

Univerzita Karlova  
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Biologie



Matěj Zelinger

Vliv oxidačního stresu na mitochondrie  
An effect of oxidative stress on mitochondria

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Jana Vojtová, Ph.D.  
Praha, 2024

**Prohlášení:**

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

V Praze 1.3.2024

**Poděkování:**

Děkuji své školitelce RNDr. Janě Vojtové Ph.D. za odborné konzultace a cenné rady. Dále bych chtěl poděkovat své rodině a přátelům za psychickou podporu při psaní bakalářské práce.

<b>1</b>	<b>Obsah</b>	
2	Abstrakt.....	1
3	Abstract.....	2
4	Seznam zkratk.....	3
5	Úvod.....	4
6	Oxidační stres .....	6
6.1	Reaktivní formy kyslíku a dusíku .....	7
6.1.1	Zdroje reaktivních forem kyslíku .....	8
6.1.2	Zdroje reaktivních forem dusíku .....	10
7	Obranné mechanismy proti oxidačnímu stresu.....	11
7.1	Enzymatické obranné mechanismy.....	11
7.2	Neenzymatické obranné mechanismy .....	11
8	Efekt oxidačního stresu na mitochondrie.....	12
8.1	Efekt oxidačního stresu na mitochondriální DNA .....	12
8.1.1	Báze modifikované reaktivními formami kyslíku .....	12
8.2	Efekt oxidačního stresu na morfologii mitochondrií.....	13
8.3	Efekt oxidačního stresu na membránový potenciál mitochondrií.....	16
8.4	Efekt oxidačního stresu na autofágii mitochondrií .....	17
8.4.1	Efekt oxidačního stresu na mitofágii u kvasinek .....	18
8.4.2	Efekt oxidačního stresu na mitofágii u savčích buněk .....	19
9	Metody pro kvantifikaci morfologických změn mitochondrií.....	20
10	Metody detekce membránového potenciálu mitochondrií.....	22
11	Metody detekce mitofágie u <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	25
12	Metody detekce mitofágie u savčích buněk .....	26
13	Závěr .....	28
14	Reference .....	30

## 2 Abstrakt

Oxidační stres je způsobený nerovnováhou mezi produkcí reaktivních forem kyslíku (ROS) a buněčnými antioxidačními mechanismy. Nízká míra oxidačního stresu je pro buňku příznivá, ale vysoká míra oxidačního stresu může vést k poškození buněčných komponent a je spojována s rozvojem řady chronických onemocnění. Mitochondrie jsou hlavním zdrojem ROS v buňce a často také prvním cílem, který je negativními účinky oxidačního stresu zasažen. Tato práce poskytuje přehled současných poznatků o vlivu oxidačního stresu na mitochondriální DNA, mitochondriální membránový potenciál, morfologii mitochondrií a autofázi mitochondrií (mitofázi) u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* a savčích buněk, a to včetně metod pro detekci mitochondriálního membránového potenciálu, morfologických změn mitochondrií a mitofázie. Detailní porozumění roli mitochondrií za oxidačního stresu a dostupné a citlivé metody pro detekci jejich změn mohou vést k vývoji terapeutických strategií pro léčbu nemocí spojených s oxidačním stresem, včetně neurodegenerativních chorob, srdečních onemocnění, diabetu a rakoviny.

**Klíčová slova:** oxidační stres, mitochondrie, ROS, mitofázie, membránový potenciál

### **3 Abstract**

Oxidative stress is caused by an imbalance between the production of reactive oxygen species (ROS) and the cellular antioxidant mechanisms. A low level of oxidative stress is beneficial for the cell, but at higher levels, oxidative stress can cause damage to cellular components and is associated with the development of several chronic diseases. Mitochondria are the major source of ROS in the cell and often are the first target affected by the negative effects of oxidative stress. This work provides an overview of the current knowledge on the effects of oxidative stress on mitochondrial DNA, mitochondrial membrane potential, mitochondrial morphology and mitochondrial autophagy (mitophagy) in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and mammalian cells, including methods to detect mitochondrial membrane potential, morphological changes in mitochondria and mitophagy. A detailed understanding of the role of mitochondria under oxidative stress and accessible and sensitive methods to detect their changes may lead to the development of therapeutic strategies for the treatment of diseases associated with oxidative stress, including neurodegenerative diseases, heart disease, diabetes and cancer.

**Key words:** oxidative stress, mitochondria, ROS, mitophagy, membrane potential

## 4 Seznam zkratek

<b>A<math>\beta</math></b>	Amyloid beta
<b>CCCP</b>	m-Chlorfenyl hydrazon
<b>CL</b>	Kardiolipin (z angl. CardioLipin)
<b>DIC</b>	Diferenciální interferenční kontrast
<b>DNP</b>	2,4-dinitrofenol
<b>eNOS</b>	Endoteliální syntázy oxidu dusnatého
<b>FCCP</b>	Karbonylkyanid-p-trifluormethoxyfenylhydrazon
<b>FRET</b>	Försterův rezonančního přenosu energie (z angl. Förster Resonance Energy Transfer)
<b>GFP</b>	Zelený fluorescenční protein (z angl. Green Fluorescent Protein)
<b>iNOS</b>	Indukované syntázy oxidu dusnatého
<b>mtDNA</b>	Mitochondriální DNA
<b>nNOS</b>	Neuronální syntázy oxidu dusnatého
<b>NOS</b>	Syntázy oxidu dusnatého (z angl. Nitric Oxide Synthases)
<b>OGG1</b>	8-oxoguanine glykosyláza
<b>R123</b>	Rhodamin 123
<b>RNS</b>	Reaktivní formy dusíku (z angl. Reactive Nitrogen Species)
<b>ROS</b>	Reaktivní formy kyslíku (z angl. Reactive Oxygen species)
<b>SIM</b>	Mikroskopie se strukturovaným osvětlením (z angl. Structured Illumination Microscopy)
<b>SOD</b>	Superoxiddismutázy (z angl. SuperOxide Dismutaze)
<b>STED</b>	Redukce fluorescence stimulovanou emisí (z angl. STimulated Emission Depletion)
<b>TMRE</b>	Tetrametylrodamin etyl ester
<b>TMRM</b>	Tetrametylrodamin
<b>TPP</b>	Tetrafenylfosfonium
<b>VDAC1</b>	Napětově závislý aniontový kanál 1 (z angl. Voltage-Dependent Anion-selective Channel 1)
<b>WT</b>	Divoký typ (z angl. Wild Type)

## 5 Úvod

Oxidační stres vzniká při nerovnováze, ve které „proces oxidace převažuje nad buněčnou antioxidační obranou kvůli poruše redoxní signalizace“ (\*Ji and Yeo, 2021) a je způsoben především reaktivními formami kyslíku (ROS). Mitochondrie jsou hlavním zdrojem ROS v buňce a bývají jednou z prvních komponent buňky ovlivněnou ROS. Ovlivněny mohou být mitochondrie i celá buňka a to pozitivně (tzv. eustres) a negativně (tzv. distres). Eustres zahrnuje především tzv. redoxní signalizaci, kde ROS modifikují různé proteiny a ovlivňují tak mnoho významných procesů v buňce. Naopak distres nastává při nekontrolovatelně zvýšené koncentraci ROS, která vede k poškození buněčných komponent a v některých případech až ke smrti buňky.

Tato práce shrnuje dosavadní poznatky o efektu oxidačního stresu na mitochondrie, a to zejména na membránový potenciál mitochondrií, jejich morfologii a mitofágiu u savčích buněk i u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Zároveň jsou popsány různé metody detekce těchto parametrů, které oxidační stres ovlivňuje.

Zvýšená produkce ROS vede ke sníženému membránovému potenciálu mitochondrií, které jsou menší, fragmentované a často oválné. Nakonec jsou takové mitochondrie často degradovány mitofágií, aby se předešlo poškození buňky či dokonce její apoptóze. Proteiny účastníci se mitofágie jako např. Atg32 u kvasinek a Drp1 u savců jsou regulovány ROS a byla pozorována korelace mezi hladinou ROS a těchto proteinů. Přesný mechanismus signalizace je ovšem předmětem budoucího zkoumání.

V posledních letech byly rozvinuty moderní, spolehlivé a uživatelsky přívětivé metody detekce morfologických změn mitochondrií využívající např. umělou inteligenci jako je MitoMo, či MitoSegNet. Dále jsou k dispozici citlivé a rychlé metody využívající lipofilní fluorescenční barviva jako např. TMRM, DiOC6(3) či R123 na detekci membránového potenciálu mitochondrií. Rovněž pro větší spolehlivost měření membránového potenciálu mitochondrií mohou být využity např. fluorofory fungující na mechanismu FRET, či barvivo JC-1, jež využívají poměr emisí dvou forem barviva. Pro detekci mitofágie u *Saccharomyces cerevisiae* jsou často využívány mitochondriální proteiny označené fluorescenčními proteiny např. GFP, mCherry či biosensor Rosella, který obsahuje dva fluorofory různě citlivé k pH a sekvenci pro přímou vazbu na mitochondrie. V savčích buňkách je často využívána např. mtKeima nebo kombinace několika proteinů a jejich reakce na pH v lysozomu spojená se



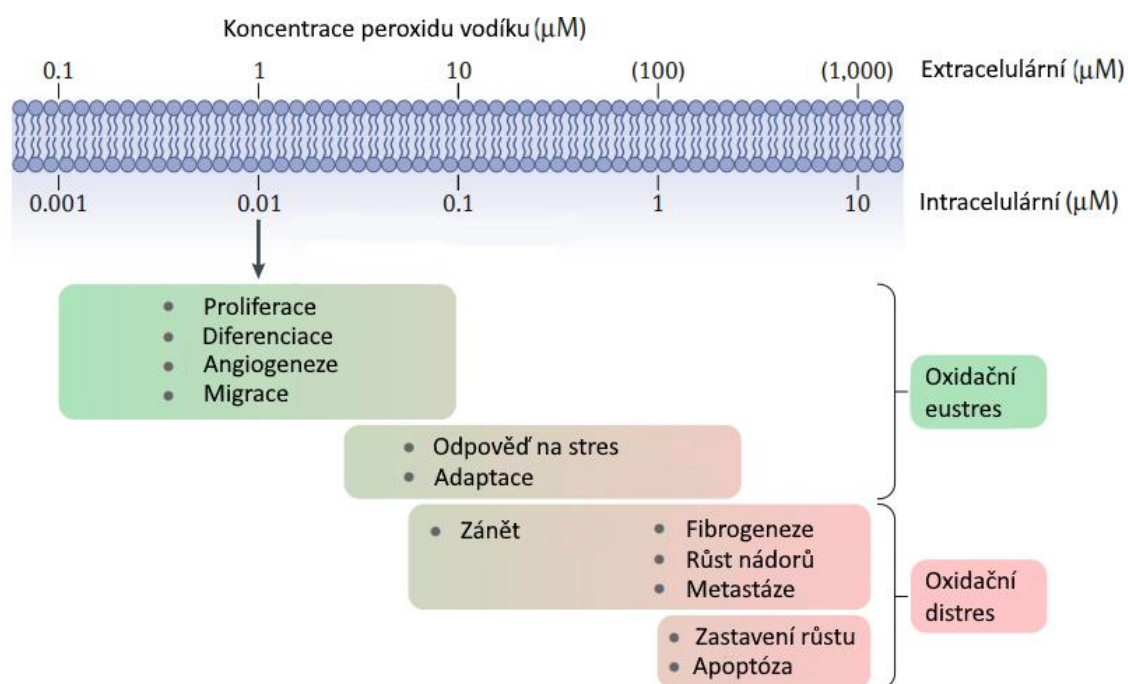
změnou emise světla. Rovněž lze navrhnout celé transgenní organismy s expresí fluorescenčních proteinů např. myš mito-QC a pozorovat mitofáгии *in vivo* v celých tkáních.

Dostupnost přesných a spolehlivých metod na detekci změn v mitochondriích napomáhá detailnímu porozumění mitochondriálních funkcí za oxidačního stresu. To může pomoci k vytvoření terapeutických metod pro zmírnění, či dokonce vyléčení chorob s charakteristickým zvýšeným oxidačním stresem jako jsou např. neurodegenerativní onemocnění, srdeční choroby, diabetes či rakovina.

## 6 Oxidační stres

Koncept oxidačního stresu<sup>1</sup> jako „narušení rovnováhy mezi oxidanty a antioxidanty ve prospěch oxidantů“ navrhl německý lékař a vědec Helmut Sies (\*Sies 1985). Současná definice oxidačního stresu definuje oxidační stress na „stav, ve kterém proces oxidace převažuje nad buněčnou antioxidační obranou kvůli poruše redoxní signalizace“ (\*Ji and Yeo, 2021).

Mezi oxidanty způsobující oxidační stres patří především reaktivní formy kyslíku (ROS) a reaktivní formy dusíku (RNS) viz kapitola 6.1. Působení oxidačního stresu může být v závislosti na jeho efektu jak pozitivní (tzv. eustres), tak negativní (tzv. distres), viz obr. 1.



Obr. 1: Pozitivní a negativní oxidační stres v závislosti na koncentraci ROS (zde koncentrace peroxidu vodíku). Za fyziologických podmínek je udržována stálá nízká hladina ROS. Mírně zvýšené hladiny ROS, především např. peroxidu vodíku, mohou pozitivně ovlivnit metabolismus buňky a její odpověď na stres. Při přibližně  $5\mu\text{M}$  intracelulární koncentraci ROS již dochází k negativnímu oxidačnímu stresu a poškozování buněčných komponent (\*Sies a Jones 2020, upraveno).

<sup>1</sup> V české odborné i vědeckopopulární literatuře se vyskytuje vedle termínu „oxidační stres“ také termín „oxidativní stres“. V této práci bude používán výhradně termín „oxidační stres“, protože se jedná o častěji užívaný termín (konzultováno v jazykové poradně Ústavu pro jazyk český AV ČR).

Pozitivní oxidační stres je klíčový pro signalizaci v buňkách nyní již specificky nazývané redoxní signalizaci. Mezi hlavní molekuly v redoxní signalizaci patří např. peroxid vodíku, superoxidový anion, oxid dusnatý nebo peroxynitrit. Tyto molekuly mohou např. oxidací, nitrací, či nitrosylací reversibilně a specificky modifikovat aminokyseliny (např. cysteiny, tyrosiny či methioniny) proteinů a tím ovlivnit jejich funkci. Modifikované proteiny pak hrají roli v proliferaci, diferenciaci, migraci nebo angiogenezi. Dále oxidační stres napomáhá při imunitní odpovědi, kdy fagocyty používají ROS k likvidaci cizorodých částic a mikroorganismů (\*Sies a Jones 2020) (\*Preiser 2012).

Naproti tomu negativní oxidační stres má vliv v mnoha patologiích jako např. neurodegenerativní onemocnění, rakovina, diabetes a další (\*Preiser 2012). Poškozuje proteiny, lipidy, DNA i RNA. Po oxidaci mohou proteiny např. ztratit svoji funkci (Machado *et al.*, 1991). U lipidů pak dochází k tvorbě lipidových hydroperoxidů, jejichž hromadění v membráně může způsobit poškození až úmrtí buňky. Oxidace bází v RNA a DNA pak vede k mutacím (\*Sies a Jones 2020).

## 6.1 Reaktivní formy kyslíku a dusíku

Reaktivní formy kyslíku a dusíku představují soubor radikálových (molekuly s jedním či více nepárovými elektrony) i neradikálových molekul viz tabulka 1.

Reaktivní formy kyslíku		Reaktivní formy dusíku	
Radikály	Neradikálové formy	Radikály	Neradikálové formy
Superoxidový ( $O_2^{\bullet-}$ )	Peroxid vodíku ( $H_2O_2$ )	Oxid dusnatý ( $NO^{\bullet}$ )	Peroxynitrit ( $ONOO^-$ )
Hydroxylový ( $OH^{\bullet}$ )	Kyselina chlorná ( $HClO$ )	Oxid dusičitý ( $NO_2^{\bullet}$ )	Alkyl peroxynitrit ( $ROONO$ )
Peroxylový ( $RO_2^{\bullet}$ )	Ozón ( $O_3$ )		Kyselina dusitá ( $HNO_2$ )
Alkoxylový ( $RO^{\bullet}$ )	Singletový kyslík ( $^1O_2$ )		Nitroxylový anion ( $NO^-$ )
Hydroperoxylový ( $HO_2^{\bullet}$ )			Nitrylchlorid ( $NO_2Cl$ )

Tabulka 1: Rozdělení reaktivních forem kyslíku a dusíku. R značí alkylovou skupinu obsahující atomy uhlíku a vodíku a „•“ značí nepárový elektron (Dhawan, Veena. “Chapter 2 Reactive Oxygen and Nitrogen Species: General Considerations.” (2019), upraveno).

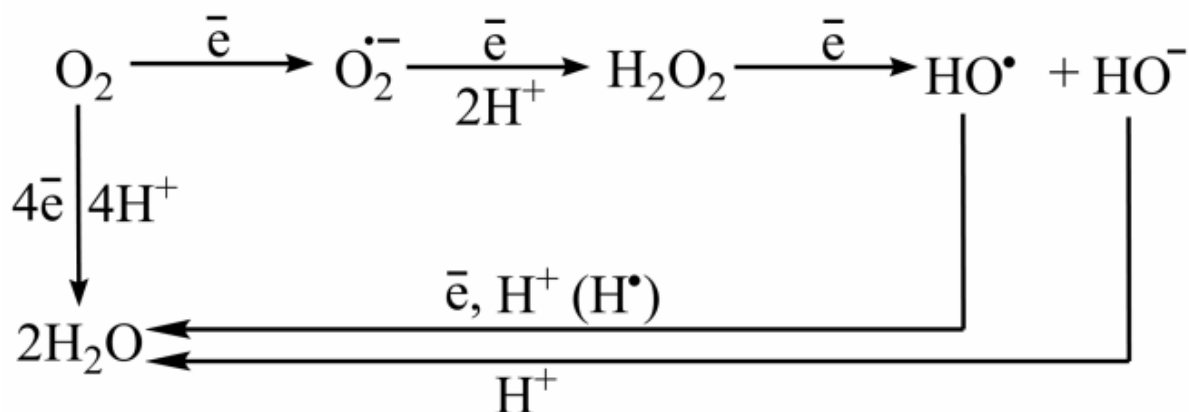
### 6.1.1 Zdroje reaktivních forem kyslíku

Reaktivní formy kyslíku (ROS) mohou vznikat exogenně působením vnějších faktorů nebo endogenně v buňkách. Mezi exogenní zdroje ROS patří např. příjem drog a toxických látek, život ve znečištěném prostředí, intoxikace těžkými kovy, UV záření a jiné ionizační záření a psychický stres (\*Sies a Jones 2020). Mezi hlavní endogenní zdroje ROS pak patří dýchací řetězec, oxidázy NADPH a xantin-oxidoreduktázy.

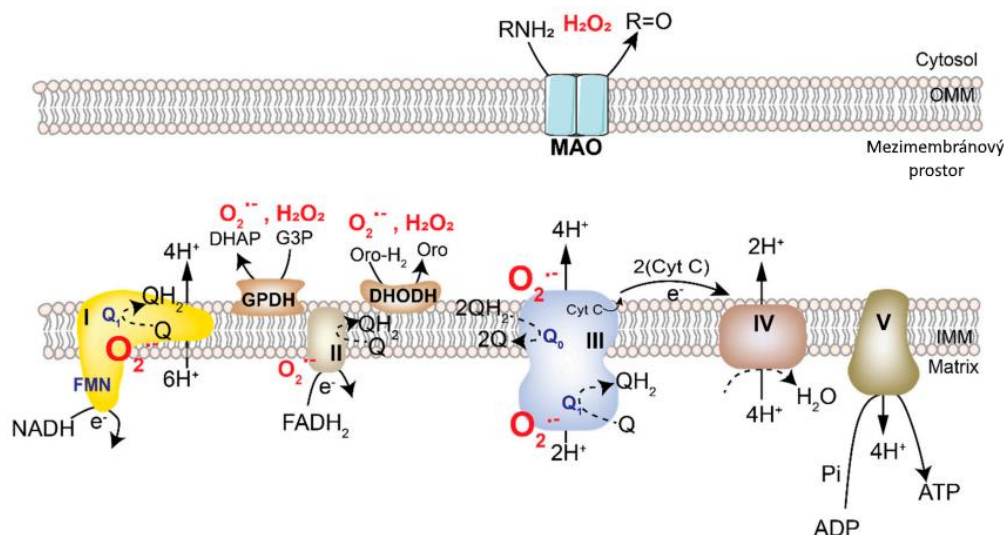
#### 6.1.1.1 Dýchací řetězec

Dýchací řetězec se nachází na vnitřní mitochondriální membráně, kde vytváří protonový gradient, který je využíván na produkci energeticky bohaté molekuly ATP. Protonový gradient je vytvořen díky řadě transmembránových proteinů – komplexy I, II, III a IV, koenzymu Q a cytochromu c.

Přijatý kyslík je z více jak 90 % redukován komplexem IV na vodu přijetím čtyř elektronů bez vzniku ROS viz obr. 2. Ale kyslík, který není takto redukován na vodu, je redukován postupnou jedno-elektronovou redukcí (viz obr. 2) za vzniku ROS díky únikům elektronů z elektronového transportního řetězce (\*Lushchak 2014). Primárními zdroji ROS jsou komplex I, II a III a další mitochondriální enzymy viz obr. 3.



Obr. 2: Molekulární kyslík lze redukovat přijetím čtyř elektronů a čtyř protonů na dvě molekuly vody. Alternativně, jedoelektronová redukce přemění kyslík na superoxidový radikál (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), který přijetím dalšího elektronu a dvou protonů tvoří peroxid vodíku (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Redukcí peroxidu vodíku vzniká hydroxylový radikál (OH<sup>•</sup>), který přijetím dalšího elektronu a protonu vytváří molekulu vody (\*Lushchak 2014).



Obr. 3 Místa v mitochondrii, která produkují ROS. Na vnitřní mitochondriální membráně (IMM) se nachází dýchací řetězec. NADH a FADH<sub>2</sub> jsou produkty Krebsova cyklu, jež poskytují své elektrony na tvorbu protonového gradientu. Protonový gradient využívá ATP syntáza (komplex V) na tvorbu ATP. Tvorba ROS se kromě komplexů I, II a III odehrává i na glycerol-3-fosfát dehydrogenáze (GPDH) a dihydroorotát dehydrogenáze (DHODH) na vnitřní membráně a monoamin oxidáze (MAO) na vnější mitochondriální membráně (OMM) (\*Purohit, Simeone, a Lyssiotis 2019).

Vzniklé ROS mohou uvolnit železo z proteinů obsahujících železo-sírné (Fe-S) klastry např. z komplexu I, II a III dýchacího řetězce anebo z akonitázy, což je enzym Krebsova cyklu (Sun *et al.*, 2018) (Schoenfeld *et al.*, 2017). Uvolněné železo se pak může účastnit Fentonovy reakce, která zahrnuje přeměnu peroxidu vodíku v přítomnosti dvojmocného železa na velice reaktivní hydroxylový radikál (Mello Filho, Hoffmann, a Meneghini 1984). Zjednodušené schéma Fentonovy reakce lze zapsat rovnicí:



Jelikož je volné železo pro buňku toxické, vyskytuje se vázané v centrech různých proteinů (např. v hemoglobinu) nebo je uloženo v proteinu ferritinu ve formě Fe<sup>3+</sup> (Cook *et al.*, 1974). Zvýšená koncentrace železa vede k narušení regulace železnatých iontů a jejich účasti ve Fentonově reakci. Peroxid vodíku nebo superoxidový radikál (Sun *et al.*, 2018) může reagovat i s Fe<sup>3+</sup> a vyvázat ho z ferritinu za vzniku Fe<sup>2+</sup>. Vzniklý železnatý ion se může účastnit další Fentonovy reakce (Wu *et al.*, 1996). Dochází tak ke koloběhu a produkci hydroxylových radikálů, které mohou být pro buňku fatální.

### 6.1.1.2 Oxidázy NADPH

Oxidázy NADPH jsou transmembránové enzymy, které transportují elektrony přes plazmatickou membránu za redukce kyslíku a tvorby ROS (superoxidového radikálu nebo peroxidu vodíku). Například savčí oxidázy NOX jsou klíčové při oxidačním vzplanutí u fagocytů a ovlivňují např. aktivitu fosfatáz, kináz a vápníkových kanálů (\*Vermot *et al.*, 2021) a oxidázy DUOX jsou nepostradatelné pro biosyntézu hormonů štítné žlázy (Moreno *et al.*, 2002). U jednoduchého eukaryotického organismu kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* byla rovněž popsána oxidáza NADPH Yno1p, která tvoří až 20% celkové produkce ROS a podílí se na regulaci organizace aktinového cytoskeletu (Rinnerthaler *et al.*, 2012).

### 6.1.1.3 Xantin oxido-reduktáza

Xantin oxidoreduktáza je enzym, který se účastní katabolismu purinových nukleotidů a může produkovat superoxidový radikál a peroxid vodíku. ROS vzniklé produkcí xantin oxidoreduktázy zprostředkovávají např. adhezi neutrofilů v rámci imunitní reakce (\*Chung *et al.*, 1997).

Dále za hypoxie v přítomnosti nitritu mohou xantin oxidoreduktázy produkovat i oxid dusnatý (Godber *et al.*, 2000) a peroxynitrit (Godber *et al.*, 2000), přičemž peroxynitrit bývá vychytáván kyselinou močovou, která je také produktem xantin oxidoreduktáz (Squadrito *et al.*, 2000).

## 6.1.2 Zdroje reaktivních forem dusíku

### 6.1.2.1 Syntázy oxidu dusnatého

Syntázy oxidu dusnatého (NOS) produkují oxid dusnatý při metabolismu aminokyseliny L-argininu. Existují tři formy – nNOS (neuronální), eNOS (endoteliální) a iNOS (indukované) viz tabulka 2.

	nNOS	eNOS	iNOS
<b>Lokalizace</b>	Neurony	Endotel (cévy)	Makrofágy a buňky hladké svaloviny
<b>Využití oxidu dusnatého</b>	Komunikace mezi buňkami	Regulace krevního tlaku	Obranné reakce – cytotoxicita

Tabulka 2: Syntázy oxidu dusnatého (\*Forstermann a Sessa 2012).

Oxid dusnatý produkovaný NOS má ovšem mnoho dalších funkcí. Reguluje i transkripci a translaci a může vytvářet post-translační modifikace proteinů. Zároveň může

reagovat se superoxidovým radikálem za vzniku daleko silnějšího oxidantu peroxyinitritu (\*Forstermann a Sessa 2012).

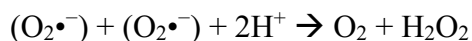
## 7 Obranné mechanismy proti oxidačnímu stresu

Jako obrana proti nadměrnému oxidačnímu stresu slouží antioxidantní mechanismy, jež dokáží zneškodnit ROS a RNS. Tyto obranné mechanismy lze rozdělit na enzymatické a neenzymatické a vyskytují se jak v buňce, tak mimo ni (\*Birben *et al.*, 2012).

### 7.1 Enzymatické obranné mechanismy

Enzymatické obranné mechanismy zahrnují především superoxiddismutázy, katalázy a glutathion peroxidázy.

Superoxiddismutázy (SOD) katalyzují přeměnu superoxidového radikálu na peroxid vodíku (McCord a Fridovich 1969):



Vyskytují se ve všech aerobních organismech a podle kovového kofaktoru, který vážou se dělí na Cu/Zn, Fe, Mn a Ni SOD, přičemž typ vázající mangan (Mn) se nachází v mitochondriích (\*Jomova *et al.*, 2024).

Katalázy a glutathion peroxidázy jsou enzymy, které se podílejí na vylučování peroxidu vodíku (vzniklého např. aktivitou SOD) a jeho rozkladu na kyslík a vodu. Glutathion peroxidáza chrání membrány a lipidy za použití glutathionu což je silný antioxidant, jenž redukuje ROS (\*Jomova *et al.*, 2024).

Za zmínku stojí i enzym thioredoxin peroxidáza V, jež dokáže redukovat peroxyinitrit (Dubuisson *et al.*, 2004).

### 7.2 Neenzymatické obranné mechanismy

Neenzymatické antioxidanty zahrnují molekuly, jež si naše tělo dokáže syntetizovat samo jako je glutathion, ubiquinol a kyselina močová. Patří sem i ty, jež si neumíme vytvořit a musí být přijaty v potravě jako je např. vitamin C, vitamin E a  $\beta$ -karoten (\*Birben *et al.*, 2012).

Ačkoliv je příjem antioxidantů ve stravě důležitý a mohou sloužit k prevenci před jistými onemocněními (Boushehri *et al.*, 2011), jejich nadměrný příjem, např. ve formě

suplementů, může mít i negativní dopady vyplývající z porušení rovnováhy mezi oxidanty a antioxidanty (Zhang *et al.*, 2021).

## **8 Efekt oxidačního stresu na mitochondrie**

Mitochondrie jsou esenciální semiautonomní organely v eukaryotických buňkách. Produkují většinu energie pro buňku ve formě ATP pomocí svého dýchacího řetězce viz kapitola 6.1. Kromě tvorby ATP se v nich odehrává i Krebsův cyklus, beta-oxidace mastných kyselin, syntéza Fe-S klastrů a hrají klíčovou roli v regulaci buněčné smrti. Jelikož jsou mitochondrie producentem ROS bývají i první částí buňky, jež je zasažena jejich negativními účinky.

### **8.1 Efekt oxidačního stresu na mitochondriální DNA**

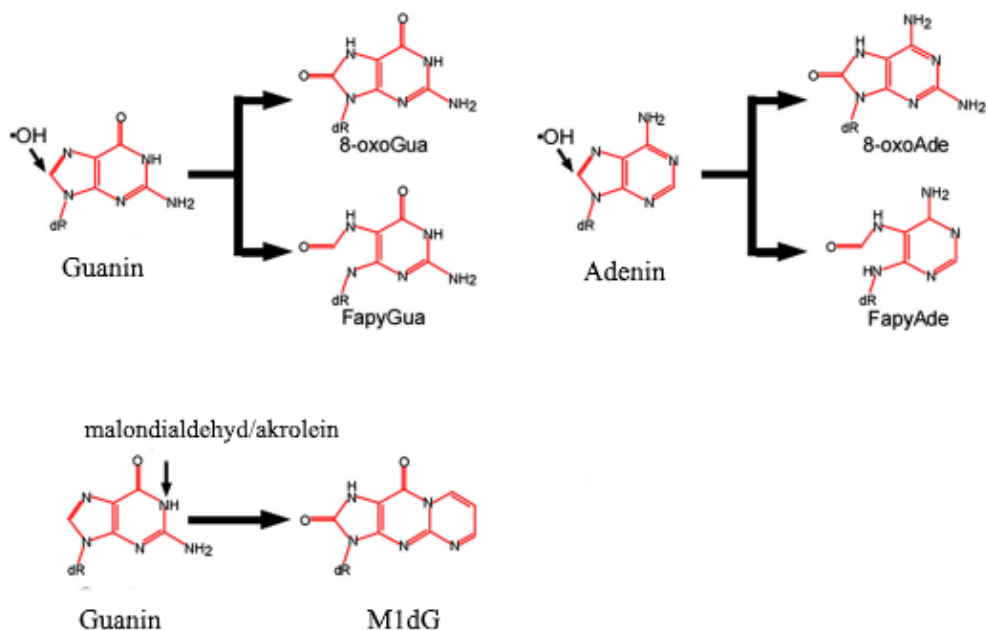
Mitochondriální DNA (mtDNA) je uzavřená kruhová molekula bez histonů upevněna k vnitřní mitochondriální membráně. Lidská mtDNA kóduje 2 ribozomální RNA, 22 transferových RNA a 13 proteinů dýchacího řetězce, jelikož velká část genů byla v průběhu evoluce přemístěna do jádra (\*De Giorgi a Saccone 1989). Kvůli absenci ochranné vrstvy a blízkosti dýchacího řetězce je mtDNA velmi náchylná na poškození oxidací ROS (Yakes a Van Houten 1997). Mitochondrie proto obsahují opravné mechanismy pro opravu poškození ROS, jako je např. enzym 8-oxoguanine glykosyláza (viz kapitola 8.1.1), která odstraní modifikovanou bázi (Takao *et al.*, 1998). Počet oxidovaných bází v mtDNA je i přesto 16krát větší než v jádře (Richter, Park, a Ames 1988).

V mtDNA zároveň dochází častěji ke zlomům, které mohou vést až k degradaci mtDNA (Shokolenko *et al.*, 2009). Tvorba zlomů a následná degradace mtDNA ovšem může sloužit jako ochrana před nadměrnou akumulací mutací způsobených ROS viz kapitola 8.1.1.

#### **8.1.1 Báze modifikované reaktivními formami kyslíku**

Při reakci ROS s bázemi dochází k jejich modifikaci viz obr. 4. Mezi nejběžnější produkt oxidace bází patří 8-oxo-7,8-dihydroguanine, jenž vzniká oxidací hydroxylovým radikálem.





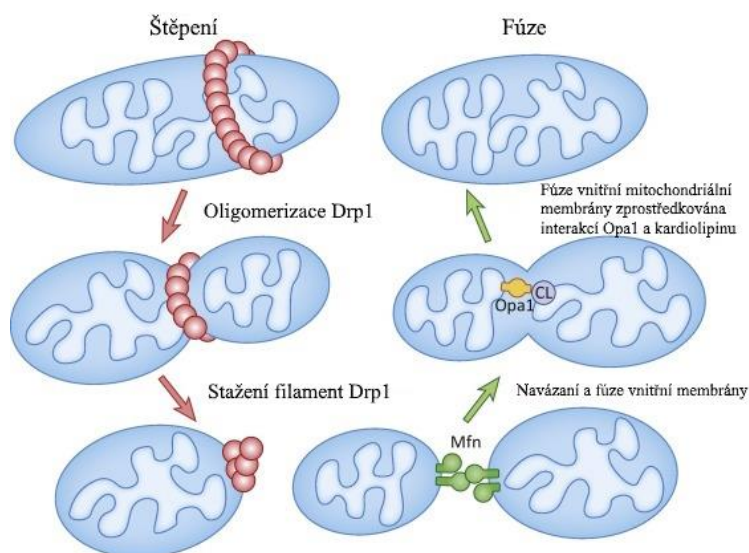
Obr. 4: Příklady modifikovaných bází v mtDNA. Malondialdehyd a akrolein vznikají při reakci hydroxylového radikálu nebo peroxynitritu s nukleotidy a lipidy. Výsledný M1dG pak byl detekován ve zvýšené koncentraci u osob vystavených karcinogenním látkám, jako je azbest (Bonassi *et al.*, 2017). Většina těchto modifikací může sloužit jako marker oxidačního stresu (\*Huang, Chen, a Zhang 2020, upraveno).

Běžná mutagení modifikace guaninu je 8-oxo-7,8-dihydroguanin (8-oxoGua), který ovlivňuje i čtení sousedních pyrimidinů polymerázou (Kuchino *et al.*, 1987). Koncentrace 8-oxoGua v mtDNA se zvyšuje s věkem (Fraga *et al.*, 1990). Enzym 8-oxoguanine glykosyláza (OGG1) je zodpovědný za odstranění této modifikované báze a nízká aktivita OGG1 v mitochondriích byla zaznamenána u plicních (Karahalil, Bohr, a Souza-Pinto 2015) a prostatických nádorů (Trzeciak 2004). Kromě 8-oxoGua, odstraňuje OGG1 i oxidované báze FapyGua a FapyAde, které se hromadí v nepřítomnosti tohoto enzymu (Hu *et al.*, 2005).

## 8.2 Efekt oxidačního stresu na morfologii mitochondrií

Morfologie mitochondrií může významně ovlivnit jejich funkci. Za fyziologických podmínek mitochondrie často tvoří jednu souvislou mitochondriální síť, spíše než osamocené mitochondrie. Mitochondriální síť se nachází především u metabolicky a energeticky aktivních buněk jako jsou kardiomyocyty, jelikož umožňuje efektivnější promíchání obsahu a zvýšení respirační aktivity (Amchenkova *et al.*, 1988). Osamocené mitochondrie pak mohou vznikat fragmentací z mitochondriální sítě. Výsledná morfologie mitochondrií je tak závislá na dvou důležitých mechanismech: štěpení a fúzi.

Štěpení a fúze jsou důležité mechanismy určující tvar, velikost a počet mitochondrií viz obr. 5. Štěpení zprostředkovává protein Drp1 (Dnm1p u kvasinek) a fúzi zprostředkovávají proteiny Mfn1, Mfn2 a Opa1. Proteiny Mfn1 a Mfn 2 se nachází na vnější mitochondriální membráně, kterou fúzují s další mitochondriální membránou při kontaktu s jejími fúzními proteiny (Santel a Fuller 2001), k fúzi vnitřních membrán pak slouží Opa1 (Meeusen *et al.*, 2006). Protein Drp1 se vyskytuje v cytosolu a je vázán proteinem hFis1 na vnější mitochondriální membránu k zaškrcení a odštěpení mitochondrie. Lokalizace štěpení může být určena endoplazmatickým retikulem a jeho blízkostí k mitochondrii (Friedman *et al.*, 2011). Proteiny štěpení a fúze se neúčastní pouze tohoto procesu, např. Opa1 se podílí na úpravě záhybů (tzv. cristae) na vnitřní mitochondriální membráně (Frezza *et al.*, 2006).

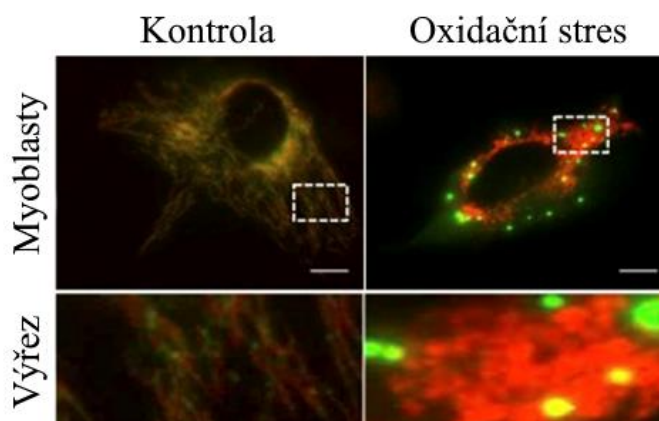


Obr. 5: Mitochondriální štěpení a fúze. Kardiolipin (CL) je fosfolipid, který interaguje s Opa1 při fúzi mitochondrií. Mfn je souhrnné označení pro fúzní proteiny Mfn1 a Mfn2 (\*Kameoka *et al.*, 2018, upraveno).

Oxidační stres velmi ovlivňuje mitochondriální morfologii. V buňkách HeLa a u fibroblastů bylo detekováno zvýšené štěpení mitochondriální sítě a shromažďování mitochondrií poblíž jádra po přidání peroxidu vodíku a inhibitorů dýchacího řetězce (Pletjushkina *et al.*, 2006). Štěpení mitochondrií by mohlo sloužit k odstranění defektních mitochondrií, jež se štěpí, dokud nevytvoří fragmenty dost malé na to, aby byly degradovány mitofágií viz kapitola 8.4 (Pletjushkina *et al.*, 2006). Pozitivní účinek této degradace potvrzují i experimenty s mitochondriemi bez Drp1, bez kterého dojde k vytvoření velkých mitochondrií, které akumulují ROS (Kageyama *et al.*, 2012).

Vliv peroxidu vodíku byl ukázán také u myoblastů. Zde došlo postupně ke snížení membránového potenciálu (viz kapitola 8.3), snížení příjmu kyslíku až konečně k fragmentaci mitochondrií viz obr. 6.

Obr. 6: Mitochondrie myoblastů po působení oxidačního stresu. Mitochondrie jsou značeny červeně, protein Drp1 zeleně. Kontrola vlevo má dlouhé vláknité mitochondrie, které tvoří síť. Mitochondrie vpravo po 5 hodinách s 300 $\mu$ M peroxidem vodíku jsou fragmentované, malé a zakulacené. Bíle šrafovaný obdélník označuje zvětšenou oblast níže (Výřez) Měřítko: 10 $\mu$ m (Iqbal a Hood 2014, upraveno).



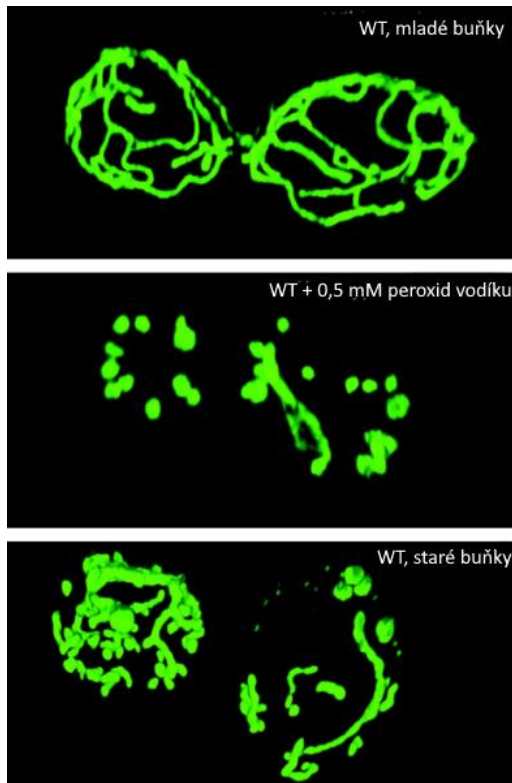
Další možností, jak indukovat oxidační stres je vysoce účinný – nízko výkoný laser HF-LP. Tato metoda je vysoce specifická a umožňuje tak tvorbu ROS přímo v mitochondriích bez ovlivnění jiných funkcí buňky. Vytvořené mitochondriální ROS indukovaly štěpení mitochondrií díky inhibici fúze a navýšené expresi proteinu Drp1 (Wu *et al.*, 2011).

Vytvoření podmínek hyperglykémie může také vyvolat oxidační stres a morfologické změny mitochondrií např. u krysích myoblastů a buněk jater. Vysoká hladina glukózy vede k fragmentaci a tvorbě malých a krátkých mitochondrií již během 15 minut po inkubaci a současně k vysoké produkci ROS. Dále fragmentace mitochondrií vede ke zvýšené respiraci, zvýšení membránového potenciálu a zvýšené produkci ROS. Fragmentace je zde, spíše než produktem, producentem ROS (Yu, Robotham, a Yoon 2006).

Dále např. stárnutím buněk hnědé tukové tkáně myši dochází ke zvýšené produkci ROS a fragmentaci mitochondriálních krist. Stárnutí vede i ke snížené hustotě, rozloze a velikosti krist, zatímco mitochondrie se zvětšují. Díky deformovaným kristám mají mitochondrie problémy s tvorbou ATP a dochází k vyšší produkci ROS v dýchacím řetězci. Mitochondrie se pravděpodobně zvětšují, aby kompenzovali nedostatečnou funkci krist, jejichž morfologie byla poškozena (Crabtree *et al.*, 2024).

Kvasinkové buňky podléhají oxidačnímu stresu podobným způsobem jako savčí. Zajímavý je rozdíl mezi třemi kulturami: kontrolní, s peroxidem vodíku a stárnoucí viz obr. 7

(\*Breitenbach *et al.*, 2014). Kontrolní kultura s mladými buňkami má složitou zdravou mitochondriální síť. V mladé kultuře, do které byl přidán peroxid vodíku, dochází ke zmenšení a zakulacení mitochondrií vlivem oxidačního stresu (Chelius *et al.*, 2023). Oxidační stres je vysoký i u stárnoucích buněk, takže zde jsou mitochondrie také malé a kulaté (Volejníková *et al.*, 2013) (Jakubowski, Biliński, a Bartosz 2000). Mitochondrie buněk s peroxidem vodíku se ale mohou vrátit do původního stavu mitochondriální sítě po ukončení oxidačního stresu.



*Obr. 7: Kvasinkové mitochondrie v mladých buňkách po působení oxidačního stresu a ve starých buňkách (zvětšení: 60x). Mitochondrie značené fluorescenčním proteinem GFP. WT označuje buňky kontrolní. Viditelný je rozdíl ve fragmentaci mitochondriální sítě (\*Breitenbach *et al.*, 2014, upraveno).*

### 8.3 Efekt oxidačního stresu na membránový potenciál mitochondrií

Mitochondriální membránový potenciál ( $\Delta\Psi$ ) je elektrochemický gradient na vnitřní mitochondriální membráně. Vytváří ho protonový gradient, jenž je generován proteiny dýchacího řetězce, jež pumpují protony do mezimembránového prostoru. Membránový potenciál pak stojí za vznikem ATP. Je proto důležité udržet jeho hodnotu na optimální hladině.

Mitochondrie s nízkým membránovým potenciálem mají nedostatečnou produkci ATP, tím pádem ztrácejí význam pro buňku, jakožto producenti energie. Nízký membránový potenciál vede dokonce k příliš malé produkci ROS. Dochází tak k narušení redoxní signalizace (viz kapitola 6), což je pro buňku skoro stejně nebezpečné jako oxidační stres

(Rajasekaran *et al.*, 2007). Takovéto mitochondrie podléhají degradaci procesem zvaným mitofágie viz kapitola 8.4 (Jin *et al.*, 2010). Membránový potenciál tak může být definujícím faktorem pro výběr defektních mitochondrií určených k mitofágii.

Za určitých podmínek dochází místo k mitofágii přímo ke smrti buněk s nízkým membránovým potenciálem např. u PC12 buněk. Nízký membránový potenciál je zde způsoben ROS, jejichž produkce je způsobena interakcemi volných kovových iontů (např. volného železa, či mědi) s peptidy A $\beta$  (Amyloid beta) (\*Cheignon *et al.*, 2018), jež jsou charakteristické pro Alzheimerovu chorobu. Jednou z příčin Alzheimerovy choroby je právě zvýšená úmrtnost neuronů, která může souviset s nízkou hladinou membránového potenciálu mitochondrií (Zhang *et al.*, 2022).

Mitochondrie s příliš vysokým membránovým potenciálem mají zvýšenou produkci ROS, jež mohou být pro buňku nebezpečné. Například zvýšení membránového potenciálu u buněk krysího srdce vedlo k produkci peroxidu vodíku (Korshunov, Skulachev, a Starkov 1997). Vysoký membránový potenciál a s ním spojená i zvýšená produkce ROS, je nebezpečný pouze pokud trvá déle (Gergely *et al.*, 2002). Tvorba ROS je tedy závislá na membránovém potenciálu mitochondrií.

ROS ovšem mohou ovlivnit stabilitu membránového potenciálu tím, že depolarizují membránu (Slodzinski, Aon, a O'Rourke 2008). U kardiomyocytů morčete dochází při zvýšené produkci ROS a vyčerpání glutathionu (viz kapitola 7) k depolarizaci mitochondriální membrány, což může vést až k otevření mitochondriálního póru přechodné propustnosti. Tento pór se otvírá pouze při stimulaci např. oxidačním stresem a vede ke kolapsu membránového potenciálu mitochondrií a vypuštění apoptických faktorů do cytoplazmy (Slodzinski, Aon, a O'Rourke 2008). Apoptické faktory, jako je cytochrom c, pak indukují signalizaci vedoucí ke smrti buňky. Otevřený pór zároveň umožní vypuštění dalších ROS do cytoplazmy a tím stimulaci produkce ROS okolními mitochondriemi (Zorov *et al.*, 2000).

## **8.4 Efekt oxidačního stresu na autofágii mitochondrií**

Autofágie mitochondrií tzv. mitofágie slouží k degradaci těchto organel v buňce. Zahrnuje obalení organely dvojitou membránou a tvorbu tzv. autofagozomu, který následně fúzuje s lysozomem nebo s vakuolou v případě kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* a organela je degradována. Mitochondrie bývají většinou degradovány kvůli jejich poškození, či nepotřebnosti. (Frank *et al.*, 2012).

Membránový potenciál je jeden z faktorů ovlivňujících mitofágii. Příliš nízký membránový potenciál zvyšuje pravděpodobnost degradace mitochondrie kvůli její dysfunkčnosti (Jin *et al.*, 2010). U savčích buněk např. světelným ozařováním došlo k depolarizaci mitochondriální membrány a indukci mitofágie, zatímco ostatní orgány zůstaly neovlivněny (Kim a Lemasters 2011). Buňka mitofágií rovněž eliminuje i mitochondrie s příliš mutovanou mtDNA (Suen *et al.*, 2010).

V mitofágii hrají důležitou roli procesy štěpení a fúze mitochondrií viz kapitola 8.2. Štěpení mitochondrií odděluje zdravé a dysfunkční mitochondrie, které následně podléhají mitofágii. Úlohu štěpení v mitofágii ukazuje např. nízká exprese proteinu Drp1, při které dochází k zvýšené resistenci mitochondrií k ROS, jež následně vede k inhibici mitofágie (Mai *et al.*, 2010). Významnou roli v mitofágii dysfunkčních mitochondrií, které mají nízký mitochondriální membránový potenciál mají proteiny Parkin a PINK1. V odklizení nadbytečných mitochondrií např. za hypoxie se zase uplatňuje protein FUNDC1 (Chen *et al.*, 2024). Pro mitofágii u kvasinek je klíčový protein Atg32 viz kapitola 8.4.1.

#### **8.4.1 Efekt oxidačního stresu na mitofágii u kvasinek**

V *Saccharomyces cerevisiae* receptorový protein Atg32 interaguje s proteinem Atg11 a indukuje mitofágii. Za standartních podmínek nemá ztráta proteinu Atg32 na mitofágii velký vliv (Okamoto, Kondo-Okamoto, a Ohsumi 2009). Ale za stresových podmínek, např. při nízké hladině glukózy dochází k ovlivnění životaschopnosti kvasinek bez Atg32. Tyto buňky mají kratší délku života a mají fragmentované mitochondrie s nízkým membránovým potenciálem, nízkou spotřebou kyslíku a zvýšenou produkcí ROS. ROS zde poškozují proteiny a lipidy až nakonec dochází i k vypouštění cytochromu c z mitochondrií, což indukuje apoptózu (Richard *et al.*, 2013).

Při přidání ethanolu, jenž indukuje produkci ROS a mitofágii, k buňkám bez Atg32 a Atg11 došlo k narušení stability mitochondriální membrány a mitochondriálního membránového potenciálu (Jing *et al.*, 2020). Dále u buněk bez Atg32 nebo Atg11 za nedostatečného zdroje dusíku dochází k inhibici mitofágie defektních mitochondrií. Tyto defektní mitochondrie následně produkují nadměrné množství ROS, což vede k oxidačnímu stresu a poškození mtDNA (Kurihara *et al.*, 2012). Mitofágie zde tedy slouží jako prevence před oxidačním stresem dysfunkčními mitochondriemi.

Samotná exprese Atg32 a Atg11 pak může být ovlivněna hladinou ROS. Kvasinky v přítomnosti ethanolu, který dokáže indukovat mitofáгии, mají zvýšené hladiny peroxidu vodíku a superoxidového radikálu, což vede k navýšení exprese Atg32 a Atg11. Přidáním antioxidantů se sníží hladina ROS a exprese Atg32 a Atg11 a dochází k utlumení mitofáגיע. Zároveň přidáním blokátorů antioxidačních enzymů dochází ke zvýšení hladiny ROS a nadměrné expresi Atg32 a Atg11, a tím pádem ke zvýšené hladině mitofáגיע. ROS tedy ovlivňují mitofáגיע kontrolou exprese Atg32 a Atg11 (Jing *et al.*, 2020).

Zajímavý způsob indukce oxidačního stresu je použití trichothecenových mykotoxinů, jež se vyskytují v obilovinách jako je oves, či proso. Trichothecen přímo napadá mitochondrie a způsobuje tak zvýšení produkce ROS. Mutantní buňky bez proteinu Atg32 měli sníženou životaschopnost a hromadily se v nich ROS. Buňky tak pomocí mitofáגיע pravděpodobně odstraňovaly trichothecenem poškozené mitochondrie, aby zabránily nadměrné produkci ROS (Bin-Umer *et al.*, 2014).

#### **8.4.2 Efekt oxidačního stresu na mitofáגיע u savčích buněk**

V savčích buňkách vede mírně zvýšená hladina ROS (např. po přidání peroxidu vodíku) k mitofáגיע pomocí proteinu Drp1 a slouží k odstranění dysfunkčních mitochondrií. Naopak hladovění způsobuje vysoce zvýšenou hladinu ROS a zvýšenou fúzi mitochondrií. Fúze chrání před mitofáגיע a pomáhá udržet produkci ATP. U hladovějících buněk tedy byla mitofáגיע pomocí Drp1 nízká. U buněk bez Drp1 pak dokonce nedochází k mitofáגיע vůbec ani vlivem mírného oxidačního stresu peroxidem vodíku nebo vysokého oxidačního stresu při hladovění (Frank *et al.*, 2012).

Dále mitofáגיע poškozených mitochondrií se sníženým membránovým potenciálem, jež je závislá na proteinech PINK1 a Parkin, je iniciována ROS. Po přidání ionoforu, jež indukuje tvorbu pórů v membráně mitochondrií a její následnou depolarizaci, dochází rovněž k uvolnění velkého množství ROS. Po přidání antioxidantu, jež vychytává ROS, došlo k výraznému snížení mitofáגיע závislé na PINK1 a Parkin proteinech. Podobně k indukci mitofáגיע přispěla vyšší koncentrace ROS v buňce vyvolaná nadprodukcí napěťově závislého aniontového kanálu 1 (VDAC1) (Xiao *et al.*, 2017).

Důležitost ROS v regulaci mitofáגיע ukazuje také indukce mitofáגיע kadmiem v myším mozku. Kadmium je toxický kov, jež způsobuje vyšší produkci ROS a mitofáגיע. Přidáním antioxidantů došlo k repolarizaci membránového potenciálu, obnovení původního

množství mitochondrií, snížení hodnot PINK1 a snížení asociace proteinu Parkin s mitochondriemi. Ale při přidání inhibitoru pro mitofágií nedošlo ke snížení koncentrace ROS, což naznačuje, že ROS indukují mitofágií pomocí PINK1 a Parkin díky snížení membránového potenciálu (např. pomocí otevření mitochondriálního póru přechodné propustnosti) a změnám v koncentracích proteinů PINK1 a Parkin (Wei *et al.*, 2015).

Produkce ROS v mitochondriích může být indukována např. pomocí proteinu mtKR (z angl. Mitochondrial Killer Red). Při ozáření laserem protein mtKR produkuje ROS. Krátce zvýšená koncentrace ROS od proteinu mtKR napodobuje signalizaci. Vzniklé ROS snižují membránový potenciál a následně aktivují mitofágií přes PINK1 a Parkin. Zároveň je zajímavé, že dlouhé mitochondrie jsou více rezistentní vůči mitofágií díky zvýšené odolnosti na poškození způsobené ROS (Wang *et al.*, 2012). ROS se tedy u savců dají považovat za signální molekuly, jež indukují mitofágií přes procesy jako je např. změna morfologie či změna membránového potenciálu mitochondrií.

## 9 Metody pro kvantifikaci morfologických změn mitochondrií

Pro kvantifikaci morfologických změn je nejdříve nutné pořídit obrázky či videa mitochondrií mikroskopem. Nejčastěji se k tomuto účelu používají fluorescenčně označené mitochondrie zaznamenané standartním fluorescenčním mikroskopem se širokým zorným polem nebo konfokálním mikroskopem pro získání 3D obrázků (Yin a Shen 2022). K detekci mitochondrií je možné také použít pokročilé mikroskopické techniky umožňující superrezoluční zobrazení jako např. STED nebo SIM, které jsou ale časově a finančně nákladné (Yang *et al.*, 2020).

Mitochondrie se často značí fluorescenčními proteiny jako je např. zelený fluorescenční protein GFP nebo fluorescenčními barvivy jako je např. JC1 a TMRM viz kapitola 10. Byla vytvořena i nová fluorescenční barviva jako je např. MitoESq-635, jež je odolnější vůči fotonům a účinněji se váže k mitochondriím. MitoESq-645 byl použit např. pro pozorování mitochondriálních krist při procesech štěpení a fúze. K detekci byla použita superrozlišovací STED mikroskopie, což umožnilo rozlišení ~35 nm na rozdíl od standartní fluorescenční mikroskopie, jež má rozlišení ~300 nm (Yang *et al.*, 2020).

K analýze získaných obrázků fluorescenčně značených mitochondrií se pak používají různé softwary např. McClatchey a kolegové vytvořili software, který dokáže změřit délku, šířku, prostorové rozmístění a umístění mitochondrií ve fixovaných buňkách, jejichž obrázky



byly získány konfokálním mikroskopem (McClatchey *et al.*, 2016). Správnost výsledků softwaru byla potvrzena i subjektivním pozorováním a porovnáním s výsledky jiných studií. Zde vyvinutý software je velice citlivý a poskytuje obecné výsledky (např. průměrná délka či šířka), které lze měřit i pomocí jiných technik. Zároveň umožňuje analýzu většího množství vzorků a může být použit i na živé buňky a jiné organely jako např. Golgiho aparát nebo endoplazmatické retikulum (McClatchey *et al.*, 2016).

Další možností kvantifikace morfologických změn mitochondrií je např. využití veřejně dostupného softwaru ImageJ/Fiji, který obsahuje řadu nástrojů pro analýzu obrazu. Ten byl použit na mitochondrie neuronů, jež byly označeny fluorescenčním barvivem MitoTrackerem a protilátkami. Překryv obou barev sloužil k detekci mitochondrií, jež byly segmentovány (odlišení mitochondrií od pozadí) a následně analyzovány v ImageJ/Fiji. Byly určeny čtyři hlavní parametry mitochondrií – počet, velikost, tvar a parametr popisující mitochondriální síť (tzv. „interconnectivity“), které byly využity k důkladnému posouzení mitochondriální morfologie. Pomocí tohoto přístupu byly detekovány významné rozdíly mezi mitochondriemi v těle neuronu a v jeho výběžcích. (Wiemerslage a Lee 2016).

Dále byl např. vytvořen software MitoMo, který jako vstupní data používá obrázky a videa. Pomocí umělé inteligence pak umí popsat morfologický typ mitochondrií (kulaté, vláknité a nafouklé), jejich texturu a pohyb a umí je analyzovat jak jednotlivě, tak i jako celek v rámci buňky. Díky porovnávání vzorků se zdravými buňkami dokáže detekovat i jinak nedetekovatelné změny v morfologii a pohybu. Zároveň dokáže rozlišit buněčné typy pomocí textury mitochondriální sítě např. odlišit primární lidské plicní fibroblasty (hPF) od buněk lidské plicní nádorové linie (A549). MitoMo může být použit na jakýkoliv buněčný typ s jakýmkoliv barvivem cíleným na mitochondrie, lze ho dokonce používat bez znalostí v programování a může být aplikován i na jiné organely např. lysozomy (Zahedi *et al.*, 2018).

Další často používaný software je např. MitoSegNet, který využívá umělou inteligenci (tzv. hluboké učení využívající složitou vícevrstevnou neuronovou síť) k detekci morfologických změn mitochondrií, např. u *C. elegans* nebo buněk HeLa. Jeho výhodou je, že byl vyvinutý pro zpracování 2D obrazů a umožňuje velice přesnou segmentaci obrazu. Součástí MitoSegNet je rovněž program, který umožňuje kvantifikaci morfologických parametrů jako je např. plocha, obvod, poměr stran a další (Fischer *et al.*, 2020). Další výhodou MitoSegNetu je skutečnost, že použitou neuronovou síť je možné přetrénovat pro

detekci mitochondrií v jiných buněčných typech např. *Saccharomyces cerevisiae* (Vojtová *et al.*, v revizi) či dokonce pro detekci jiných organel.

## 10 Metody detekce membránového potenciálu mitochondrií

Významnými nástroji pro detekci membránového potenciálu jsou např. lipofilní fluorescenční barviva. Barviva mohou volně difundovat přes membrány a díky pozitivnímu náboji se hromadí v mitochondriální matrix dle hodnoty membránového potenciálu. Mitochondrie s vyšším membránovým potenciálem, tedy více negativní v matrix, tak nahromadí více barviva a tím vydávají silnější signál a *vice versa*. Fluorescence je pak opticky detekována např. fluorescenčním nebo konfokálním mikroskopem, či průtokovou cytometrií (Scaduto a Grotyohann 1999) (Mathur *et al.*, 2000). Další možností je použití selektivní elektrody, jež detekuje koncentraci barviva a tím membránový potenciál mitochondrií (Kamo *et al.*, 1979).

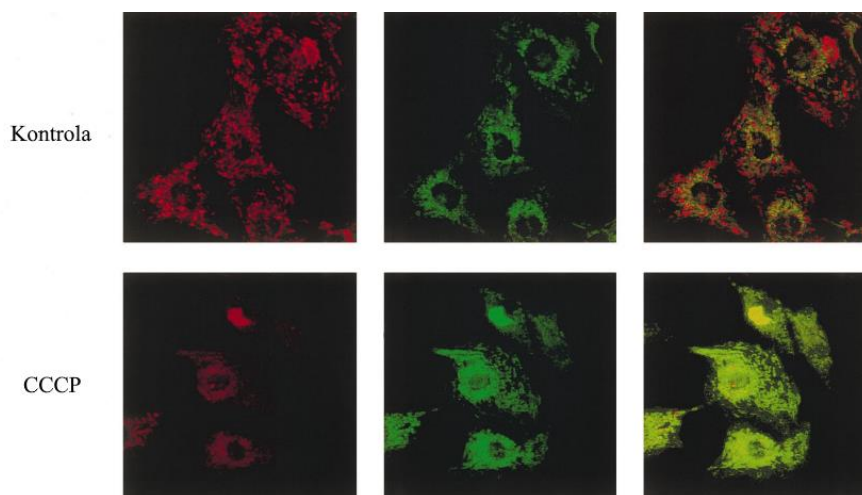
Mezi lipofilní fluorescenční barviva, jež byla použita pro měření membránového potenciálu mitochondrií např. u buněk krysího srdce patří rhodamin 123 (R123), tetrametylrodamin (TMRM) a tetrametylrodamin etyl ester (TMRE). Tato barviva mohou měnit své vlastnosti (např. emisní a excitační spektra) v závislosti na změnách membránového potenciálu mitochondrií. Změny bývají indukovány i látkami jako je např. m-chlorfenyl hydrazon (CCCP), 2,4-dinitrofenol (DNP) či FCCP. Tyto látky narušují protonový gradient a snižují membránový potenciál mitochondrií, což může vést až k vypuštění barviv z mitochondrie. Jejich použití tak umožňuje sledování hodnot membránového potenciálu mitochondrií v čase a kontrolu nad akumulací barviv. Ovšem i samotná barviva mohou negativně ovlivnit dýchací řetězec při vyšších koncentracích (Scaduto a Grotyohann 1999).

Existuje několik podmínek, které mohou ovlivnit finální měření membránového potenciálu mitochondrií. Asi nejdůležitějším parametrem je koncentrace barviv právě kvůli své toxicitě k dýchacímu řetězci, či k zahlcení matrix při vysoké koncentraci. Rovněž teplota je důležitá jak pro optimální akumulaci barviv dle potenciálu, tak pro intenzitu fluorescence např. intenzita fluorescence TMRM je ve 37 °C o 37,1% nižší než ve 22 °C. Dalším faktorem je koncentrace mitochondriálních proteinů např. nízká koncentrace proteinů snižuje akumulaci barviv a příliš vysoká koncentrace proteinů vytváří „pozadí“ na detekované fluorescenci (Scaduto a Grotyohann 1999).

Stejná barviva byla použita i na detekci membránového potenciálu mitochondrií u tkání z neporušeného srdce. Tato metoda zde ale není specifická pouze pro mitochondrie a jejich membránový potenciál, protože akumulace TMRM a změna jeho emisního a excitačního spektra se objevuje jak v mitochondriích, tak v cytosolu (Scaduto a Grotyohann 1999).

Pro spolehlivé měření určitých buněčných typů za specifických podmínek se používá i barvivo JC-1. Toto barvivo má dvě formy – červenou a zelenou, které lze odlišit podle emitované fluorescence viz obr. 8. Zelená forma je monomerní a má silnější signál v mitochondriích s nízkým potenciálem, zatímco červená forma vzniká tvorbou agregátů v mitochondriích s vyšším membránovým potenciálem. Poměr červené a zelené formy pak koreluje s hodnotou membránového potenciálu mitochondrií (Mathur *et al.*, 2000).

Například u krysích kardiomyocytů byla srovnávána schopnost detekovat změny membránového potenciálu po přidání CCCP pomocí barviv JC-1, Rho123, DiOC6(3) a CMXRos. Barvivo JC-1 bylo jediné, které dokázalo detekovat depolarizaci indukovanou CCCP. Ostatní barviva nedokázala detekovat změny potenciálu ani po úpravě koncentrace nebo změně látky ovlivňující potenciál z CCCP na FCCP. Všechna barviva však dokázala rozlišit živé a apoptotické buňky (Mathur *et al.*, 2000).



Obr. 8: Mitochondrie krysích kardiomyocytů značené JC-1 pod konfokální mikroskopem. Nalevo je červená (agregovaná) forma, uprostřed je zelená (monomerní) a napravo jsou obě formy, kde žlutá barva značí společnou lokalizaci obou signálů (Mathur *et al.*, 2000).

Podobným způsobem byly zkoumány i speciální lidské buňky, u kterých DiOC6(3) dokázal detekovat depolarizaci pomocí FCCP, na rozdíl od Rod123, ale s menší citlivostí než JC-1. Barviva DiOC6(3) a Rod123 ovšem nedokázali detekovat depolarizaci valinomycinem,

což ukazuje spolehlivost JC-1 při měření změn potenciálu pomocí chemikálií u této buněčné kultury (Salvioli *et al.*, 1997).

Fluorescence DiOC6(3) ovšem může být ovlivněna i přidáním KCl beze změny v membránovém potenciálu mitochondrií. (Salvioli *et al.*, 1997). Stejně tak se může fluorescence červené formy JC-1 měnit nezávisle na membránovém potenciálu mitochondrií např. při přidání peroxidu vodíku (Chinopoulos, Tretter, a Adam-Vizi 1999). Časová náročnost na dosažení rovnovážného rozprostření u červené formy je také její nevýhodou (Mathur *et al.*, 2000). Na podobném principu červené a zelené formy fluorescence jako JC-1 funguje i např. komerční MITO-ID kit, který je ale 10× citlivější než JC-1 a díky lepší rozpustnosti ve vodě a rychlejšímu použití je praktičtější pro detekci membránového potenciálu živých buněk (Kaczmarek, Wrońska, a Boguś 2023).

Další možností pro sledování membránového mitochondriálního potenciálu je např. využití mechanismu Försterova rezonančního přenosu energie FRET (z angl. Förster Resonance Energy Transfer). Mechanismus FRET je založen na těsném kontaktu dvou fluoroforů, zde donoru G-1 a akceptoru MTR-1. Po excitaci vnějším světelným zdrojem může donorový fluorofor přenést svou energii na akceptorový fluorofor, který absorbuje tuto energii a emituje světlo o jiné vlnové délce. Za standardních podmínek jsou v živých buňkách oba fluorofory navázané na mitochondrie a buňky vykazují silnou červenou fluorescenci akceptoru MTR-1. Při ztrátě membránového potenciálu (např. po působení CCCP nebo peroxidu vodíku) dochází k přemístění akceptoru MTR-1 na RNA a donoru G-1 na jiné organely. Buňky v tomto případě vykazují silnou zelenou fluorescenci donoru. Potenciál je následně změřen poměrem emisí G-1 a MTR-1 a udává spolehlivější hodnoty než měření emise jednoho barviva (Sun, Tian, a Lin 2020).

Tetrafenylfosfonium (TPP) je další barvivo používané pro měření membránového potenciálu mitochondrií. TPP bylo použito např. u *Saccharomyces cerevisiae* při zkoumání změn membránového potenciálu mitochondrií v závislosti na pyrofosfátu a ATP. Ačkoliv je TPP jedna z nejcitlivějších metod na detekci membránového potenciálu, může se na mitochondrie vázat i nespecificky (Pereira-da-Silva *et al.*, 1993). Kromě TPP lze u *Saccharomyces cerevisiae* použít i např. barvivo DiOC6(3). Při nízkých koncentracích se DiOC6(3) u *Saccharomyces cerevisiae* specificky váže pouze na mitochondrie a umožňuje i citlivou detekci změn membránového potenciálu mitochondrií např. při narušení dýchacího řetězce (Petit *et al.*, 1996).

## 11 Metody detekce mitofágie u *Saccharomyces cerevisiae*

Mitofágie slouží k odstraňování nadbytečných či nefunkčních mitochondrií v eukaryotických buňkách. Pro detekci mitofágie u *Saccharomyces cerevisiae* se využívají především mitochondriální proteiny označené fluorescenčním proteinem např. GFP nebo mCherry. Jako příklad lze uvést protein DHFR, který se nachází v mitochondriální matrix a má na svém C-konci navázaný protein mCherry. Při mitofágii dochází k degradaci DHFR-mCherry ve vakuole a uvolnění mCherry. Fluorescence mCherry ve vakuole může být sledována pomocí mikroskopie a vakuoly mohou být v kvasince identifikovány pomocí tzv. diferenciálního interferenčního kontrastu (DIC) nebo označeny fluorescenčně. Detekce pomocí mikroskopie ale neumožňuje kvantitativní analýzu mitofágie. Pro semikvantitativní analýzu se využívá metoda Western blot, při které je pomocí protilátek detekován jak celý fúzní protein, tak jeho zkrácená forma po degradaci ve vakuole. V tomto případě se využívá skutečnosti, že fluorescenční protein dopravený do vakuoly je odolný vůči degradaci vakuolárními proteázami (Kondo-Okamoto *et al.*, 2012) (Eiyama *et al.*, 2024). Nejčastěji jsou pro tento typ analýzy využívány fúzní proteiny s GFP, které po degradaci ve vakuole poskytují 27 kDa fragment. Mezi tyto proteiny patří např. protein Om45 či Idh1 u *Saccharomyces cerevisiae*. Při degradaci těchto proteinů ve vakuole při mitofágii dochází k uvolnění GFP. GFP je ve vakuole relativně stabilní a bývá z ní většinou uvolněn bez porušení. Pomocí Om45-GFP a Idh1-GFP bylo např. zjištěno, že dojde k zastavení mitofágie u buněk bez proteinu Atg1,2,4,6-16,18 a 32 (Kanki, Kang, a Klionsky 2009).

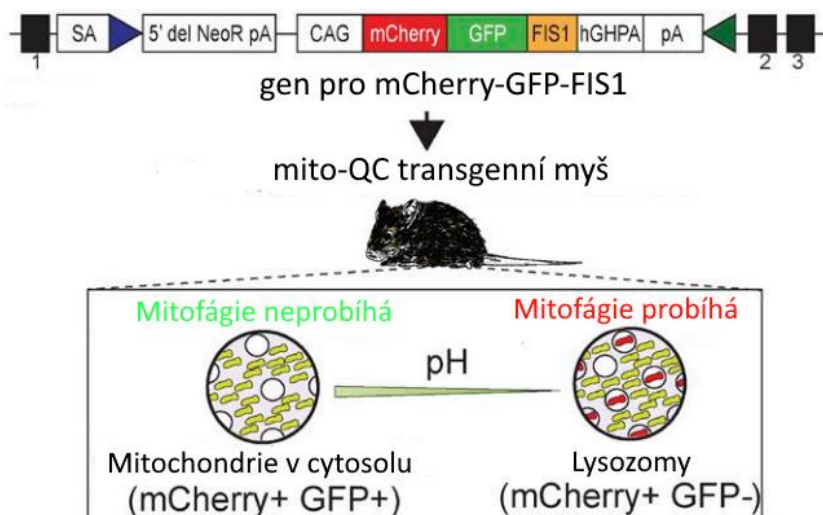
Další metoda pro detekci mitofágie u kvasinek je stanovení enzymatické aktivity alkalické fosfatázy Pho8 $\Delta$ 60, kterou lze použít pro kvantitativní analýzu. Alkalická fosfatáza je transmembránový protein, jenž je fúzován s proteinem Cox4 ve vnitřní membráně mitochondrií. Alkalická fosfatáza má na svém C-konci peptid, jenž brání její aktivitě. Při mitofágii dochází k odstranění tohoto peptidu ve vakuole a aktivaci fosfatázy. Za standartních podmínek je aktivita fosfatázy nízká, díky tomu aktivita Pho8 $\Delta$ 60 koreluje s intenzitou mitofágie (Yao, Liu, a Klionsky 2017).

Často používaný je ještě např. mitochondriální fluorescenční reportér Rosella (Zeinoun, Teixeira, a Barascu 2024). Reportér Rosella je složen z N-koncové sekvence, která zajišťuje vazbu na mitochondrie a dvou fluorescenčních proteinů – červeného a zeleného – přičemž zelený je deaktivován v kyselém pH např. ve vakuole u *Saccharomyces cerevisiae*. Při mitofágii tak dochází ke snížení poměru mezi zelenou a červenou fluorescencí a vzniká oblast

pouze s červenou fluorescencí. Pro potvrzení umístění vakuoly se může použít CMAC-Arg, což je barvivo, jež se váže na vakuolu a vyzařuje světle modrou fluorescenci. Touto metodou byl pozorován např. vliv Atg3 na mitofáгии, přičemž jeho delece vedla k zablokování mitofáгии. Využití Roselly je jednoduché a získání výsledků je relativně rychlé (Mijaljica, Prescott, a Devenish 2011). Kromě *Saccharomyces cerevisiae* lze Rosellu aplikovat i na tvorbu transgenních organismů např. *Caenorhabditis elegans* se značenými svalovými buňkami těla (Fang *et al.*, 2017).

## 12 Metody detekce mitofáгии u savčích buněk

Pro detekci mitofáгии v savčích buňkách může být využita např. transgenní myš mito-QC viz obr. 9. Zde je fluorescenční protein mCherry společně s GFP navázán na protein FIS1, jenž se nachází na vnější membráně mitochondrií. V ustáleném stavu lze pozorovat žlutou fluorescenci (překryv červené a zelené). Při mitofáгии dochází k rozštěpení proteinů v lysosomu, zde zůstává fluorescence mCherry stabilní ve formě červených teček, jež lze kvantifikovat, zatímco zelený signál GFP je utlumen příliš kyselým pH. Tato technika umožňuje vizualizovat najednou mitofáгии i morfologii mitochondrií *in vivo* v jednotlivých buňkách, a dokonce v několika orgánech např. v srdci či ledvinách (McWilliams *et al.*, 2016).

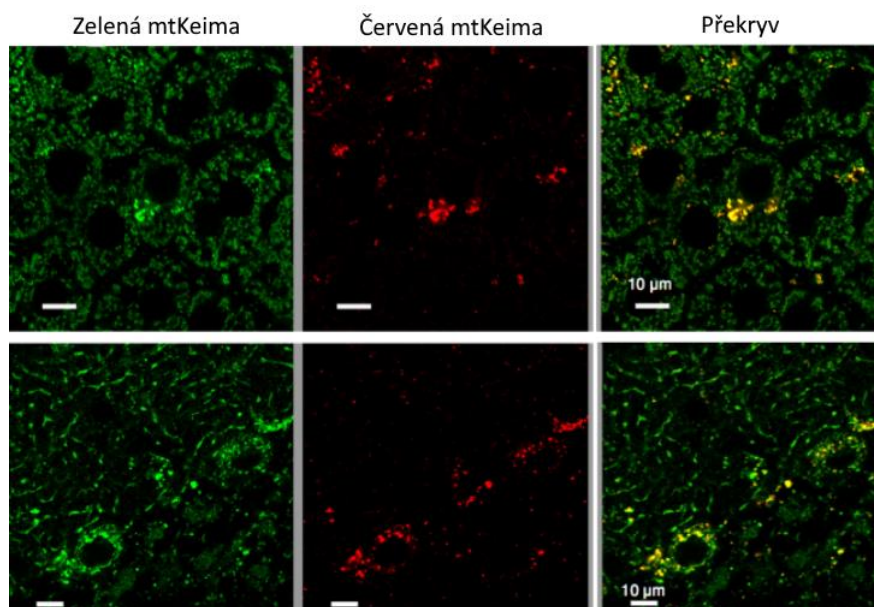


Obr. 9: Schéma konstruktů pro přípravu transgenní myši mito-QC a způsob, jakým funguje detekce pomocí vložených genů mCherry a GFP (McWilliams *et al.*, 2016).

K detekci mitofáгии lze také použít protein LC3 s navázaným EGFP, což je vylepšená varianta GFP se silnějším zářením. EGFP-LC3 se nachází ve vnější i vnitřní membráně autofagozomu, který slouží k pohlcení mitochondrií při mitofáгии. Mitochondrie jsou značeny červeným fluorescenčním barvivem Mito-Tracker Red. Pohlcením mitochondrií autofagozómem dochází k překryvu zeleného a červeného signálu, což značí mitofáгии.

Zelený signál EGFP ovšem zmizí po fúzi autofagozómu s lysozomem kvůli příliš nízkému pH. Překryvem těchto fluorescenčních signálů nelze kvantitativně vyhodnotit mitofáгии. Dále může docházet i k falešným pozitivním výsledkům kvůli agregaci LC3 v místech, kde nedochází k mitofáгии (Liu *et al.*, 2022). EGFP lze pak společně s mCherry využít pro detekci mitofáגיע např. v buňkách slinivky břišní v transgenní myši CMMR (z angl. Conditional Mitochondrial Matrix Reporter) u buněk slinivky břišní, kde detekce mitofáגיע funguje na podobném principu jako u myši mito-QC (Aoyagi *et al.*, 2023).

Další fluorescenční protein, který je možné využít pro studium mitofáגיע v savčích buňkách je protein mt-Keima, jenž se specificky váže na mitochondrie. Excitační vlnová délka mt-Keima je 440 nm při neutrálním pH, kdy dochází k zelené fluorescenci a 586 nm při kyselém pH, kdy dochází k červené fluorescenci. Díky závislosti excitačních vlnových délek na pH lze přesně detekovat, kdy dochází k mitofáגיע (Liu *et al.*, 2022). Jeho použití ovšem není limitováno pouze na samostatné buňky. Lze vytvořit celý organismus produkující tento protein např. transgenní myš s proteinem mt-Keima a následně pozorovat mitofáגיע v rámci tkání viz obr. 10. Ovšem protein mt-Keima lze správně vizualizovat pouze v živých buňkách a čerstvých preparátech, jelikož při fixaci tkání dochází ke snížení stability proteinu mt-Keima a snížení pH gradientu v rámci lysozomu (Fang *et al.*, 2017).



Obr. 10: In vivo detekce mitofáגיע pomocí mt-Keima v transgenní myši. V horním řádku jsou ukázány buňky jater a ve spodním buňky mozečku (včetně Purkyňových buněk) (Fang *et al.*, 2017).

## 13 Závěr

V této práci jsem shrnul dosavadní poznatky o vlivu oxidačního stresu na mitochondriální DNA, morfologii mitochondrií, membránový potenciál a mitofágii společně s využívanými metodami pro detekci těchto parametrů. Oxidační stres vede k depolarizaci mitochondriálního membránového potenciálu, k fragmentaci mitochondriální sítě až k mitofágii, která může být přímo regulována právě hladinou reaktivních forem kyslíku neboli ROS (z angl. Reactive Oxygen Species). Mitofágie je ovlivněna i morfologií mitochondrií např. dlouhé mitochondrie vykazují vyšší odolnost vůči mitofágii, nebo membránovým potenciálem, jehož velké snížení vede k mitofágii. Detailní mechanismy, jakými ROS ovlivňují mitofágii a morfologii mitochondrií společně se zapojením proteinů štěpení a fúze jsou zatím známy pouze částečně a vyžadují hlubší prozkoumání. Osvětlení těchto mechanismů by pak mohlo přinést nové možnosti pro léčbu různých chorob způsobených právě ROS a dysfunkčními mitochondriemi jako jsou např. neurodegenerativní nemoci.

Pro kvantifikaci morfologických změn mitochondrií u savčích buněk i u *Saccharomyces cerevisiae* se využívá kombinace mikroskopických technik jako např. fluorescenční, konfokální či superrezoluční mikroskopie a moderních metod pro analýzu obrazových dat jako je např. MitoMo či MitoSegNet. Ty využívají umělou inteligenci a poskytují přesnou, detailní a automatickou analýzu fluorescenčních dat. Díky tomuto přístupu lze mimo jiné detekovat morfologické změny mitochondrií, které nejsou detekovatelné prostým vizuálním pozorováním a prohloubit naše poznání o vlivu morfologie mitochondrií na jejich funkci za různých podmínek v různých typech buněk.

Nejvyužívanější metodou pro detekci membránového potenciálu mitochondrií u savců i *Saccharomyces cerevisiae* jsou lipofilní fluorescenční barviva jako je např. R123, TMRM, či JC-1, jež se akumulují v závislosti na hodnotách membránového potenciálu. Preferované využívané barvivo se pak mění v závislosti na buněčném typu a podmínkách zkoumání. Ve výsledku je tedy dobré pečlivě vybrat správné barvivo, či komerční kit pro naše zkoumání. Komerční kity bývají ovšem často cenově nákladnější. Využití kombinace několika barviv pak může být spolehlivější a cenově výhodnější metodou pro získání jistých a správných výsledků.

Metody používané pro detekci mitofágie u *Saccharomyces cerevisiae* a savčích buněk fungují na podobných principech ve využití fluorescenčně značených proteinů a jejich změně



emise při degradaci mitochondrií s těmito proteiny ve vakuole či lysozomu resp. Mezi často používané proteiny patří např. mCherry, Rosella, mt-Keima, GFP či EGFP, jejichž použití se liší v závislosti na prováděném experimentu. U kvasinek jsou metody převážně rychlejší a jednodušší za využití semikvantitativní analýzy s proteiny GFP, či mCherry nebo i kvantitativní analýzy pomocí alkalické fosfatázy Pho8 $\Delta$ 60. Na detekci mitofágie u savčích buněk se pak využívají i transgenní organismy (např. myš mito-QC), které umožňují kvantitativní analýzu mitofágie, včetně *in vivo* pozorování v tkáních. Ačkoliv je tvorba transgenních organismů technicky a časově náročnější, poskytuje přesnější informace.

Lze shrnout, že stále dochází k vyvíjení přesnějších metod pro detekci změn morfologie mitochondrií, membránového potenciálu mitochondrií a mitofágie, což může přispět k lepšímu porozumění o působení oxidačního stresu na mitochondrie a jeho role v mnohých onemocněních. Bude tak možné vyvinout přesnější terapeutické přístupy pro léčení nemocí, jako jsou např. neurodegenerativní onemocnění, srdeční choroby, diabetes nebo rakovina.

## 14 Reference

V této práci jsou sekundární zdroje (přehledové články) označeny hvězdičkou (\*).

Amchenkova, A.A., Bakeeva, L.E., Chentsov, Y.S., Skulachev, V.P., Zorov, D.B., 1988. Coupling membranes as energy-transmitting cables. I. Filamentous mitochondria in fibroblasts and mitochondrial clusters in cardiomyocytes. *The Journal of cell biology* 107, 481–495. <https://doi.org/10.1083/jcb.107.2.481>

Aoyagi, K., Yamashita, S., Akimoto, Y., Nishiwaki, C., Nakamichi, Y., Udagawa, H., Abe, M., Sakimura, K., Kanki, T., Ohara-Imaizumi, M., 2023. A new beta cell-specific mitophagy reporter mouse shows that metabolic stress leads to accumulation of dysfunctional mitochondria despite increased mitophagy. *Diabetologia* 66, 147–162. <https://doi.org/10.1007/s00125-022-05800-8>

Bin-Umer, M.A., McLaughlin, J.E., Butterly, M.S., McCormick, S., Tumer, N.E., 2014. Elimination of damaged mitochondria through mitophagy reduces mitochondrial oxidative stress and increases tolerance to trichothecenes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 11798–11803. <https://doi.org/10.1073/pnas.1403145111>

\*Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S., Kalayci, O., 2012. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organization Journal* 5, 9–19. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>

Bonassi, S., Cellai, F., Munni, A., Ugolini, D., Cristaudo, A., Neri, M., Milić, M., Bonotti, A., Giese, R.W., Peluso, M.E.M., 2017. 3-(2-deoxy-β-d-erythro-pentafuranosyl)pyrimido[1,2-α]purin-10(3H)-one deoxyguanosine adducts of workers exposed to asbestos fibers. *Toxicology Letters* 270, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.02.008>

Boushehri, S.N., Yusof, R.M., Taib, M.N.M., Yazdekhashti, N., Akbarzadeh, S., n.d. Effect of Vitamin Supplementation on Serum Oxidized Low-Density Lipoprotein Levels in Male Subjects with Cardiovascular Disease Risk Factors. *Low Density Lipoproteins*.

\*Breitenbach, M., Rinnerthaler, M., Hartl, J., Stincone, A., Vowinckel, J., Breitenbach-Koller, H., Ralser, M., 2014. Mitochondria in ageing: there is metabolism beyond the ROS. *FEMS Yeast Res* 14, 198–212. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12134>

\*Cheignon, C., Tomas, M., Bonnefont-Rousselot, D., Faller, P., Hureau, C., Collin, F., 2018. Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. *Redox Biology* 14, 450–464. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.10.014>

Crabtree, A., Neikirk, K., Marshall, A.G., Vang, L., Whiteside, A.J., Williams, Q., Altamura, C.T., Owens, T.C., Stephens, D., Shao, B., Koh, A., Killion, M., Lopez, E.G., Lam, J., Rodriguez, B., Mungai, M., Stanley, J., Dean, E.D., Koh, H., Gaddy, J.A., Scudese, E., Sweetwyne, M.T., Davis, J., Zaganjor, E., Murray, S.A., Katti, P., Damo, S.M., Vue, Z., Hinton, A., 2024. Defining Mitochondrial Cristae Morphology Changes Induced by Aging in Brown Adipose Tissue. *Advanced Biology* 8, 2300186. <https://doi.org/10.1002/adbi.202300186>

\*De Giorgi, C., Saccone, C., 1989. Mitochondrial genome in animal cells: Structure, organization, and evolution. *Cell Biophysics* 14, 67–78. <https://doi.org/10.1007/BF02797392>

\*Dhawan, V. (2014). Reactive Oxygen and Nitrogen Species: General Considerations. In: Ganguly, N., Jindal, S., Biswal, S., Barnes, P., Pawankar, R. (eds) Studies on Respiratory Disorders. Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice. Humana Press, New York, NY. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0497-6\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0497-6_2)

Dubuisson, M., Vander Stricht, D., Clippe, A., Etienne, F., Nauser, T., Kissner, R., Koppenol, W.H., Rees, J.-F., Knoop, B., 2004. Human peroxiredoxin 5 is a peroxynitrite reductase. FEBS Letters 571, 161–165. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.06.080>

Eiyama, A., Onishi, M., Omi, Y., Nagumo, S., Nakatsukasa, K., Okamoto, K., 2024. ER-associated degradation by Doa10 restrains mitophagy in yeast. <https://doi.org/10.1101/2024.04.08.588568>

Fang, E.F., Palikaras, K., Sun, N., Fivenson, E.M., Spangler, R.D., Kerr, J.S., Cordonnier, S.A., Hou, Y., Dombi, E., Kassahun, H., Tavernarakis, N., Poulton, J., Nilsen, H., Bohr, V.A., 2017. In Vitro and In Vivo Detection of Mitophagy in Human Cells, C. Elegans, and Mice. JoVE 56301. <https://doi.org/10.3791/56301>

Fischer, C.A., Besora-Casals, L., Rolland, S.G., Haeussler, S., Singh, K., Duchon, M., Conradt, B., Marr, C., 2020. MitoSegNet: Easy-to-use Deep Learning Segmentation for Analyzing Mitochondrial Morphology. iScience 23, 101601. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101601>

\*Forstermann, U., Sessa, W.C., 2012. Nitric oxide synthases: regulation and function. European Heart Journal 33, 829–837. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr304>

Fraga, C.G., Shigenaga, M.K., Park, J.W., Degan, P., Ames, B.N., 1990. Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87, 4533–4537. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.12.4533>

Frank, M., Duvezin-Caubet, S., Koob, S., Occhipinti, A., Jagasia, R., Petcherski, A., Ruonala, M.O., Priault, M., Salin, B., Reichert, A.S., 2012. Mitophagy is triggered by mild oxidative stress in a mitochondrial fission dependent manner. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research 1823, 2297–2310. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.08.007>

Frezza, C., Cipolat, S., Martins De Brito, O., Micaroni, M., Beznoussenko, G.V., Rudka, T., Bartoli, D., Polishuck, R.S., Danial, N.N., De Strooper, B., Scorrano, L., 2006. OPA1 Controls Apoptotic Cristae Remodeling Independently from Mitochondrial Fusion. Cell 126, 177–189. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.025>

Friedman, J.R., Lackner, L.L., West, M., DiBenedetto, J.R., Nunnari, J., Voeltz, G.K., 2011. ER Tubules Mark Sites of Mitochondrial Division. Science 334, 358–362. <https://doi.org/10.1126/science.1207385>

Gergely, P., Niland, B., Gonchoroff, N., Pullmann, R., Phillips, P.E., Perl, A., 2002. Persistent Mitochondrial Hyperpolarization, Increased Reactive Oxygen Intermediate Production, and Cytoplasmic Alkalinization Characterize Altered IL-10 Signaling in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. The Journal of Immunology 169, 1092–1101. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.2.1092>

Godber, Ben L.J, Doel, J.J., Durgan, J., Eisenthal, R., Harrison, R., 2000. A new route to peroxynitrite: a role for xanthine oxidoreductase. FEBS Letters 475, 93–96. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01639-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01639-2)

Godber, Ben L.J., Doel, J.J., Sapkota, G.P., Blake, D.R., Stevens, C.R., Eisenthal, R., Harrison, R., 2000. Reduction of Nitrite to Nitric Oxide Catalyzed by Xanthine Oxidoreductase. *Journal of Biological Chemistry* 275, 7757–7763. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.11.7757>

Hu, J., De Souza-Pinto, N.C., Haraguchi, K., Hogue, B.A., Jaruga, P., Greenberg, M.M., Dizdaroglu, M., Bohr, V.A., 2005. Repair of Formamidopyrimidines in DNA Involves Different Glycosylases. *Journal of Biological Chemistry* 280, 40544–40551. <https://doi.org/10.1074/jbc.M508772200>

\*Huang, Z., Chen, Y., Zhang, Y., 2020. Mitochondrial reactive oxygen species cause major oxidative mitochondrial DNA damages and repair pathways. *J Biosci* 45, 84. <https://doi.org/10.1007/s12038-020-00055-0>

Chelius, X., Bartosch, V., Rausch, N., Haubner, M., Schramm, J., Braun, R.J., Klecker, T., Westermann, B., 2023. Selective retention of dysfunctional mitochondria during asymmetric cell division in yeast. *PLoS Biol* 21, e3002310. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3002310>

Chen, D., Zhou, L., Chen, G., Lin, T., Lin, J., Zhao, X., Li, W., Guo, S., Wu, R., Wang, Z., Liu, W., 2024. FUNDC1-induced mitophagy protects spinal cord neurons against ischemic injury. *Cell Death Discov.* 10, 4. <https://doi.org/10.1038/s41420-023-01780-9>

Chinopoulos, C., Tretter, L., Adam-Vizi, V., 1999. Depolarization of In Situ Mitochondria Due to Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress in Nerve Terminals: Inhibition of  $\alpha$ -Ketoglutarate Dehydrogenase. *J. Neurochem.* 73.

\*Chung, H.Y., Baek, B.S., Song, S.H., Kim, M.S., Huh, J.I., Shim, K.H., Kim, K.W., Lee, K.H., 1997. Xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase and oxidative stress. *AGE* 20, 127–140. <https://doi.org/10.1007/s11357-997-0012-2>

Iqbal, S., Hood, D.A., 2014. Oxidative stress-induced mitochondrial fragmentation and movement in skeletal muscle myoblasts. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 306, C1176–C1183. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00017.2014>

Jakubowski, W., Biliński, T., Bartosz, G., 2000. Oxidative stress during aging of stationary cultures of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Free Radical Biology and Medicine* 28, 659–664. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00266-X](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00266-X)

\*Ji, L.L., Yeo, D., 2021. Oxidative stress: an evolving definition. *Fac Rev* 10. <https://doi.org/10.12703/r/10-13>

Jin, S.M., Lazarou, M., Wang, C., Kane, L.A., Narendra, D.P., Youle, R.J., 2010. Mitochondrial membrane potential regulates PINK1 import and proteolytic destabilization by PARL. *Journal of Cell Biology* 191, 933–942. <https://doi.org/10.1083/jcb.201008084>

Jing, H., Liu, H., Lu, Z., Liuqing, C., Tan, X., 2020. Mitophagy Improves Ethanol Tolerance in Yeast: Regulation by Mitochondrial Reactive Oxygen Species in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 30, 1876–1884. <https://doi.org/10.4014/jmb.2004.04073>

\*Jomova, K., Alomar, S.Y., Alwasel, S.H., Nepovimova, E., Kuca, K., Valko, M., 2024. Several lines of antioxidant defense against oxidative stress: antioxidant enzymes, nanomaterials with multiple enzyme-mimicking activities, and low-molecular-weight antioxidants. *Arch Toxicol* 98, 1323–1367. <https://doi.org/10.1007/s00204-024-03696-4>

- Kaczmarek, A., Wrońska, A.K., Boguś, M.I., 2023. The Changes in Mitochondrial Morphology and Physiology Accompanying Apoptosis in *Galleria mellonella* (Lepidoptera) Immunocompetent Cells during *Conidiobolus coronatus* (Entomophthorales) Infection. *IJMS* 24, 10169. <https://doi.org/10.3390/ijms241210169>
- Kageyama, Y., Zhang, Z., Roda, R., Fukaya, M., Wakabayashi, J., Wakabayashi, N., Kensler, T.W., Reddy, P.H., Iijima, M., Sesaki, H., 2012. Mitochondrial division ensures the survival of postmitotic neurons by suppressing oxidative damage. *Journal of Cell Biology* 197, 535–551. <https://doi.org/10.1083/jcb.201110034>
- \*Kameoka, S., Adachi, Y., Okamoto, K., Iijima, M., Sesaki, H., 2018. Phosphatidic Acid and Cardiolipin Coordinate Mitochondrial Dynamics. *Trends in Cell Biology* 28, 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2017.08.011>
- Kamo, N., Muratsugu, M., Hongoh, R., Kobatake, Y., 1979. Membrane potential of mitochondria measured with an electrode sensitive to tetraphenyl phosphonium and relationship between proton electrochemical potential and phosphorylation potential in steady state. *J. Membranes Biol.* 49, 105–121. <https://doi.org/10.1007/BF01868720>
- Kanki, T., Kang, D., Klionsky, D.J., 2009. Monitoring mitophagy in yeast: The Om45-GFP processing assay. *Autophagy* 5, 1186–1189. <https://doi.org/10.4161/auto.5.8.9854>
- Karahalil, B., Bohr, V.A., Souza-Pinto, N.C.D., 2015. Base Excision Repair Activities Differ in Human Lung Cancer Cells and Corresponding Normal Controls.
- Kim, I., Lemasters, J.J., 2011. Mitophagy Selectively Degrades Individual Damaged Mitochondria After Photoirradiation. *Antioxidants & Redox Signaling* 14, 1919–1928. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3768>
- Kondo-Okamoto, N., Noda, N.N., Suzuki, S.W., Nakatogawa, H., Takahashi, I., Matsunami, M., Hashimoto, A., Inagaki, F., Ohsumi, Y., Okamoto, K., 2012. Autophagy-related Protein 32 Acts as Autophagic Degron and Directly Initiates Mitophagy. *Journal of Biological Chemistry* 287, 10631–10638. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.299917>
- Korshunov, S.S., Skulachev, V.P., Starkov, A.A., 1997. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Letters* 416, 15–18. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)01159-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01159-9)
- Kuchino, Y., Mori, F., Kasai, H., Inoue, H., Iwai, S., Miura, K., Ohtsuka, E., & Nishimura, S. (1987). Misreading of DNA templates containing 8-hydroxydeoxyguanosine at the modified base and at adjacent residues. *Nature*, 327(6117), 77–79. <https://doi.org/10.1038/327077a0>
- Kurihara, Y., Kanki, T., Aoki, Y., Hirota, Y., Saigusa, T., Uchiumi, T., Kang, D., 2012. Mitophagy Plays an Essential Role in Reducing Mitochondrial Production of Reactive Oxygen Species and Mutation of Mitochondrial DNA by Maintaining Mitochondrial Quantity and Quality in Yeast. *Journal of Biological Chemistry* 287, 3265–3272. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.280156>
- Lipschitz, D. A., Cook, J. D., & Finch, C. A. (1974). A clinical evaluation of serum ferritin as an index of iron stores. *The New England journal of medicine*, 290(22), 1213–1216. <https://doi.org/10.1056/NEJM197405302902201>

Liu, K., Li, Xing, Li, Z., Cao, J., Li, Xiaoyan, Xu, Y., Liu, L., Zhao, T., 2022. Evaluating mitophagy in embryonic stem cells by using fluorescence-based imaging. *Front. Cell Dev. Biol.* 10, 910464. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.910464>

\*Lushchak, V.I., 2014. CLASSIFICATION OF OXIDATIVE STRESS BASED ON ITS INTENSITY. *EXCLI Journal*.

Machado, A., Ayala, A., Gordillo, E., Revilla, E., Santa Maria, C., 1991. Relationship between enzymatic activity loss and post-translational protein modification in aging. *Archives of Gerontology and Geriatrics* 12, 187–197. [https://doi.org/10.1016/0167-4943\(91\)90027-N](https://doi.org/10.1016/0167-4943(91)90027-N)

Mai, S., Klinkenberg, M., Auburger, G., Bereiter-Hahn, J., Jendrach, M., 2010. Decreased expression of Drp1 and Fis1 mediates mitochondrial elongation in senescent cells and enhances resistance to oxidative stress through PINK1. *Journal of Cell Science* 123, 917–926. <https://doi.org/10.1242/jcs.059246>

Mathur, A., Hong, Y., Kemp, B.K., Barrientos, A.A., Erusalimsky, J.D., 2000. Evaluation of fluorescent dyes for the detection of mitochondrial membrane potential changes in cultured cardiomyocytes. *Cardiovascular Research*.

McClatchey, P.M., Keller, A.C., Bouchard, R., Knaub, L.A., Reusch, J.E.B., 2016. Fully automated software for quantitative measurements of mitochondrial morphology. *Mitochondrion* 26, 58–71. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2015.12.003>

McCord, J.M., Fridovich, I., 1969. Superoxide Dismutase. *Journal of Biological Chemistry* 244, 6049–6055. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)63504-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)63504-5)

McWilliams, T.G., Prescott, A.R., Allen, G.F.G., Tamjar, J., Munson, M.J., Thomson, C., Muqit, M.M.K., Ganley, I.G., 2016. *mito*-QC illuminates mitophagy and mitochondrial architecture in vivo. *Journal of Cell Biology* 214, 333–345. <https://doi.org/10.1083/jcb.201603039>

Meeusen, S., DeVay, R., Block, J., Cassidy-Stone, A., Wayson, S., McCaffery, J.M., Nunnari, J., 2006. Mitochondrial Inner-Membrane Fusion and Crista Maintenance Requires the Dynamin-Related GTPase Mgm1. *Cell* 127, 383–395. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.021>

Mello Filho, A.C., Hoffmann, M.E., Meneghini, R., 1984. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. *Biochemical Journal* 218, 273–275. <https://doi.org/10.1042/bj2180273>

Mijaljica, D., Prescott, M., Devenish, R.J., 2011. A Fluorescence Microscopy Assay for Monitoring Mitophagy in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *JoVE* 2779. <https://doi.org/10.3791/2779>

Moreno, J.C., Bikker, H., Kempers, M.J.E., Van Trotsenburg, A.S.P., Baas, F., De Vijlder, J.J.M., Vulsma, T., Ris-Stalpers, C., 2002. Inactivating Mutations in the Gene for Thyroid Oxidase 2 ( *THOX2* ) and Congenital Hypothyroidism. *N Engl J Med* 347, 95–102. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa012752>

Okamoto, K., Kondo-Okamoto, N., Ohsumi, Y., 2009. Mitochondria-Anchored Receptor Atg32 Mediates Degradation of Mitochondria via Selective Autophagy. *Developmental Cell* 17, 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.06.013>



Pereira-da-Silva, L., Sherman, M., Lundin, M., & Baltscheffsky, H. (1993). Inorganic pyrophosphate gives a membrane potential in yeast mitochondria, as measured with the permeant cation tetraphenylphosphonium. *Archives of biochemistry and biophysics*, 304(2), 310–313. <https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1355>

Petit, P.X., Glab, N., Marie, D., Kieffer, H., Métézeau, P., 1996. Discrimination of respiratory dysfunction in yeast mutants by confocal microscopy, image, and flow cytometry. *Cytometry* 23, 28–38. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0320\(19960101\)23:1<28::AID-CYTO5>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0320(19960101)23:1<28::AID-CYTO5>3.0.CO;2-I)

Pletjushkina, O.Yu., Lyamzaev, K.G., Popova, E.N., Nepryakhina, O.K., Ivanova, O.Yu., Domnina, L.V., Chernyak, B.V., Skulachev, V.P., 2006. Effect of oxidative stress on dynamics of mitochondrial reticulum. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1757, 518–524. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.03.018>

\*Preiser, J., 2012. Oxidative Stress. *J Parenter Enteral Nutr* 36, 147–154. <https://doi.org/10.1177/0148607111434963>

\*Purohit, V., Simeone, D.M., Lyssiotis, C.A., 2019. Metabolic Regulation of Redox Balance in Cancer. *Cancers* 11, 955. <https://doi.org/10.3390/cancers11070955>

Rajasekaran, N.S., Connell, P., Christians, E.S., Yan, L.-J., Taylor, R.P., Orosz, A., Zhang, X.Q., Stevenson, T.J., Peshock, R.M., Leopold, J.A., Barry, W.H., Loscalzo, J., Odelberg, S.J., Benjamin, I.J., 2007. Human  $\alpha$ B-Crystallin Mutation Causes Oxido-Reductive Stress and Protein Aggregation Cardiomyopathy in Mice. *Cell* 130, 427–439. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.044>

Richard, V.R., Leonov, A., Beach, A., Burstein, M.T., Koupaki, O., Gomez, A., Levy, S., Pluska, L., Mattie, S., Rafeh, R., Iouk, T., Sheibani, S., Greenwood, M., Vali, H., Titorenko, V.I., 2013. Macromitophagy is a longevity assurance process that in chronologically aging yeast limited in calorie supply sustains functional mitochondria and maintains cellular lipid homeostasis.

Richter, C., Park, J.W., Ames, B.N., 1988. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 6465–6467. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.17.6465>

Rinnerthaler, M., Büttner, S., Laun, P., Heeren, G., Felder, T.K., Klinger, H., Weinberger, M., Stolze, K., Grousl, T., Hasek, J., Benada, O., Frydlova, I., Klocker, A., Simon-Nobbe, B., Jansko, B., Breitenbach-Koller, H., Eisenberg, T., Gourlay, C.W., Madeo, F., Burhans, W.C., Breitenbach, M., 2012. Yno1p/Aim14p, a NADPH-oxidase ortholog, controls extramitochondrial reactive oxygen species generation, apoptosis, and actin cable formation in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 8658–8663. <https://doi.org/10.1073/pnas.1201629109>

Salvioli, S., Ardizzoni, A., Franceschi, C., Cossarizza, A., 1997. JC-1, but not DiOC<sub>6</sub> (3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess  $\Delta \Psi$  changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis. *FEBS Letters* 411, 77–82. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)00669-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00669-8)

Santel, A., Fuller, M.T., 2001. Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *Journal of Cell Science* 114, 867–874. <https://doi.org/10.1242/jcs.114.5.867>

Scaduto, R.C., Grotyohann, L.W., 1999. Measurement of Mitochondrial Membrane Potential Using Fluorescent Rhodamine Derivatives. *Biophysical Journal* 76, 469–477. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77214-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77214-0)

Shokolenko, I., Venediktova, N., Bochkareva, A., Wilson, G.L., Alexeyev, M.F., 2009. Oxidative stress induces degradation of mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Research* 37, 2539–2548. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp100>

Schoenfeld, J.D., Sibenaller, Z.A., Mapuskar, K.A., Wagner, B.A., Cramer-Morales, K.L., Furqan, M., Sandhu, S., Carlisle, T.L., Smith, M.C., Abu Hejleh, T., Berg, D.J., Zhang, J., Keech, J., Parekh, K.R., Bhatia, S., Monga, V., Bodeker, K.L., Ahmann, L., Vollstedt, S., Brown, H., Shanahan Kauffman, E.P., Schall, M.E., Hohl, R.J., Clamon, G.H., Greenlee, J.D., Howard, M.A., Schultz, M.K., Smith, B.J., Riley, D.P., Domann, F.E., Cullen, J.J., Buettner, G.R., Buatti, J.M., Spitz, D.R., Allen, B.G., 2017. O<sub>2</sub> ·<sup>-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Mediated Disruption of Fe Metabolism Causes the Differential Susceptibility of NSCLC and GBM Cancer Cells to Pharmacological Ascorbate. *Cancer Cell* 31, 487–500.e8. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.02.018>

\*Sies, H., 1985. Oxidative Stress: Introductory Remarks, in: *Oxidative Stress*. Elsevier, pp. 1–8. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-642760-8.50005-3>

\*Sies, H., Jones, D.P., 2020. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21, 363–383. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3>

Slodzinski, M.K., Aon, M.A., O'Rourke, B., 2008. Glutathione oxidation as a trigger of mitochondrial depolarization and oscillation in intact hearts. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 45, 650–660. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2008.07.017>

Squadrito, G.L., Cueto, R., Splenser, A.E., Valavanidis, A., Zhang, H., Uppu, R.M., Pryor, W.A., 2000. Reaction of Uric Acid with Peroxynitrite and Implications for the Mechanism of Neuroprotection by Uric Acid. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 376, 333–337. <https://doi.org/10.1006/abbi.2000.1721>

Suen, D.-F., Narendra, D.P., Tanaka, A., Manfredi, G., Youle, R.J., 2010. Parkin overexpression selects against a deleterious mtDNA mutation in heteroplasmic cybrid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 11835–11840. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914569107>

Sun, H., Zhang, C., Cao, S., Sheng, T., Dong, N., Xu, Y., 2018. Fenton reactions drive nucleotide and ATP syntheses in cancer. *Journal of Molecular Cell Biology* 10, 448–459. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjy039>

Sun, J., Tian, M., Lin, W., 2020. Monitoring mitochondrial membrane potential by FRET: Development of fluorescent probes enabling  $\Delta\Psi_m$ -Dependent subcellular migration. *Analytica Chimica Acta* 1097, 196–203. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.11.015>

Takao, M., Aburatani, H., Kobayashi, K., Yasui, A., 1998. Mitochondrial targeting of human DNA glycosylases for repair of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Research* 26, 2917–2922. <https://doi.org/10.1093/nar/26.12.2917>

Trzeciak, A.R., 2004. Cellular repair of oxidatively induced DNA base lesions is defective in prostate cancer cell lines, PC-3 and DU-145. *Carcinogenesis* 25, 1359–1370. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgh144>



- \*Vermot, A., Petit-Härtlein, I., Smith, S.M.E., Fieschi, F., 2021. NADPH Oxidases (NOX): An Overview from Discovery, Molecular Mechanisms to Physiology and Pathology. *Antioxidants* 10, 890. <https://doi.org/10.3390/antiox10060890>
- Vojtová J., Čapek M., Willeit s., Groušl T., Kutejová E., Pevala V., Valášek L. S., Rinnerthaler M., v revizi. A fully automated morphological analysis of yeast 1 mitochondria from wide-field fluorescence images *Scientific Reports*.
- Volejníková, A., Hlousková, J., Sigler, K., Pichová, A., 2013. Vital mitochondrial functions show profound changes during yeast culture ageing. *FEMS Yeast Res* 13, 7–15. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12001>
- Wang, Y., Nartiss, Y., Steipe, B., McQuibban, G.A., Kim, P.K., 2012. ROS-induced mitochondrial depolarization initiates PARK2/PARKIN-dependent mitochondrial degradation by autophagy. *Autophagy* 8, 1462–1476. <https://doi.org/10.4161/auto.21211>
- Wei, X., Qi, Y., Zhang, X., Gu, X., Cai, H., Yang, J., Zhang, Y., 2015. ROS act as an upstream signal to mediate cadmium-induced mitophagy in mouse brain. *NeuroToxicology* 46, 19–24. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2014.11.007>
- Wiemerslage, L., Lee, D., 2016. Quantification of mitochondrial morphology in neurites of dopaminergic neurons using multiple parameters. *Journal of Neuroscience Methods* 262, 56–65. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2016.01.008>
- Wu, M.-L., Tsai, K.-L., Wang, S.-M., Wu, J.-C., Wang, B.-S., Lee, Y.-T., 1996. Mechanism of Hydrogen Peroxide and Hydroxyl Free Radical–Induced Intracellular Acidification in Cultured Rat Cardiac Myoblasts. *Circulation Research* 78, 564–572. <https://doi.org/10.1161/01.RES.78.4.564>
- Wu, S., Zhou, F., Zhang, Z., Xing, D., 2011. Mitochondrial oxidative stress causes mitochondrial fragmentation via differential modulation of mitochondrial fission–fusion proteins. *The FEBS Journal* 278, 941–954. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08010.x>
- Xiao, B., Goh, J.-Y., Xiao, L., Xian, H., Lim, K.-L., Liou, Y.-C., 2017. Reactive oxygen species trigger Parkin/PINK1 pathway–dependent mitophagy by inducing mitochondrial recruitment of Parkin. *Journal of Biological Chemistry* 292, 16697–16708. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.787739>
- Yakes, F.M., VanHouten, B., 1997. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 514–519. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.2.514>
- Yang, X., Yang, Z., Wu, Z., He, Y., Shan, C., Chai, P., Ma, C., Tian, M., Teng, J., Jin, D., Yan, W., Das, P., Qu, J., Xi, P., 2020. Mitochondrial dynamics quantitatively revealed by STED nanoscopy with an enhanced squaraine variant probe. *Nat Commun* 11, 3699. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17546-1>
- Yao, Z., Liu, X., Klionsky, D.J., 2017. MitoPho8Δ60 Assay as a Tool to Quantitatively Measure Mitophagy Activity, in: Hattori, N., Saiki, S. (Eds.), *Mitophagy, Methods in Molecular Biology*. Springer New York, New York, NY, pp. 85–93. [https://doi.org/10.1007/7651\\_2017\\_12](https://doi.org/10.1007/7651_2017_12)

- Yin, Y., Shen, H., 2022. Common methods in mitochondrial research (Review). *Int J Mol Med* 50, 126. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2022.5182>
- Yu, T., Robotham, J.L., Yoon, Y., 2006. Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 2653–2658. <https://doi.org/10.1073/pnas.0511154103>
- Zahedi, A., On, V., Phandthong, R., Chaili, A., Remark, G., Bhanu, B., Talbot, P., 2018. Deep Analysis of Mitochondria and Cell Health Using Machine Learning. *Sci Rep* 8, 16354. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34455-y>
- Zeinoun, B., Teixeira, M.T., Barascu, A., 2024. Hog1 acts in a Mec1-independent manner to counteract oxidative stress following telomerase inactivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Commun Biol* 7, 761. <https://doi.org/10.1038/s42003-024-06464-3>
- Zhang, H., Zhou, W., Li, J., Qiu, Z., Wang, X., Xu, H., Wang, H., Lu, D., Qi, R., 2022. Senegenin Rescues PC12 Cells with Oxidative Damage Through Inhibition of Ferroptosis. *Mol Neurobiol* 59, 6983–6992. <https://doi.org/10.1007/s12035-022-03014-y>
- Zhang, V.X., Sze, K.M.-F., Chan, L.-K., Ho, D.W.-H., Tsui, Y.-M., Chiu, Y.-T., Lee, E., Husain, A., Huang, H., Tian, L., Wong, C.C.-L., Ng, I.O.-L., 2021. Antioxidant supplements promote tumor formation and growth and confer drug resistance in hepatocellular carcinoma by reducing intracellular ROS and induction of TMBIM1. *Cell Biosci* 11, 217. <https://doi.org/10.1186/s13578-021-00731-0>
- Zorov, D.B., Filburn, C.R., Klotz, L.-O., Zweier, J.L., Sollott, S.J., 2000. Reactive Oxygen Species (ROS)-induced ROS Release: A New Phenomenon Accompanying Induction of the Mitochondrial Permeability Transition in Cardiac Myocytes.