselina-proteáza 8

2.2.1.4 Vnitřní cesta apoptózy

Intrinsické signální dráhy, které iniciují apoptózu, zahrnují rozmanitou škálu nereceptorových podnětů, které vytvářejí intracelulární signály působící přímo na cíle v buňce a jsou iniciovány mitochondriemi. Podněty, které iniciují intrinsickou dráhu, vytvářejí intracelulární signály, které mohou působit buď pozitivně, nebo negativně. Negativní signály zahrnují absenci určitých růstových faktorů, hormonů a cytokinů, které mohou vést k selhání potlačení programů smrti, a tím ke spuštění apoptózy. Jinými slovy, dochází k vysazení faktorů, ztrátě apoptotické suprese a následné aktivaci apoptózy. Mezi další podněty, které působí pozitivně, patří mimo jiné záření, toxiny, hypoxie, hypertermie, virové infekce a volné radikály.

Všechny tyto podněty způsobují změny ve vnitřní mitochondriální membráně, které vedou k otevření póru mitochondriálního přechodu propustnosti, ztrátě mitochondriálního transmembránového potenciálu a uvolnění dvou hlavních skupin normálně sekvestrovaných proapoptotických proteinů z mezimembránového prostoru do cytosolu (*Saelens, 2004*). První skupinu tvoří cytochrom c, druhý mitochondriální aktivátor kaspáz a serinová proteáza HtrA2/Omi. Tyto proteiny aktivují mitochondriální dráhu závislou na kaspáze. Cytochrom c se váže a aktivuje apoptotický proteázový aktivační faktor 1 i prokaspázu 9, čímž vzniká "apoptosom".

Shlukování prokaspázy 9 tímto způsobem vede k aktivaci kaspázy 9. Uvádí se, že druhý mitochondriální aktivátor kaspáz HtrA2/Omi podporují apoptózu tím, že inhibují aktivitu inhibitorů proteinů apoptózy (IAP). Byly také identifikovány další mitochondriální proteiny, které interagují s IAP a potlačují jejich působení, avšak experimenty s vyřazením genů naznačují, že samotná vazba na IAP nemusí být dostatečným důkazem pro označení mitochondriálního proteinu jako "proapoptotického" (*Ekert, 2005*).

Druhá skupina proapoptotických proteinů, faktor indukující apoptózu, endonukleáza G a kaspázou aktivovaná DNAsa, se uvolňuje z mitochondrií během apoptózy, ale jedná se o pozdní událost, ke které dochází až poté, co se buňka rozhodla k zániku. Faktor indukující apoptózu se přemísťuje do jádra a způsobuje fragmentaci DNA na ~50-300 kb kousky a kondenzaci periferního jaderného chromatinu (*Joza, 2001*). Tato časná forma jaderné kondenzace se označuje jako kondenzace "fáze I". Endonukleáza G se také přemísťuje do jádra, kde štěpí jaderný chromatin za vzniku oligonukleozomálních fragmentů DNA. Faktor indukující apoptózu i endonukleáza G fungují způsobem nezávislým na kaspáze. Kaspázou aktivovaná DNAsa se následně

uvolňuje z mitochondrií a přemísťuje se do jádra, kde po štěpení kaspázou 3 vede k fragmentaci oligonukleozomální DNA a výraznější a pokročilejší kondenzaci chromatinu. Tato pozdější a výraznější kondenzace chromatinu se označuje jako kondenzace "fáze II".

Kontrola a regulace těchto apoptotických mitochondriálních dějů probíhá prostřednictvím členů rodiny proteinů Bcl-2. Nádorový supresorový protein p53 hraje v regulaci rodiny proteinů Bcl-2 zásadní roli, přesné mechanismy však dosud nebyly zcela objasněny. Rodina proteinů Bcl-2 reguluje propustnost mitochondriální membrány a může být buď proapoptotická, nebo anti-apoptotická. Dosud bylo v rodině Bcl-2 identifikováno celkem 25 genů. Mezi antiapoptotické proteiny patří Bcl-2, Bcl-2 podobný protein 1, Bcl-xL, B-buněčný lymfom extra malý, Bcl-2 podobný protein 2, Bcl-2 asociovaný atanogen a mezi proapoptotické proteiny patří B-buněčný lymfom protein 10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bcl-2 podobný protein 11, Bik a zabijácký protein podobný Bik. Tyto proteiny mají zvláštní význam, protože mohou rozhodnout, zda se buňka zaváže k apoptóze, nebo proces přeruší. Předpokládá se, že hlavním mechanismem účinku proteinů rodiny Bcl-2 je regulace uvolňování cytochromu c z mitochondrií prostřednictvím změny propustnosti mitochondriální membrány.

Bylo zkoumáno několik možných mechanismů, ale žádný nebyl definitivně prokázán. Poškození mitochondrií v cestě Fas apoptózy je zprostředkováno štěpením Bid kaspázou 8. Jedná se o jeden z příkladů "cross-talk" mezi cestou receptorů smrti (vnější) a mitochondriální (vnitřní) cestou. Serinová fosforylace Bad je spojena s 14-3-3, členem rodiny multifunkčních fosfoserinových vazebných molekul. Když je Bad fosforylován, je zachycen 14-3-3 a sekvestrován v cytosolu, ale jakmile je Bad odfosforylován, přemístí se do mitochondrií a uvolní cytochrom c.

Bad může také heterodimerizovat s Bcl-xL nebo Bcl-2, čímž neutralizuje jejich ochranný účinek a podporuje buněčnou smrt. Pokud nejsou sekvestrovány Bad, Bcl-2 i Bcl-xL inhibují uvolňování cytochromu c z mitochondrií, ačkoli mechanismus není dobře znám. Zprávy naznačují, že Bcl-2 a Bcl-xL inhibují apoptotickou smrt především kontrolou aktivace kaspázových proteáz (*Elmore, 2007*). Zdá se, že další protein označovaný jako "Aven" váže jak Bcl-xL, tak apoptotický proteázový aktivační faktor 1, čímž zabraňuje aktivaci prokaspázy 9. Existují důkazy, že nadměrná exprese jednoho z proteinů Bcl-2 nebo Bcl-xL snižuje regulaci druhého, což naznačuje vzájemnou regulaci mezi těmito dvěma proteiny.

Puma a protein 1 indukovaný forbol-12-myristátem-13-acetátem (Noxa) jsou dva členové rodiny Bcl-2, kteří se rovněž podílejí na proapoptóze. Puma hraje důležitou roli v apoptóze zprostředkované p53. Bylo prokázáno, že in vitro je nadměrná exprese Pumpy doprovázena zvýšenou expresí Bax, konformační změnou Bax, translokací do mitochondrií, uvolněním cytochromu c a snížením mitochondriálního membránového potenciálu (Liu, 2003). Noxa je také kandidátním mediátorem apoptózy vyvolané p53. Studie ukazují, že tento protein se může lokalizovat v mitochondriích a interagovat s antiapoptotickými členy rodiny Bcl-2, což vede k aktivaci kaspázy 9. Vzhledem k tomu, že Puma i Noxa jsou indukovány p53, mohou zprostředkovávat apoptózu, která je vyvolána genotoxickým poškozením nebo aktivací onkogenu. Bylo také zjištěno, že onkoprotein Myc potencuje apoptózu jak mechanismy závislémi na p53, tak i nezávislémi (Meyer, 2006). Hlavní proteiny vnitřní dráhy apoptózy s běžnými zkratkami (tab. II).

Tab. II: Proteiny vnitřní dráhy apoptózy.

Zkratka	Název proteinu
Smac/DIABLO	Druhý mitochondriální aktivátor kaspáz/přímý protein vázající IAP s nízkým PI
HtrA2/Omi	Serinová proteáza Omi protein A2
IAP	Inhibitor apoptózy
Apaf-1	Apoptotický proteázový aktivační faktor 1
Kaspáza-9	Cysteinyl-asparagová kyselina-proteáza-9
AIF	Faktor indukující apoptózu
CAD	Kaspázou aktivovaná DNAsa
Bcl-2	B-buněčný lymfom 2
Bcl-x	Bcl-2 podobný protein 1
Bcl-xL	B-buněčný lymfom extra velký
Bcl-xS	B-buněčný lymfom extra malý
Bcl-w	Bcl-2 podobný protein 2
Bag	Bcl-2 asociovaný atagen
Bcl-10	B-buněčný lymfom protein 10
Bax	Bcl-2 asociovaný X protein
Bak	Bcl-2 homologní antagonist/zabiják
Bid	Agonista smrti interagující s doménou BH3

Bad	Bcl-2 asociovaný agonista buněčné smrti
Bim	Bcl-2 podobný protein 11
Bik	Bcl-2 působící na smrt
Blk	Zabijácký protein podobný Bik
Puma	p53-upregulovaný modulátor apoptózy
Noxa	Protein 1 indukovaný forbol-12-myristátem-13-acetátem
14-3-3	Aktivační protein tyrozin 3-monooxygenázy/tryptofan 5-monooxygenázy
Aven	Regulátor buněčné smrti Aven
Myc	Onkogen Myc

2.2.2 Nekróza

Nekróza je považována za náhodnou a nekontrolovatelnou buněčnou smrt, která je často spojována s poruchami, například střevní ischemie, infarkt a poškození neurogenerace. Během nekrózy dochází k nabobtnání a rozpadu buněk a organel s následným uvolněním buněčného obsahu do mikroprostředí, což vyvolává zánětlivou reakci. Společnými aktéry nekrotické smrti jsou vápník, který způsobuje přetížení mitochondriálního vápníku, bioenergetické účinky a aktivaci proteáz, fosfolipáz a reaktivních forem kyslíku, které způsobují dysfunkci mitochondrií, deregulaci iontové rovnováhy a ztrátu integrity membrán (*Negróni, 2015*).

Mitochondrie řídí nekrózu především svým vlivem na hladinu ATP v buňce. TNF hraje důležitou roli při indukci nekrózy, protože ovlivňuje také produkci mitochondriálních ROS. TNF také indukuje aktivaci Poly[ADP-ribóza]polymerázy 1, pravděpodobně prostřednictvím mitochondriálních ROS, které způsobují poškození DNA, což vede k vyčerpání ATP a následné nekróze. Poly[ADP-ribóza]polymeráza 1 je jaderný enzym, který se podílí na opravách DNA, stabilitě DNA a regulaci transkripce a aktivuje se při poškození DNA. Jeho inhibice v buňkách vystavených genotoxickým faktorům vede ke snížení rychlosti oprav DNA a ke zvýšení ROS. Nadměrná aktivace Poly[ADP-ribóza]polymerázy 1 spotřebovává velké množství NAD⁺, což vede k masivnímu vyčerpání ATP. Intracelulární hladina ATP může ovlivnit formu buněčné smrti, vysoká hladina ATP vede k apoptóze, zatímco nízká hladina ATP vede k nekróze, což znamená, že intracelulární vyčerpání ATP přepne energeticky závislou apoptotickou buněčnou smrt na nekrózu (*Chaabane, 2013*).

2.3 MITOPTÓZA

Apoptotické změny uvnitř mitochondrií se nazývají mitoptóza neboli program smrti postihující mitochondrie, je to charakteristický proces rozpadu mitochondrií, který může doprovázet apoptózu nebo autofagii. Tento proces je popisován především na základě morfologických znaků. Po indukci mitoptózy a současném přerušení zásobování mitochondrií ATP často následuje aktivace autofagie, která má zajistit zachování zásobování energií.

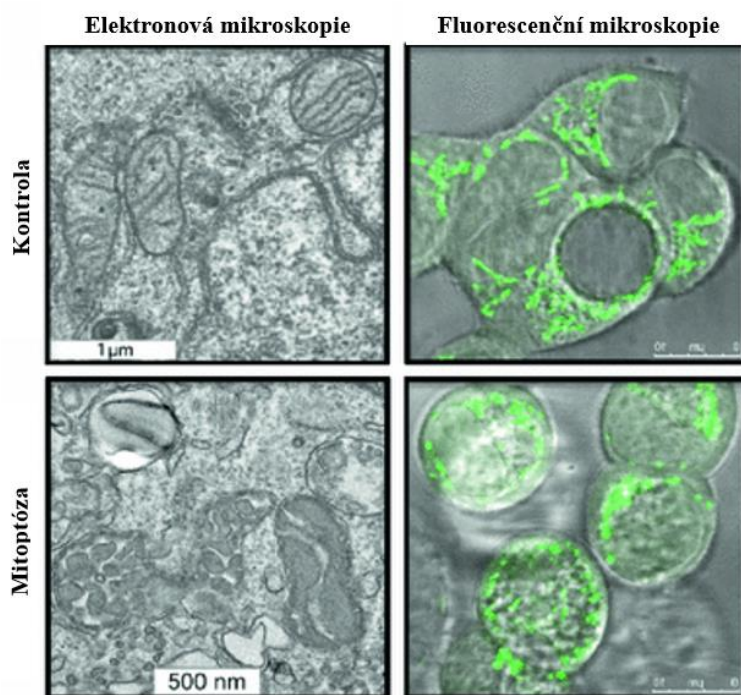
Mitoptóza může mít různou podobu, buď může dojít k mitoptóze vnitřní membrány nebo vnější membrány. Často jsme pozorovali třetí, smíšenou formu mitoptózy, při níž dochází ke kondenzaci mitochondrií, po níž následuje bobtnání a vezikulární fragmentace krist, jako u mitoptózy vnější mitochondriální membrány. Místo narušení vnější mitochondriální membrány však dochází k pohlcení mitochondrií autofagozomy. Osud degradovaných mitochondrií se může lišit. Degradované mitochondrie mohou buď skončit v autofagozomech nebo mohou být mitoptotická tělíska vytlačena z buňky.

2.3.1 Mitoptóza vnitřní mitochondriální membrány

Při mitoptóze vnitřní membrány je degradována pouze vnitřní matrix a kristy, zatímco vnější mitochondriální obal zůstává nezměněn. Během mitoptózy vnitřní mitochondriální membrány dochází k poškození krist. Začíná to koalescencí, následuje řídnutí neboli ztráta hustoty matrix, a nakonec končí degradací krist.

2.3.2 Mitoptóza vnější mitochondriální membrány

Druhou možností je, že může dojít k mitoptóze vnější mitochondriální membrány, kdy jsou jako zbytky detekovány pouze nabobtnalé vnitřní kristy. Během mitoptózy dochází ke kondenzaci mitochondrií, následované bobtnáním a fragmentací krist a nakonec vnější mitochondriální membrána praskne a vezikulární zbytky krist se vznášejí v cytoplazmě. Bobtnání mitochondrií bylo možná detekovat i na úrovni fluorescenční mikroskopie, a to při vyšším rozlišení, kdy se místo typického protáhlého fazolovitého tvaru jeví mitochondrie jako kulaté a nabobtnalé (obr. 5), než se rozpadnou (*Chaabane, 2013*).



Obrázek 5: Mitoptóza vnější mitochondriální membrány. Vlevo nahoře normální mitochondrie, vlevo dole mitoptotické mitochondrie po ošetření salinomycinem. Vpravo nahoře buňky ukazují normální, protáhlé mitochondrie, vpravo dole buňky ukazují zduřelé, kulaté mitochondrie po léčbě salinomycinem. (*Upraveno dle Chaabane, 2013*)

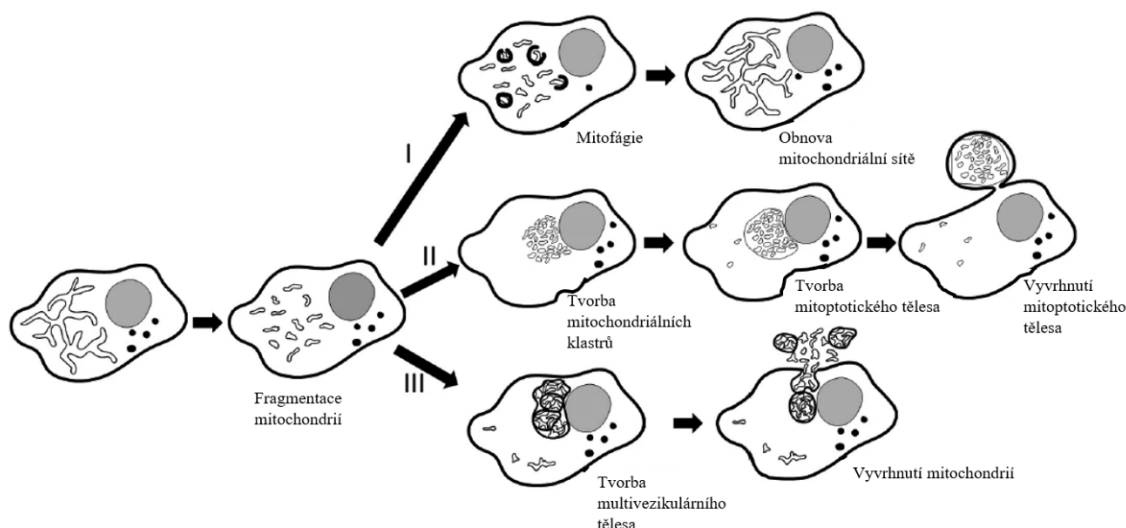
2.3.3 Mechanismy spojené s uvolňováním mitochondrií z buňky

2.3.3.1 Mitoptóza vyvolaná odpojením oxidativní fosforylace

Hlavní funkcí mitochondrií je tvorba ATP při oxidativní fosforylaci. Pro syntézu ATP je rozdíl elektrochemických protonových potenciálů na vnitřní mitochondriální membráně udržován na úrovni nejméně 180 mV v důsledku oxidace substrátů dýchacího řetězce. Pokles membránového potenciálu slouží buňce jako signál k zahájení opravy mitochondrií nebo k jejich likvidaci, a to bez ohledu na pokles buněčného ATP. V experimentech se rozptýlu membránového potenciálu obvykle dosahuje pomocí protonoforů, rozpojovačů oxidativní fosforylace, jako je p-(trifluoromethoxy) fenylhydrazon karbonylkyanid, p-(trichlormethoxy) fenylhydrazon karbonylkyanid nebo 2,4-dinitrofenol. P-(trifluoromethoxy) fenylhydrazon karbonylkyanid nebo 2,4-dinitrofenol v kombinaci s inhibitory dýchacího řetězce myxothiazolem nebo antimycinem vyvolávají oxidační stres a rychlou fragmentaci mitochondrií, ale nikoli smrt buněk. Energetika buněk za těchto podmínek byla podporována glykolýzou. Po inkubaci část buněk odumřela a přeživší buňky prakticky neobsahovaly mitochondrie (*Lyamzaev, 2020*).

Eliminace mitochondrií začala jejich fragmentací, poté se fragmentované mitochondrie shromáždily kolem jádra a vytvořily husté shluky. Dále byly tyto shluky obklopeny membránou a vytvořily mitoptotické tělísko, které bylo v konečné fázi vyvrženo z buňky do mezibuněčného prostoru (*Lyamzaev, 2008*) (obr. 6). Sestavování klastrů v tomto modelu nebylo závislé na mikrotubulech ani na aktinovém cytoskeletu. Je možné, že sestavování klastrů závisí na intermediárních filamentech, která řídí mobilitu mitochondrií v cytoplazmě (*Lyamzaev, 2020*). Klastry se často shlukovaly v blízkosti jádra v oblasti typické pro sestavování agregátů denaturovaných proteinů, mechanismy agregace a následné eliminace však byly u mitochondrií a denaturovaných proteinů odlišné. Je známo, že pro sestavování agregátů jsou nezbytné mikrotubuly (*Kopito, 2000*). Shlukování mitochondrií bylo pozorováno v některých modelech apoptózy a záviselo na pohybu podél mikrotubulů díky aktivitě dyneinu, který zůstával aktivní, zatímco kinezin, zodpovědný za pohyb k periferii, byl inaktivován (*Lyamzaev, 2020*). Fragmentace mitochondrií, jejich shlukování, tvorba mitoptotických tělísek a jejich uvolňování z buňky způsobené kombinovaným působením odpojovačů a inhibitorů dýchání nezávisí na aktivitě kaspáz. Buňky, u nichž byla pozorována úplná eliminace mitochondrií, navíc nevykazovaly známky apoptózy: chromatin nebyl kondenzovaný a na povrchu nebyl obnažen fosfatidylserin (*Lyamzaev, 2008*). Shlukování mitochondrií v perinukleární oblasti bylo pozorováno také při oxidačním stresu, během tepelného šoku a při infekci virovým proteinem bez známek apoptózy.

V konečné fázi mitoptózy bylo mitoptotické tělísko vyvrženo z buňky. U některých buněk bylo možné pozorovat mitoptotické tělísko ve výběžku plazmatické membrány, které připomínalo "bleb" charakteristický pro apoptózu (obr. 6, varianta II). Mitoptotická tělíska obklopená membránou byla pozorována v extracelulárním médiu podobně, jako tomu je při apoptóze. Zároveň na rozdíl od apoptotických tělísek neobsahovala mitoptotická tělíska jadernou DNA a jejich vznik byl nezávislý na aktivitě kaspáz. V některých buňkách se membrána mitoptotického tělíska spojila s plazmatickou membránou a exocytózou se uvolnily mitochondriální vezikuly (obr. 6, varianta III). Tento mechanismus se podobal uvolňování exozomů při exocytóze multivesikulárních tělísek (*Lyamzaev, 2020*).



Obrázek 6: Různé mechanismy mitoptóza. (Upraveno dle Lyamzaev, 2020).

2.3.3.2 Mitoptóza a apoptóza

Mitochondrie jsou jednou z hlavních složek signalizační kaskády při apoptóze. Fragmentace mitochondrií během apoptózy je pravděpodobně jednou z nejranějších reakcí buňky na stres, která zabraňuje globální depolarizaci mitochondrií propojených do jedné sítě. Později apoptóza probíhá v důsledku uvolnění řady proteinů, zejména cytochromu c, z mezimembránového prostoru mitochondrií, které se podílejí na aktivaci kaspáz. Pokud z nějakého důvodu k aktivaci kaspáz nedojde, mohou mitochondrie obnovit svou funkčnost (Bota, 2005). Pokud mitochondrie obnovit nelze, dochází k eliminaci defektních organel (Lyamzaev, 2020).

2.3.3.3 Mitoptóza indukována mediátory zánětu

Mitoptóza včetně uvolňování mitochondrií z buněk by mohla hrát důležitou roli v patogenezi zánětlivých a autoimunitních onemocnění. Přítomnost mitochondriálních složek a odpovídajících autoprotilátek v krvi je charakteristická pro mnoho zánětlivých patologií (Lood, 2016).

Uvolňování mitochondrií indukované prozánětlivým cytokinem TNF u fibroblastů s geneticky nadměrně stimulovanou apoptotickou signalizací. Pozorována fragmentace mitochondrií a jejich zachycení do jednovrstevných vakuol, které se vytvořily z plazmatické membrány. Ukázalo se, že tento proces závisí na cytoskeletu a není inhibován inhibitory autofagie. Vakuoly v tomto modelu splynuly s plazmatickou membránou a v extracelulárním prostředí se objevily "nahé" mitochondrie.

Lymfocyty mohou sloužit jako další zdroj extracelulárních mitochondriálních komponent během zánětu. Při apoptóze v T-buňkách vyvolané ligandem Fas byly pozorovány různé formy degradace mitochondrií: fragmenty krist s kondenzovanou matrix, ale bez vnější membrány, "stíny" mitochondrií zbavené vnitřní membrány a matrix a mitochondrie v autofagozomech. V tomto modelu degradaci mitochondrií předcházelo jejich "smíchání" se sekrečními vezikulami Golgiho aparátu, (*Ouasti, 2007*) což naznačuje možnost sekrece mitochondriálních komponent. Rychlé masivní uvolnění mtDNA bylo pozorováno u B-lymfocytů a T-lymfocytů a také u přirozených zabíječských buněk v reakci na oligodeoxynukleotidy. Současně nebyly u ošetřených lymfocytů zjištěny žádné známky nekrózy, apoptózy nebo nekroptózy a autofagie nebyla aktivována. MtDNA uvolněná z lymfocytů interaguje s mononukleárními buňkami periferní krve a stimuluje produkci antivirového interferonu typu I, což naznačuje, že se na antivirové obraně může podílet mitoptóza (*Ingelsson, 2018*).

2.3.4 Mitoptóza spojená s likvidací mitochondrií uvnitř buňky

2.3.4.1 Mitoptóza při terminální diferenciaci

Hlavním mechanismem eliminace mitochondrií z buňky je jejich selektivní autofagie - mitofagie (obr. 6, varianta I). Tento mechanismus využívá hlavní složky neselektivní makroautofagie, ale s pomocí různých adaptorových proteinů rozpoznává poškozené mitochondrie a směřuje je do autofagozomů a dále do autolyzozomů. Nejdůkladněji prozkoumaný je mitochondriální systém kontroly kvality založený na proteinech PTEN-indukovaná kináza 1/Parkin (*Tanaka, 2020*). Snížení membránového potenciálu mitochondrií brání transportu proteinkinázy PTEN-indukovaná kináza 1 do mitochondriální matrix a její degradaci, což vede k jejímu vystavení na vnějším povrchu mitochondrií a navázání ubikvitinové ligázy Parkin. Ubikvitinace mitochondriálních proteinů Parkinem slouží jako signál pro vychytávání mitochondrií autofagosomem. Kromě PTEN-indukované kinázy 1/Parkin dependentní mitofágie mohou být za podmínek hypoxie nebo oxidačního stresu spuštěny alternativní varianty selektivní mitofágie za účasti adaptorových proteinů (*Liu, 2014*). Hlavním účelem mitofágie je nepochybně kontrola kvality mitochondrií eliminací poškozených organel. Zároveň se mitofágie podílí na masivní destrukci mitochondrií při některých formách terminální diferenciaci a při přestavbě metabolismu.

Nejznámější je mitoptóza během erythropoézy. V krvetvorných orgánech dochází k enukleaci prekurzorů erytroblastů s tvorbou retikulocytů, které jsou následně zbaveny mitochondrií a diferencují se v erytrocyty. Diferenciace retikulocytů ukázaly, že nejprve se v blízkosti mitochondrií shromáždily membránové vezikuly neznámého původu, poté vezikuly splynuly a obklopily mitochondrie dvouvrstvou membránou. Tento proces je velmi podobný autofagii. Zároveň bylo pozorováno uvolnění mitochondrií z buňky po splnutí okolní membrány s plazmatickou membránou.

2.3.4.2 Mitoptóza a metabolická přestavba

Existují případy, kdy diferenciace a fungování buněk závisí na přestavbě metabolismu spojené s mitoptózou. U kvasinek tak byla aktivována mitofágie při deficitu dusíku a glukózy a byl pozorován významný pokles obsahu mitochondrií (*Lyamzaev, 2020*). V tomto případě jsou mitochondriální proteiny štěpeny a slouží jako zdroj dusíku pro syntézu nukleotidů. K restrukturalizaci energetického metabolismu z oxidativního na glykolytický by mohlo dojít také za účasti mitoptózy. Závislost buněčného osudu na metabolické přestavbě a mitoptóze se nejzřetelněji projevuje v případě kmenových buněk. Embryonální i hematopoetické kmenové buňky mají nízký obsah mitochondrií a jejich metabolismus je zcela závislý na glykolýze. V druhém případě takový stav odpovídá hypoxii charakteristické pro hematopoetickou niku a udržuje se díky aktivní mitofágii (*Joshi, 2014*). Závislost "kmenovosti" na obsahu mitochondrií se projevuje v tom, že přeprogramování somatických buněk na pluripotentní závisí na mitofágii. Zajímavé je, že u kvasinek přechod na glykolytický metabolismus spojený se snížením obsahu mitochondrií nezávisí na eliminaci mitochondrií, ale na snížení exprese mitochondriálních proteinů.

Glykolýza poskytuje buňce mnohem rychlejší, i když méně účinný přísun energie. To je důležité pro rychle se dělící buňky, avšak jak nádorové buňky, tak aktivované T-lymfocyty si zachovávají vysoký obsah mitochondrií. Mitoptóza tedy není jediným možným mechanismem metabolické přestavby (*Lyamzaev, 2020*).

2.4 MITOCHONDRIÁLNÍ ONEMOCNĚNÍ

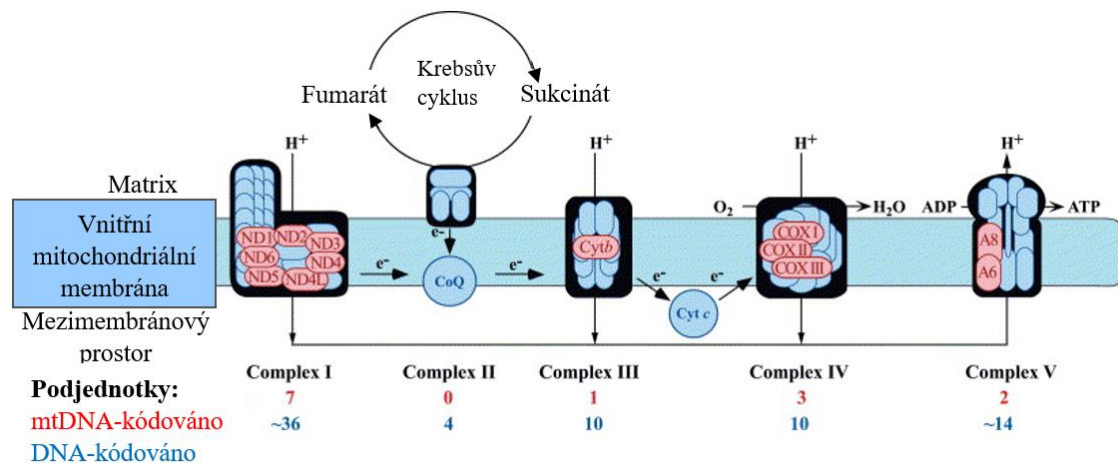
Termínem mitochondriální onemocnění se obvykle označují poruchy mitochondriálního dýchacího řetězce, což je jediná metabolická dráha v buňce, která je pod dvojitou kontrolou mitochondriálního genomu a jaderného genomu. Genetická

klasifikace mitochondriálních onemocnění proto rozlišuje poruchy způsobené mutacemi v mtDNA, které se řídí relativně volnými pravidly mitochondriální genetiky, a poruchy způsobené mutacemi v DNA, které se řídí přísnějšími pravidly mendelovské genetiky.

Mutace v mtDNA lze rozdělit na ty, které narušují syntézu mitochondriálních proteinů jako celek, a na ty, které postihují některou ze 13 podjednotek dýchacího řetězce kódovaných mtDNA. Poruchy způsobené mutacemi v DNA jsou hojnější nejen proto, že většina podjednotek dýchacího řetězce je kódována jádrem, ale také proto, že správné sestavení a fungování dýchacího řetězce vyžaduje řadu kroků, z nichž všechny jsou pod kontrolou DNA. Mezi tyto kroky a související onemocnění patří, syntéza montážních proteinů, intergenomová signalizace, mitochondriální import proteinů kódovaných DNA, syntéza fosfolipidů vnitřní mitochondriální membrány, mitochondriální motilita a dělení.

2.4.1 Onemocnění způsobená mutacemi v mtDNA

Z přibližně 80 proteinů, které tvoří dýchací řetězec, je 13 kódováno mtDNA a všechny ostatní jsou kódovány DNA. Komplex II, koenzym Q a cytochrom c jsou kódovány výhradně DNA. Naproti tomu komplexy I, III, IV a V obsahují některé podjednotky kódované mtDNA, sedm pro komplex I (ND1-ND4, ND4L, ND5 a ND6), jednu pro komplex III (cytochrom b), tři pro komplex IV (COX I-COX III) a dvě pro komplex V (ATPáza6 a ATPáza8) (obr. 7).



Obrázek 7: Schéma dýchacího řetězce. Červeně znázorněny podjednotky kódované mtDNA a modře podjednotky kódované DNA. (Upraveno dle Dimauro, 2004)

Lidská mtDNA je kruhová, dvouvláknová molekula, která obsahuje 37 genů: 2 geny pro rRNA, 22 genů pro tRNA a 13 strukturních genů kódujících výše uvedené

podjednotky dýchacího řetězce. V průběhu evoluce ztratila mtDNA velkou část své původní autonomie a nyní je otrokem DNA, která kóduje četné faktory potřebné pro transkripci, translaci a replikaci mtDNA.

Heteroplazie a prahový efekt. Každá buňka obsahuje stovky nebo tisíce kopií mtDNA, které se při buněčném dělení náhodně rozdělí mezi dceřiné buňky. V normálních tkáních jsou všechny molekuly mtDNA identické (homoplazie). Deleterující mutace mtDNA obvykle postihují některé, ale ne všechny mtDNA v buňce, tkáni nebo jedinci (heteroplazie). Klinický projev patogenní mutace mtDNA je do značné míry určen relativním podílem normálních a mutantních genomů mtDNA v různých tkáních. Ke vzniku mitochondriální dysfunkce v určitém orgánu nebo tkáni, která vede k mitochondriálnímu onemocnění, je zapotřebí minimální kritický počet mutantních mtDNA (prahový efekt).

Mitotická segregace. Při buněčném dělení se může podíl mutantních mtDNA v dceřiných buňkách změnit a podle toho se může změnit fenotyp. Tento jev, nazývaný mitotická segregace, vysvětluje, jak se u některých pacientů s poruchami souvisejícími s mtDNA mohou v různých fázích života skutečně projevit různé mitochondriální choroby.

Dědičnost po matce. Při oplodnění pochází veškerá mtDNA z oocyty. Proto se způsob přenosu mtDNA a bodových mutací mtDNA liší od mendelovské dědičnosti. Matka nesoucí bodovou mutaci mtDNA ji předá všem svým dětem, ale na své potomky ji přenesou pouze její dcery. Onemocnění, které se projevuje u obou pohlaví, ale u kterého není prokázán přenos od otce, silně naznačuje bodovou mutaci mtDNA (*Schwartz, 2002*).

2.4.1.1 Defekty v syntéze mitochondriálních proteinů

Přestavby mtDNA. Jednotlivé delece mtDNA byly spojeny se třemi obvykle sporadickými stavy, Pearsonovým syndromem, rychle smrtelným onemocněním v kojeneckém věku charakterizovaným sideroblastickou anémií a dysfunkcí exokrinního pankreatu, Kearns-Sayrovým syndromem, multisystémovým onemocněním s nástupem před 20. rokem života s poruchou očních pohybů, pigmentovou retinopatií a srdeční blokádou. Mezi časté další příznaky patří ataxie, demence, endokrinní problémy, diabetes mellitus, malý vzrůst, hypoparatyreóza. Typickými laboratorními abnormalitami jsou laktátová acidóza, zvýšená hladina bílkovin v mozkomíšním moku a abnormální vlákna "ragged-red fibers" ve svalové biopsii. Progresivní zevní oftalmoplegie s proximální slabostí končetin nebo bez ní, často slučitelná s normální délkou života. Delece se liší

velikostí a umístěním, ale "běžná" delece je často pozorována u pacientů a u starších jedinců. Duplikace mtDNA se mohou vyskytovat izolovaně nebo společně s jednotlivými delecemi a byly pozorovány u pacientů s Kearns-Sayrovým syndromem nebo s diabetes mellitus a hluchotou. Duplikace a duplikace/delece jsou vzácné a obvykle se přenášejí dědičností po matce.

Bodové mutace byly identifikovány v mtDNA u pacientů s různými poruchami, z nichž většina je dědičná po matce a multisystémová, ale některé jsou sporadické a tkáňově specifické. Mezi encefalomyopatiemi děděnými po matce jsou častější dva syndromy. Prvním je mitochondriální encefalomyopatie, laktátová acidóza a epizody podobné cévní mozkové příhodě, které se obvykle projevují u dětí nebo mladých dospělých po normálním raném vývoji (*Dimauro, 2004*). Mezi příznaky patří opakované zvracení, migréně podobné bolesti hlavy a epizody podobné cévní mozkové příhodě způsobující kortikální slepotu, hemiparézu nebo hemianopii. Magnetická rezonance mozku ukazuje infarkty, které neodpovídají rozložení hlavních cév. Nejčastější mutací mtDNA je A3243G v genu tRNA^{Leu}, ale s mitochondriální encefalomyopatie, laktátová acidóza a epizody podobné cévní mozkové příhodě je spojena asi desítkou dalších mutací, z nichž některé jsou v genech kódujících proteiny. Druhým syndromem je myoklonusová epilepsie s ragged red fibers, charakterizovaný myoklonem, záchvaty, mitochondriální myopatií a mozečkovou ataxií (*Dimauro, 2002*). Mezi méně časté příznaky patří demence, ztráta sluchu, periferní neuropatie a mnohočetné lipomy. S myoklonusová epilepsie s ragged red fibers jsou spojeny tři mutace mtDNA, všechny v genu tRNA^{Lys} (A8344G, T8356C, G8363A). Pouze jeden pacient se syndromem myoklonusová epilepsie s ragged red fibers v dobré víře nesl mutaci v jiné tRNA, G611A v genu tRNA^{Phe} (*Mancuso, 2004*). Není překvapivé, že syndromy spojené s mutacemi tRNA mohou postihnout všechny systémy v těle, včetně oka (atrofie optiku, retinitis pigmentosa, katarakta), sluchu (neurosenzorická hluchota), endokrinního systému (krátký vzrůst, diabetes mellitus, hypoparatyreóza), srdce (hypertrofické kardiomyopatie, blokády vedení), gastrointestinálního traktu (dysfunkce exokrinního pankreatu, střevní pseudoobstrukce, gastroezofageální reflux), a ledvin (renální tubulární acidóza). Jakákoli kombinace výše uvedených symptomů a příznaků by měla vyvolat podezření na mitochondriální poruchu, zejména pokud je prokázán přenos z matky.

2.4.1.2 Defekty genů kódujících proteiny

Také v této kategorii se častěji vyskytují dva syndromy. První syndrom má dvě podoby: neuropatie, ataxie, pigmentová retinitida obvykle postihuje mladé dospělé a způsobuje pigmentovou retinitidu, demenci, záchvaty, ataxii, proximální slabost a senzorickou neuropatii, a mateřsky děděný Leighův syndrom je závažnější dětská encefalopatie s charakteristickými symetrickými lézemi v bazálních gangliích a mozковém kmeni. Oba stavy jsou způsobeny mutacemi v nt-8993 genu ATPase6 (*Dimauro, 2004*). Mutace se rovněž vyskytují ve dvou variantách, T8993G a T8993C, přičemž transverze T-to-G je klinicky i biochemicky škodlivější než změna T-to-C (*Vázquez-Memije, 1998*). Mutace T8993G navíc poskytuje vynikající příklad patogenetického významu mutační zátěže, pokud je stupeň heteroplazie mírný, kolem 70 %, klinickým projevem je neuropatie, ataxie, pigmentová retinitida, subakutní nebo chronické onemocnění mladých dospělých, ale pokud je stupeň heteroplazie velmi vysoký, kolem 90 %, klinickým projevem je rychle progredující encefalopatie kojeneckého nebo dětského věku, Leighův syndrom.

Druhý syndrom Leberova hereditární optická neuropatie, je charakterizován akutní nebo subakutní ztrátou zraku u mladých dospělých, častěji mužů, v důsledku bilaterální atrofie optiku (*Dimauro, 2004*). S Leberovou hereditární optickou neuropatií je spojován asi tucet různých bodových mutací mtDNA ve strukturálních genech, ale pouze tři se zdají být patogenní, i když jsou přítomny izolovaně, primární mutace, a všechny tři postihují geny komplexu I (ND geny). Jedná se o G11778A v ND4, G3460A v ND1 a T14484C v ND6. Výjimečná zranitelnost zrakového nervu u Leberova hereditární optické neuropatie a převaha postižených mužů zůstávají nevysvětleny a vyvolávají pochybnosti o dalších genetických nebo environmentálních faktorech.

Je zajímavé, že bodové mutace v genech kódujících proteiny mtDNA se často vymykají pravidlům mitochondriální genetiky v tom smyslu, že postihují jednotlivé jedince a jednotlivé tkáně, nejčastěji kosterní svalstvo (*Dimauro, 2003*). Pacienti s intolerancí cvičení, myalgií a někdy i recidivující myoglobinurií tak mohou mít izolované defekty komplexu I, komplexu III nebo komplexu IV v důsledku patogenních mutací v genech kódujících podjednotky ND, podjednotky COX a zejména cytochrom b (*Andreu, 1999*). Absence dědičnosti po matce a zapojení samotného svalu naznačují, že mutace vznikly de novo v myogenních kmenových buňkách po diferenciaci zárodečné vrstvy (*Dimauro, 2004*).

3. ZÁVĚR

Cílem mé bakalářské práce bylo zpracovat z dostupných odborných zdrojů literární rešerši na téma buněčná smrt závislá na mitochondriích.

V této práci jsem podala základní informace o mitochondriích, seznámila se s jejich stavbou, dynamikou a funkcemi, především syntézou ATP. V oblasti buněčné smrti jsem zpracovala obecné informace o apoptóze a nekróze. Dále jsem se zaměřila hlavně na dvě nejdůležitější skupiny proteinů zapojených do apoptózy, a to kaspázy a Bcl-2, které se účastní všech cest apoptotické buněčné smrti. V oblasti mitoptózy stále probíhají výzkumy, jelikož dosavadní poznatky o již známých mechanismech uvolňování mitochondrií z buňky či jejich likvidací uvnitř buňky nejsou úplné a některé mechanismy jsou jen teoretické a dosud nepotvrzené ani nevyvrácené. A tak vědcům zbývá ještě mnoho práce s objasněním všech mechanismů mitoptózy.

4. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. AANEN D. K., SPELBRINK J. N., BEEKMAN M.: What cost mitochondria? The maintenance of functional mitochondrial DNA within and across generations. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **2014**, 369(1646).
2. AJIOKA R. S., PHILLIPS J. D., KUSHNER J. P.: Biosynthesis of heme in mammals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, **2006**, 1763(7).
3. ANDREU A. L., HANNA M. G., REICHMANN H., et al. Exercise Intolerance Due to Mutations in the Cytochrome b Gene of Mitochondrial DNA. *New England Journal of Medicine*, **1999**, 341(14).
4. BARTOLÁK-SUKI E., IMSIROVIC J., NISHIBORI Y., KRISHNAN R.: Regulation of Mitochondrial Structure and Dynamics by the Cytoskeleton and Mechanical Factors. *International Journal of Molecular Sciences*, **2017**, 18(8).
5. BASAÑEZ G., HARDWICK J. M.: Unravelling the Bcl-2 Apoptosis Code with a Simple Model System. *PLoS Biology*, **2008**, 6(6).
6. BOTA D. A., NGO J. K., DAVIES K. J. A.: Downregulation of the human Lon protease impairs mitochondrial structure and function and causes cell death. *Free Radical Biology and Medicine*, **2005**, 38(5).
7. CHAABANE W., USER S. D., EL-GAZZAH M., et al.: Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: Interdependence between those pathways and effects on cancer. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, **2013**, 61(1).
8. COGLIATI S., CALVO E., LOUREIRO M., et al.: Mechanism of super-assembly of respiratory complexes III and IV. *Nature*, **2016**, 539(7630).
9. COGLIATI S., ENRIQUEZ J. A., SCORRANO L.: Mitochondrial Cristae: Where Beauty Meets Functionality. *Trends in Biochemical Sciences*, **2016**, 41(3).
10. COLLINS Y., CHOUCANI E. t., JAMES A. M., MENGER K. E., et al.: Mitochondrial redox signalling at a glance. *Journal of Cell Science*, **2012**, 125(4).
11. DAN DUNN J., AJ ALVAREZ L., ZHANG X., SOLDATI T.: Reactive oxygen species and mitochondria: A nexus of cellular homeostasis. *Redox Biology*, **2015**, 6 (472-485).
12. D'ARCY M. S.: Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International*, **2019**, 43(6).

13. DEMISHTEIN-ZOHARY K., AZEM A.: The TIM23 mitochondrial protein import complex: function and dysfunction. *Cell and Tissue Research*, **2017**, 367(1).
14. DIMAURO S.: Mitochondrial diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, **2004**, 1658(1-2).
15. DIMAURO S., BONILLA E., MARCUSO M. et al.: Mitochondrial myopathies. *Basic appl myol*, **2003**, 13.
16. DIMAURO S., HIRANO M., KAUFMANN P., et al.: Clinical features and genetics of myoclonic epilepsy with ragged red fibers. *Advances in neurology*, **2002**, 89.
17. EFREMOV R. G., BARADARAN R., SAZANOV L. A.: The architecture of respiratory complex I. *Nature*, **2010**, 465(7297).
18. EKERT P. G., VAUX D. L.: The mitochondrial death squad: hardened killers or innocent bystanders?. *Current Opinion in Cell Biology*, **2005**, 17(6).
19. ELMORE S.: Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, **2007**, 35(4).
20. FREDERICK R. L., SHAW J. M.: Moving Mitochondria: Establishing Distribution of an Essential Organelle. *Traffic*, **2007**, 8(12).
21. FREY T. G., MANNELLA C. A.: The internal structure of mitochondria. *Trends in Biochemical Sciences*, **2000**, 25(7).
22. GARONE C., MINCZUK M., TILOKANI L., et al.: Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. *Essays in Biochemistry*, **2018**, 62(3).
23. GRILO A. L., MANTALARIS A.: Apoptosis: A mammalian cell bioprocessing perspective. *Biotechnology Advance*, **2019**, 37(3).
24. GUICCIARDI M. E., MALHI H., MOTT J. L., GORES G. J.: Apoptosis and necrosis in the liver. *Comprehensive Physiology*, **2013**, 3(2).
25. HARDWICK J. M., SOANE L.: Multiple Functions of BCL-2 Family Proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **2013**, 5(2).
26. HEAZLEWOOD J. L., MILLAR A. H., DAY D. A., WHELAN J.: What makes a mitochondrion? *Genome Biology*, **2003**, 4(6).
27. HERRMANN J. M., BIHLMAIER K., MESECKE N.: The Role of the Mia40-Erv1 Disulfide Relay System in Import and Folding of Proteins of the Intermembrane Space of Mitochondria. *The Enzymes*, **2007**, 245(366).

28. HINDS M. G., SMITS C., FREDERICKS-SHORT R., et al.: Bim, Bad and Bmf: intrinsically unstructured BH3-only proteins that undergo a localized conformational change upon binding to prosurvival Bcl-2 targets. *Cell Death & Differentiation*, **2007**, 14(1).
29. HÜTTEMANN M., KADENBACH B., GROSSMAN L. I.: Mammalian subunit IV isoforms of cytochrome c oxidase. *Gene*, **2001**, 267(1).
30. HUYNEN M. A., MÜHLMEISTER M., GOTTHARDT K., et al.: Evolution and structural organization of the mitochondrial contact site (MICOS) complex and the mitochondrial intermembrane space bridging (MIB) complex. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, **2016**, 1863(1).
31. INGELSSON B., SÖDERBERG D., STRID T., et al.: Lymphocytes eject interferogenic mitochondrial DNA webs in response to CpG and non-CpG oligodeoxynucleotides of class C. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **2018**, 115(3).
32. JOSHI A., KUNDU M.: Mitophagy in hematopoietic stem cells. *Autophagy*, **2014**, 9(11).
33. JOZA N., SUSIN S. A., DAUGAS E., et al.: Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*, **2001**, 410(6828).
34. KOPITO R. R.: Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends in Cell Biology*, **2000**, 10(12).
35. KRAUS F., RYAN M. T.: The constriction and scission machineries involved in mitochondrial fission. *Journal of Cell Science*, **2017**, 130(18).
36. LIU F. T., NEWLAND A. C., JIA L.: Bax conformational change is a crucial step for PUMA-mediated apoptosis in human leukemia. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2003**, 310(3).
37. LIU J., QIN L., FERGUSON-MILLER S.: Crystallographic and online spectral evidence for role of conformational change and conserved water in cytochrome oxidase proton pump. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **2011**, 108(4).
38. LIU L., SAKAKIBARA K., CHEN Q., OKAMOTO K.: Receptor-mediated mitophagy in yeast and mammalian systems. *Cell Research*, **2014**, 24(7).
39. LOCKSLEY R. M., KILLEEN N., LENARDO M. J.: The TNF and TNF Receptor Superfamilies. *Cell*, **2001**, 104(4).

40. LOOD C., BLANCO L. P., PURMALEK M. M., et al.: Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease. *Nature Medicine*, **2016**, 22(2).
41. LYAMZAEV K. G., KNORRE D. A., CHERNYAK B. V.: Mitoptosis, Twenty Years After. *Biochemistry*, **2020**, 85(12-13).
42. LYAMZAEV K. G., NEPRYAKHINA O. K., SAPRUNOVA V. B., et al.: Novel mechanism of elimination of malfunctioning mitochondria (mitoptosis): Formation of mitoptotic bodies and extrusion of mitochondrial material from the cell. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, **2008**, 1777(7-8).
43. MAIO N., ROUAULT T. A.: Iron–sulfur cluster biogenesis in mammalian cells: New insights into the molecular mechanisms of cluster delivery. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, **2015**, 1853(6).
44. MANCUSO M., FILOSTO M., MOOTHA V. K., et al.: A novel mitochondrial tRNAPhe mutation causes MERRF syndrome. *Neurology*, **2004**, 62(11).
45. MANNELLA C. A.: Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, **2006**, 1763(5-6).
46. MCILWAIN D. R., BERGER T., MAK T., W.: Caspase Functions in Cell Death and Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **2013**, 5(4).
47. MEYER N., KIM S. S., PENN L. Z.: The Oscar-worthy role of Myc in apoptosis. *Seminars in Cancer Biology*, **2006**, 16(4).
48. NAKAMOTO R. K., BAYLIS SCANLON J. A., AL-SHAWI M. K.: The rotary mechanism of the ATP synthase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **2008**, 476(1).
49. NEGRONI A., CUCCHIARA S., STRONATI L.: Apoptosis, necrosis, and Necroptosis in gut and intestinal homeostasis. *Mediators of Inflammation*, **2015**, 2015(1-10).
50. OLTERS DORF T., ELMORE S. W., SHOEMAKER A. R., et al.: An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature*, **2005**, 435(7042).
51. OSELLAME L. D., BLACKER T. S., DUCHEN M. R.: Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, **2012**, 26(6).

52. OUSTI S., MATARRESE P., PADDON R., et al.: Death receptor ligation triggers membrane scrambling between Golgi and mitochondria. *Cell Death & Differentiation*, **2007**, 14(3).
53. PAUMARD P., VAILLIER J., COULARY B., et al.: The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *The EMBO Journal*, **2002**, 21(3).
54. PICKLES S., VIGIÉ P., YOULE R. J.: Mitophagy and Quality Control Mechanisms in Mitochondrial Maintenance. *Current Biology*, **2018**, 28(4).
55. PROTASONI M., ZEVIANI M.: Mitochondrial Structure and Bioenergetics in Normal and Disease Conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, **2021**, 22(2).
56. QUINLAN C. L., GONCALVES R. L.S., HEY-MOGENSEN M., YADAVA N., et al.: The 2-Oxoacid Dehydrogenase Complexes in Mitochondria Can Produce Superoxide/Hydrogen Peroxide at Much Higher Rates Than Complex I. *Journal of Biological Chemistry*, **2014**, 289(12).
57. ROCHE B., AUSSEL L., EZRATY B., et al.: Iron/sulfur proteins biogenesis in prokaryotes: Formation, regulation and diversity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, **2013**, 1827(3).
58. SABHARWAL S. S., SCHUMACKER P. T.: Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel?. *Nature Reviews Cancer*, **2014**, 14(11).
59. SAELENS X., FESTJENS N., WALLE L. V., et al.: Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*, **2004**, 23(16).
60. SCHENKEL L. C., BAKOVIC M.: Formation and regulation of mitochondrial membranes. *International Journal of Cell Biology*, **2014**, 2014(1-13).
61. SCHWARTZ M., VISSING J.: Paternal Inheritance of Mitochondrial DNA. *New England Journal of Medicine*, **2002**, 347(8).
62. SICKMANN A., REINDERS J., WAGNER Y., et al.: The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **2003**, 100(23).
63. STEWART J. B., FREYER C., ELSON J. L., et al.: Strong purifying selection in transmission of mammalian mitochondrial DNA. *PLoS Biology*, **2008**, 6(1).

64. STROUD D. A., BECKER T., QIU J., et al.: Biogenesis of mitochondrial β -barrel proteins: the POTRA domain is involved in precursor release from the SAM complex. *Molecular Biology of the Cell*, **2011**, 22(16).
65. TANAKA K.: The PINK1–Parkin axis: An Overview. *Neuroscience Research*, **2020**, 159.
66. TAYLOR R. C., CULLEN S. P., MARTIN S. J.: Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **2008**, 9(3).
67. TOWER J.: Programmed cell death in aging. *Ageing Research Reviews*, **2015**, 23.
68. TSANG C. K., LIU Y., THOMAS J., ZHANG Y., et al.: Superoxide dismutase 1 acts as a nuclear transcription factor to regulate oxidative stress resistance. *Nature Communications*, **2014**, 5(1).
69. VAUX D. L., KORSMEYER S. J.: Cell death in development. *Cell*, **1999**, 96(2).
70. VÁZQUEZ-MEMIJE M. E., SHANSKE S., SANTORELLI F. M., et al.: Comparative biochemical studies of ATPases in cells from patients with the T8993G or T8993C mitochondrial DNA mutations. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, **1998**, 21(8).
71. WALTHER D. M., RAPAPORT D.: Biogenesis of mitochondrial outer membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, **2009**, 1793(1).
72. YAN C., DUANMU X., ZENG L., LIU B.: Mitochondrial DNA: Distribution, Mutations, and Elimination. *Cells*, **2019**, 8(4).
73. ZHENG Y. R., ZHANG X. N., CHEN Z.: Mitochondrial transport serves as a mitochondrial quality control strategy in axons: Implications for central nervous system disorders. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, **2019**, 25(7).
74. ZHOU Q., ZHAI Y., LOU J., et al.: Thiabendazole inhibits ubiquinone reduction activity of mitochondrial respiratory complex II via a water molecule mediated binding feature. *Protein & Cell*, **2011**, 2(7).