

**UNIVERZITA KARLOVA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BIOCHEMIE**



Ursula Sereghy

Mitochondriální pór přechodné propustnosti
Mitochondrial permeability transition pore

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Hana Hansíková CSc.

Praha, 2019

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelky RNDr. Hany Hansíkové CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne.....

Podpis.....

Poděkování

Velmi ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Haně Hansíkové CSc. za cenné rady, trpělivost a ochotu při odborném vedení této práce. Také bych ráda poděkovala své rodině za podporu.

Práce vznikla za podpory projektů Progres Q26/LF1 a SVV UK 260367.

Abstrakt

Mitochondriální pór přechodné propustnosti (mPTP) je vysoce evolučně konzervovaný kanál nacházející se ve vnitřní membráně mitochondrie. Tento pór je neselektivně propustný pro molekuly o hmotnosti menší než 1,5 kD. Otevření póru v důsledku např. zvýšené koncentrace Ca^{2+} nebo reaktivních forem kyslíku (ROS) a následná depolarizace membrány může vést k narušení protonového gradientu, snížení produkce ATP a následně i k buněčné smrti.

Smrt buňky v důsledku otevření mPTP je patofyziologickým jevem, který provází např. ischemická onemocnění a neurodegenerativní poruchy, jako je Alzheimerova nemoc nebo Huntingtonova choroba.

Studium složek a funkce mitochondriálního póru přechodné propustnosti je významné pro výzkum mechanismu onemocnění, které vede k vývoji vhodných farmaceutik a snížení mortality a morbidit pacientů.

Tato práce shrnuje vývoj výzkumu struktury a funkce kanálu za fyziologických a vybraných patologických podmínek a stručně popisuje některé experimentální metody.

Abstract

The mitochondrial permeability transition pore (mPTP) is highly evolutionarily conserved channel found in the inner membrane of mitochondria. This pore is non-selectively permeable for molecules below 1,5 kD. Consequences of the pore opening due to an increase of Ca^{2+} or reactive oxygen species (ROS) and following depolarization of the membrane involve a disruption of the proton gradient, decrease in the production of ATP and prevalently a cell death.

Death of a cell as a result of the mPTP opening is a physiopathological mechanism which follows ischemic diseases and neurodegenerative disorders such as Alzheimers and Huntingtons disease.

Study of a structure and function of mPTP is essential for the research of mechanisms and progression of diseases, and it is crucial for the development of responding drugs and an overall decrease in the morbidity of the patients.

This work compiles the course of the research into structure and function of the channel under physiological and pathological conditions and briefly puts down some of the experimental methods.

Seznam zkratek

Aβ	Beta amyloidy
AD	Alzheimerova nemoc (z ang. Alzheimer disease)
ADP	adenosindifosfát
ANT	adenin nukleotidový přenašeč (z ang. adenin nucleotide translocator)
ATP	adenosintrifosfát
AIF	faktor indukující apoptózu (z angl. apoptosis inducing factor)
Bcl-2	B buněčná lymfoma 2 (z ang. B cell lymphoma)
Co-A	koenzym A
CsA	cyklosporin A
CRC	kapacita zadržení vápníku (z ang. calcium retention capacity)
CypD	cyklofilin D
cyt c	cytochrom c
DCF	dichlorofluorescein
FAD/FADH₂	flavinadenindinukleotid
H₂DCF-DA	diacetát dichlorodihydrofluoresceinu
IF1	inhibiční faktor ATPasy
IMM	vnitřní mitochondriální membrána (z ang. inner mitochondrial membrane)
IMS	mezimembránový prostor (z ang. intermembranal space)
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
OMM	vnější mitochondriální membrána (z ang. outer mitochondrial membrane)
OSCP	protein senzitivní na oligomycin (z ang. oligomycin sensitive conferring protein)
OXPHOS	systém oxidační fosforylace (proteinové komplexy buněčného dýchání)
Pi	anorganický fosfát
PiC	fosfátový přenašeč
Rho-123	rhodamin-123

ROS	reaktivní formy kyslíku (z ang. reactive oxygen species)
mPTP	mitochondriální pór přechodné propustnosti (z ang. mitochondrial permeability transition pore)
TMRE	ethylester tetramethylrhodaminu
TMRM	methylester tetramethylrhodaminu
TSPO	translokátorový protein (z ang. translocator protein)
VDAC	napětově závislý aniontový kanál (z ang. voltage dependent anion channel)
Bz - 423	benzodiazepin 423

Obsah

1. Úvod.....	1
1.1. Stavba a funkce mitochondrií.....	1
1.1.1. Dýchací řetězec.....	2
1.1.3. Buněčná smrt a mitochondrie.....	7
1.1.4. Regulace homeostáze vápníku.....	7
2. Cíle práce.....	9
3. Mitochondriální pór přechodné propustnosti.....	10
3.1. Úvod.....	10
3.2. První model mitochondriálního póru přechodné propustnosti.....	11
3.2.2. Cyklofilin D.....	12
3.2.3. Napěťově závislý aniontový kanál.....	13
3.2.4. Fosfátový přenašeč (PiC).....	13
3.2.5. Role komplexu I.....	15
3.2.6. Translokátorový protein.....	15
3.3. Druhý model mPTP.....	16
3.3.1. Kruh c-podjednotek ATP syntasy tvoří mitochondriální pór přechodné propustnosti.....	16
3.4. Současné teorie.....	20
4. Metody analýzy fyzikálních a chemických vlastností mitochondriálního póru přechodné propustnosti.....	22
4.1. Způsoby zkoumání elektrofyziologie mitochondriálních membrán.....	22
4.2. Genetické úpravy.....	26
5. Role mPTP v patofyziologii.....	27
5.1. Kardiovaskulární onemocnění.....	27

5.2.	Neurodegenerativní onemocnění.....	27
5.2.1.	Alzheimerova choroba.....	27
5.2.2.	Huntingtonova choroba.....	28
6.	Souhrn.....	29
	Seznam literatury.....	30

1. Úvod

1.1. Stavba a funkce mitochondrií

Mitochondrie je semiautonomní organela s dvojitou membránou nacházející se v drtivé většině eukaryot¹. Její velikost se pohybuje mezi 0,5 – 1 μm . Mitochondrie pravděpodobně vznikla fagocytózou prokaryotické buňky, čemuž nasvědčuje nejen přítomnost dvojité membrány, ale i cyklické mitochondriální DNA (mtDNA) nacházející se v její matrix. Tato mtDNA obsahuje 37 genů, které kódují mitochondriální tRNA, rRNA i proteiny².

Vnější membrána mitochondrie (OMM) je v kontaktu s cytoelem buňky, má porézní charakter a je propustná pro molekuly do 5 kDa. Vnitřní membrána mitochondrie (IMM) tvoří četné záhyby tzv. kristy, které výrazně zvětšují její plochu. Vnitřní membrána propouští pouze malé neutrální molekuly jako vodu, oxid uhličitý a kyslík. K transportu ostatních látek slouží složitě kontrolované přenašeče. Do struktury vnitřní membrány je inkorporováno mnoho proteinů, které tvoří až dvě třetiny celkové hmotnosti mitochondriálních proteinů. Mezi nejdůležitější patří enzymové komplexy oxidativní fosforylace (OXPHOS), ale i mitochondriální pór přechodné propustnosti (mPTP). Mezi membránami se nachází tzv. mezimembránový prostor (IMS). Složení obsahu IMS se liší nejen od cytosolu buňky, ale i od matrix mitochondrie. V matrix se odehrává mnoho důležitých biochemických procesů jako je β -oxidace mastných kyselin nebo část močovinového cyklu. Do matrix je transportován pyruvát, který je pyruvátdehydrogenasou přeměněn na acetylkoenzym A (CoA). Acetylkoenzym A vstupuje do Krebsova cyklu, kde dochází k postupné oxidaci a dekarboxylaci kyseliny citrónové, vzniku GTP a uvolnění redukčních ekvivalentů³.

Vnitřní membrána mitochondrie je místem syntézy ATP cestou oxidační fosforylace. Energie ukládaná do makroergických vazeb této molekuly je pohonem pro většinu katabolických i anabolických dějů. Nicméně mitochondrie nemá pouze tuto funkci. V matrix mitochondrie se tvoří prekurzory pro syntézu makromolekul, jako jsou nukleotidy, lipidy nebo hem⁴. Kromě důležité úlohy v metabolismu buňky je mitochondrie také místem regulace buněčné smrti, homeostáze vápníku, genové exprese, diferenciaci a projevů stárnutí buňky. Také zde dochází k produkci většiny reaktivních forem kyslíku (ROS)⁵. Jelikož se tato práce především věnuje problematice mPTP, dále budou podrobněji popsány ty funkce mitochondrie, které velmi úzce souvisí právě s tímto pórem.

1.1.1. Dýchací řetězec

Ve vnitřní membráně mitochondrií se nalézají pět enzymových komplexů (komplex I - V) systému oxidační fosforylace (OXPHOS), které se podílí na redoxních reakcích, jejichž výsledkem je přenos protonů do IMM, redukce molekul kyslíku na vodu a následné tvorby molekul ATP využívající protonmotivní sílu vzniklého protonového gradientu.

Komplex I nebo také NADH:ubichinon-reduktasa je největší z komplexů dýchacího řetězce³. Dochází zde k oxidaci protonového přenašeče NADH a následné redukci koenzymu Q. Energie pocházející z těchto dějů je též použita na přenos 4 H⁺ z matrix do mezimembránového prostoru. Mechanismus tohoto procesu je stále předmětem diskuzí.

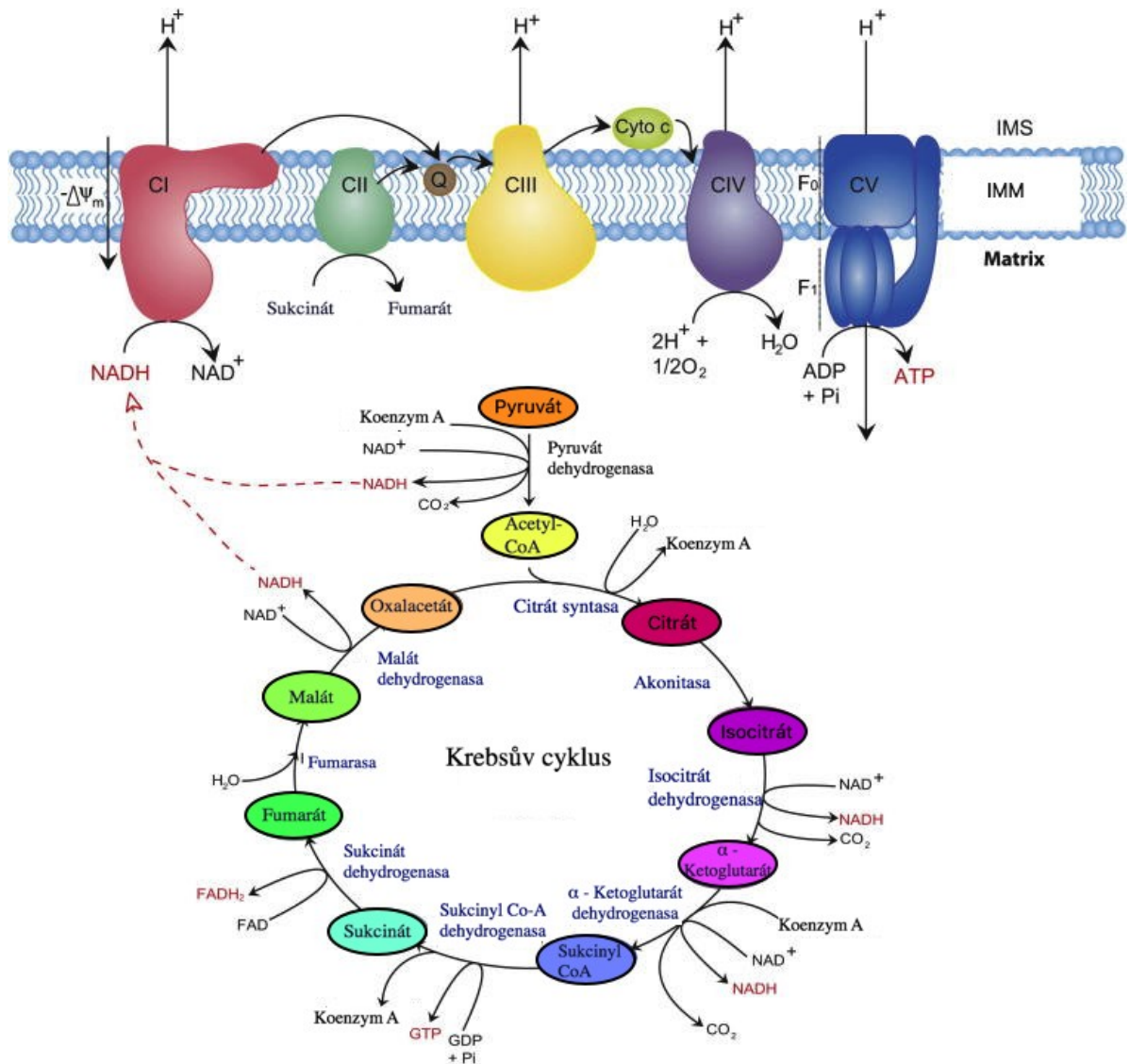
Komplex II je kromě účasti v dýchacím řetězci také integrální částí Krebsova cyklu a dochází zde k oxidaci sukcinátu na fumarát. Elektrony jsou přes molekulu FAD přeneseny na komplex II a následně též použity k redukci koenzymu Q za účasti cytochromu *c*.

Ubichinol:ferrocytochrom:*c*:oxidoreduktasa nebo také komplex III je místem přenosu elektronů z ubichinolů na cytochrom *c*. Mimo to zde dochází také k přenosu 4 H⁺ do mezimembránového prostoru. Cytochrom *c* nese pouze jeden elektron, a tedy k zpětné oxidaci jednoho ubichinolu na ubichinon je potřeba dvou cytochromů *c*.

Cytochrom *c* je malý hemový protein vyskytující se na povrchu membrány, která je v kontaktu s mezimembránovým prostorem. Při převzetí elektronu dochází k redukci hemového Fe³⁺ na Fe²⁺.

Komplex IV neboli cytochrom:*c*:oxidasa obsahuje kovové ionty Fe³⁺ a Cu²⁺. Z jedné molekuly kyslíku a čtyř elektronů vázaných na cytochrom *c* zde dochází ke vzniku dvou molekul vody a opět k přenosu 2 H⁺ do mezimembránového prostoru⁵.

Komplexy jsou za sebou uspořádány tak, že jejich redoxní potenciál vzrůstá a přebytečná energie je využita na přenos protonů do IMS, čímž vzniká protonový gradient, jenž je následně využit na posledním proteinovém komplexu OXPHOS, komplexu V (ATP syntasa), k syntéze makroergických molekul ATP⁴ (viz Obr.1, str.3).



Obrázek 1: Schéma Krebsova cyklu a mitochondriálního dýchacího řetězce. Schéma Krebsova cyklu s vyznačenými enzymy (modře). V Krebsově cyklu dochází k redukci koenzymu nikotinamidadenindinukleotidu (NAD^+/NADH) a flavinadenindinukleotidu (FAD/FADH_2) (červeně), které jsou reoxidovány na proteinových komplexech dýchacího řetězce (OXPHOS) I (CI) a II (CII). Elektrony z redukovaných koenzymů jsou přeneseny na ubiquinol (Q). Komplex III (CIII) je místem redukce cytochromu c a reoxidace ubiquinolu zpět na ubiquinon. Cytochrom c přenáší elektrony na komplex IV (CIV), kde je redukován kyslík na vodu. Během těchto dějů dochází k pumpování protonů do mezimembránového prostoru, a tím vzniká protonový gradient, jenž je hnací silou syntézy ATP z ADP a Pi na komplexu V (CV), též nazývaného ATP syntasa⁵.

1.1.2. ATP syntasa

Struktura a funkce tohoto posledního enzymového komplexu OXPHOS je pro pochopení problematiky mPTP velmi důležitá, a proto jí je věnováno více pozornosti.

Mitochondriální ATP syntasa je pátý enzymový komplex dýchacího řetězce, který využívá protonmotivní síly rozdílu pH mezi matrix a intermembránovým prostorem mitochondrie k syntéze molekul ATP⁶. Velikost bovinní ATP syntasy je přibližně 584 kDa a sestává z patnácti různých proteinů. ATP syntasa se skládá ze dvou hlavních podjednotek. Podjednotka F_1 , která se nachází v matrix mitochondrie, je připojena centrální a periferní stopkou k F_0 podjednotce, jež je inkorporována do membrány. Exergonický pasivní transport protonů podjednotkou F_0 vyvolává rotaci podjednotky γ . Tento pohyb způsobuje konformační změny podjednotky F_1 (konkrétně podjednotek α a β), které vedou k syntéze molekul ATP z ADP a P_i^4 .

Periferní stonek je tvořen proteinem senzitivním na oligomycin (*OSCP*) a podjednotkami b , d a F_6 . N -konec *OSCP* se váže na N -konce jedné nebo více α a β podjednotek části F_1 a jeho druhý konec interaguje s C -koncem podjednotky b periferní stopky⁷. Podjednotky d a F_6 jsou taktéž spojeny s podjednotkou b , která je pravděpodobně dvěma transmembránovými β helixy s hydrofobní smyčkou inkorporována do membrány⁸. Nicméně doposud není zcela jisté, jak přesně je periferní stonek spojen s ostatními podjednotkami.

Podjednotka F_1 se skládá z proteinů $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ a ϵ v poměru $\alpha_3\beta_3\gamma_1\delta_1\epsilon_1$ a její celková hmotnost je 371, 73 kDa. Statická část domény je tvořena podjednotkami α a β , které jsou střídavě vedle sebe uspořádány kolem alfa helixu centrálního stonku. Katalytická místa se nacházejí na podjednotkách β na rozhraní $\alpha_3\beta_3$. Podjednotky α nemají katalytická místa, ale na určité sekvence aminokyselin se sekundární strukturou jak α - helixů tak β -vláken se váží nukleotidy⁹. Na podjednotce F_1 se nacházejí vazebná místa pro divalentní kationty. Za fyziologických podmínek se jedná o hořečnaté ionty, ovšem při speciálních podmínkách tyto ionty mohou být nahrazeny jinými divalentními ionty, například ionty vápenatými. Tato výměna může být signálem pro další konformační změny zahrnující protein *OSCP*¹⁰. Centrální stonek je složen z proteinů γ, δ a ϵ , které spojují F_1 a F_0 podjednotkou.

Podjednotka F_0 se nachází ve vnitřní membráně mitochondrie, čímž je její studium značně ztíženo. Známe je to, že je tvořena tzv. c -kruhem, tedy kruhovitým útvarem tvořeným deseti podjednotkami c . U obratlovců je c -kruh tvořen pouze osmi

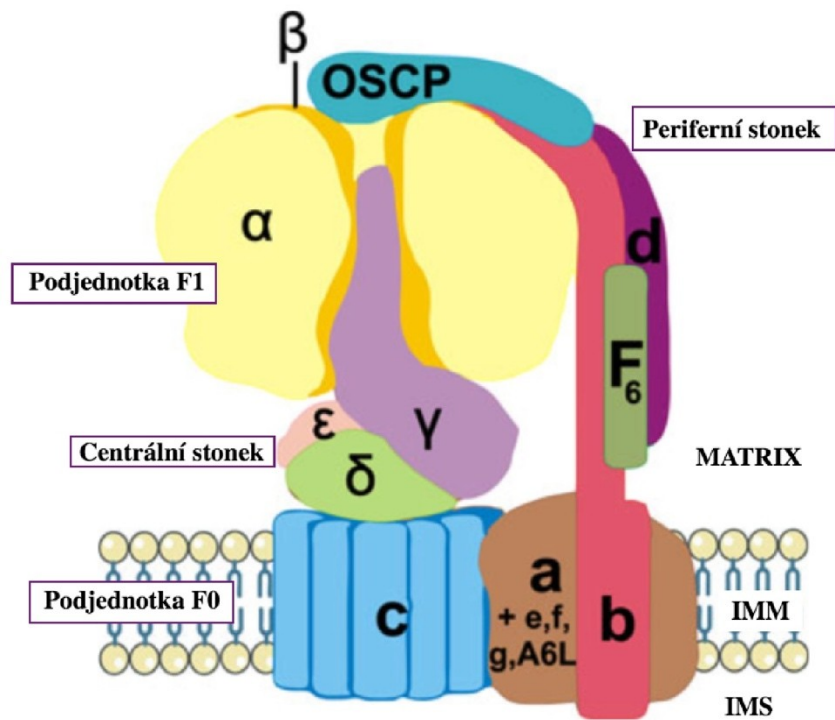
podjednotkami. V centru kruhu se nacházejí glutamátové zbytky, jejichž protonací a následnou deprotonací dochází k rotaci¹¹. Během rotace o 360° stupňů dojde k syntéze 3 molekul ATP¹⁰. F_0 podjednotka je tvořena též podjednotkami a , které jsou kódované v mtDNA. Proteinové podjednotky $A6L$, g , $f a e$ jsou součástí pouze savčí F_0 podjednotky (viz Obr.2 str.6)¹².

I když jsou monomery ATP syntasy aktivní, studie ukázaly, že ATP syntasa tvoří dimery, a dokonce i oligomerní uskupení, které zvyšují její enzymatickou aktivitu. Tvorba oligomerů přispívá ke správné modelaci krist vnitřní mitochondriální membrány¹³.

ATP syntasa je regulována především dostupností substrátu a správným protonovým gradientem. Při změně pH či nedostatku ADP, může dojít k hydrolyze ATP na ADP obrácením mechanismu ATP syntasy, a to z toho důvodu, aby nebyl porušen protonový gradient a přirozený membránový potenciál. Ten je významný nejenom pro správnou funkci dýchacího řetězce, ale i pro transport důležitých látek do matrix mitochondrie, a tak může dojít k narušení dalších bioenergeticky významných procesů. Hydrolytická činnost ATP syntasy generuje namísto energie ve formě ATP energii tepelnou⁹.

Protein IF_1 je regulační faktor bránící právě hydrolyze při změně pH uvnitř mitochondrie. Při hodnotě $pH \leq 6,7$ se konformace toho proteinu změní na homodimer, který je svými N -konci schopen vázat dvě F_1 domény. Při $pH \geq 8$ je IF_1 inaktivní a tvoří vyšší struktury (nejčastěji tetramery). Protein inhibuje hydrolyzu, ale neovlivňuje pravděpodobně syntézu ATP¹⁴.

Struktura ATP syntasy byla poslední desetiletí hojně studována převážně pomocí elektronové mikroskopie. Touto technikou spojenou se značením protilátkami bylo objeveno, že oligomerní komplexy ATP syntasy jsou pravděpodobně spojeny s přenašeči látek nezbytnými pro syntézu ATP, tedy s adenin nukleotidovým přenašečem (ANT) a přenašečem fosfátu (PiC)¹⁵.



Obrázek 2: ATP-syntasa. F_0 podjednotka ATP syntasy je inkorporovaná do vnitřní membrány mitochondrie (IMM) a skládá se z proteinů c , a , e , f , g a $A6L$. Podjednotka F_1 směřuje do vnitřního prostoru mitochondrie matrix, je složena z proteinů α , β , γ , δ a ϵ . Proteiny γ , δ a ϵ tvoří centrální stoněk, který spojuje obě podjednotky. Statické spojení obou podjednotek je zajištěno periferním stonkem skládajícím se z proteinů b , d , F_6 a proteinem senzitivním na oligomycin (OSCP). ATP syntasa využívá rozdíl koncentrace H^+ iontů mezi matrixem a mezimembránovým prostorem (IMS) k syntéze ATP¹⁴.

1.1.3. Buněčná smrt a mitochondrie

Další velmi důležitá role mitochondrie spočívá v regulaci buněčné smrti. Regulátory buněčné smrti jsou situovány v mezimembránovém prostoru nebo na mitochondriálních membránách.

Podmínkou pro spuštění procesu apoptózy vnitřní cestou aktivace je uvolnění cytochromu *c* z mezimembránového prostoru do cytosolu. Cytochrom *c* v cytosolu aktivuje formaci apoptozomů, proteinových komplexů schopných aktivovat prokaspázy na aktivní kaspázy a tím spouští signalizační kaskádu vedoucí k fragmentaci chromosomů a smrti buňky. Apoptóza je šetrná cesta likvidace buňky, kterou neprovází zánět¹⁶.

Velmi důležitými regulačními faktory apoptické smrti jsou proteiny z rodiny Bcl-2 (odvozeno z anglického *B-cell lymphoma*). Proteiny z této rodiny se nacházejí na vnější membráně mitochondrie a jsou schopné tvořit kanál, který je propustný pro mezimembránové induktory apoptózy¹⁷.

Na druhou stranu nekróza je morfologicky odlišným procesem, zahrnujícím bobtnání mitochondrie, ztrátu membránového potenciálu, narušení funkce proteinů řetězce OXPHOS a tvorby ATP, doprovázené uvolněním apoptických činitelů z mezimembránového prostoru mitochondrie. Mezi proteiny způsobující apoptózu/nekrózu nacházející se právě v IMM patří cytochrom *c*, apoptózu indukující faktor (AIF), Smac/Diablo nebo proteasa G. Nekróza se od apoptózy výrazně liší tím, že jde o nekontrolovanou buněčnou smrt, ke které může docházet i z důvodu nedostatku energie na neinvazivní průběh apoptickou cestou. Dochází k ruptuře buňky a úniku cytosolu do mezibuněčného prostoru, což může mít za následek zánět a iniciaci signalizace buněčné smrti u okolních buněk. Nekróza hraje roli v patologických procesech provázejících např. ischemicko-reperfuční poškození, trauma nebo některé druhy neurodegenerativních onemocnění¹⁸.

1.1.4. Regulace homeostáze vápníku

Vápenaté ionty hrají roli v mnoha důležitých signalizačních kaskádách. Například jsou nepostradatelné při genové expresi, svalových stazích a při přenosu nervových signálů. Za fyziologických podmínek je udržován velký koncentrační rozdíl mezi intracelulárním prostorem (100 nM) a extracelulárním prostorem (až několik mM). Velmi malá koncentrace v cytosolu buněk je udržována pomocí kalciových přenašečů na cytoplasmatické membráně a také regulací jeho koncentrace buněčnými organelami jako je

endoplazmatické retikulum (sarkoplazmatické retikulum ve svalových buňkách), ale také mitochondriemi nebo Golgiho aparátem¹⁹.

Absorbci vápníku do mitochondrie umožňuje Ca^{2+} uniport, který je možné inhibovat těžkými kovy jako jsou lanthanoidy nebo rutheniová červeň. Z mitochondrie jsou ionty vápníku do cytosolu transportovány $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ nebo $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ pumpami. Při fyziologických podmínkách je koncentrace vápníku v mitochondrii velmi nízká, nicméně při porušení rovnováhy a nastolení patologických podmínek je mitochondrie schopná pojmout velké množství vápníku a v důsledku změny koncentrace iontů může dojít k otevření mPTP a prasknutí vnější membrány, což má za následek spuštění nevratné signalizační kaskády vedoucí až k nekrotické smrti²⁰.

2. Cíl práce

Mitochondriální pór přechodné propustnosti (mPTP) je vysoce evolučně konzervovaný kanál uvnitř vnitřní mitochondriální membrány. Studium komponentů, které generují mPTP, stejně tak jako i ostatních bílkovin a faktorů, které jeho funkci mohou ovlivňovat, je významné pro objasnění patofyziologie různých onemocnění. Cílem bakalářské práce bylo podat současný pohled na strukturu a funkci mPTP.

Dílčí cíle:

- popsat vývoj předpokládané struktury mPTP se zaměřením na navrhované modely a jednotlivé strukturní prvky mPTP
- poskytnout informace o funkci mPTP za fyziologických a vybraných patologických podmínek
- představit používané metody studia mPTP

3. Mitochondriální pór přechodné propustnosti

3.1. Úvod

Před více než 40 lety bylo objeveno, že pokud se mitochondrie nachází v prostředí s vysokou koncentrací vápenatých iontů, dochází k výraznému bobtnání této organely¹⁸. V pozdějších studiích Hawortha a Huntera^{21,22} a následně Cromptona a kol.²³ byla prokázáno, že bobtnání mitochondrií při zvýšené koncentraci vápenatých iontů je důsledkem otevření nescifického póru, který propouští veškeré molekuly do velikosti 1,5 kDa nehledě na jejich náboj²⁴. Tento pór byl nazván pórem přechodné propustnosti (mPTP) a od té doby je zkoumána jeho funkce, struktura, aktivátory a inhibitory.

Ireverzibilní otevření póru vede k narušení membránového potenciálu, celkovému narušení osmotické rovnováhy, homeostázy vápníku a kolapsu funkce enzymových komplexů ve vnitřní membráně mitochondrie. Následkem může být ruptura vnější membrány mitochondrie, uvolnění apoptických faktorů do cytosolu a smrt buňky²⁵. Nicméně během diferenciaci a vývoje tkáně srdečního svalu a nervové tkáně je přechodné otevření tohoto kanálu zásadní^{26,27}.

Otevření mPTP je prokazatelně indukováno zvýšenou koncentrací vápenatých iontů v matrix mitochondrie a vysokou koncentrací reaktivních forem kyslíku. Je ale mnoho dalších látek, které otevření póru podporují. Mezi ně patří atraktylosidy, anorganický fosfát a mnoho dalších, jejichž přesný účinek není zatím dostatečně popsán^{28,29}.

Při onemocněních nervové soustavy a srdečního svalu může být otevření mPTP fatální a vést k nekrotické smrti buňky a k propuknutí zánětu v okolní tkáni²⁵. Pokud bychom našli látku, která by zabránila patologickému otevírání mPTP, bylo by možné tyto nemoci efektivně léčit. Jelikož ovšem není doposud jasná struktura mPTP, je velmi složité najít specifickou látku, která by tomuto procesu zabránila. V příštích kapitolách je podán přehled vývoje výzkumu sktruktury mPTP a je nastíněn směr dalšího výzkumu.

3.2. První model mitochondriálního póru přechodné propustnosti

V roce 1998 bylo zjištěno že cyklosporin A (CsA) je účinným inhibitorem otevírání mPTP při zvýšené koncentraci vápenatých iontů³⁰. Jako další komponenty mPTP byly navrženy adenin nukleotidový přenašeč (ANT), který se nachází ve vnitřní membráně mitochondrie a tvoří uskupení pórovitého charakteru. Navíc jeho regulátory atraktylosid a kyselina bongkreková ovlivňují bobtnání mitochondrie³¹. Další navržené komponenty byly napětově závislý aniontový kanál (VDAC), který se nachází ve vnější membráně mitochondrie a propouští do mezimembránového prostoru menší hydrofilní molekuly³², a cyklofilin D (CypD), jediná známá mitochondriální peptidylisomerasa, která také ovlivňuje funkci mPTP³³.

3.2.1. Adenin nukleotidový přenašeč

Adenin nukleotidový přenašeč je proteinový komplex složený ze dvou jednotek nacházející se ve vnitřní membráně mitochondrie. Hlavní funkce tohoto enzymu je zprostředkovat výměnu ATP a ADP mezi cytosolem a matrix a tím zaprvé zásobovat matrix molekulami ADP, tedy udržovat v chodu proces oxidační fosforylace, a zadruhé zachovávat správný membránový potenciál³³. V lidském genomu se nacházejí geny pro čtyři izoformy ANT a to *ANT1*, *ANT2*, *ANT3* a *ANT4*. Expres těchto izoform se liší v různých tkáních. *ANT1* se exprimuje hlavně ve svalové a srdeční tkáni, *ANT2* se nachází v proliferujících buňkách. *ANT3* je přítomen ve všech tkáních a poslední izoforma *ANT4* se exprimuje pouze ve varlatech. V myších lze najít pouze tři izoformy ANT, a to *ANT1* exprimující se v srdci a ve svalech, *ANT2*, které lze nalézt ve všech tkáních a *ANT3*, které můžeme nalézt pouze v tkáni varlat³⁴.

Adenin nukleotidový přenašeč je možné pozorovat ve dvou konformacích. V c-konformaci je protein svým aktivním místem otočen do mezimembránového prostoru, zatímco v m-konformaci směřuje aktivní místo na stranu membrány, která je v kontaktu s matrix mitochondrie. Změnu konformace, a tedy přenos nukleotidů, ovlivňuje koncentrace ADP a je regulovaná kyselinou bongkrekovou a atraktylosidy³⁵. ANT byl zkoumán v prostředí s vysokou koncentrací vápenatých iontů a bylo zjištěno, že zvýšené koncentrace vápníku v kombinaci s proteinem nacházejícím se v c-konformaci vedou k zvýšení permeability membrány. Tato konformace je stabilizována přítomností atraktylosidu, na druhou stranu při zvýšené koncentraci ADP a kyseliny bongkrekové, které stabilizují m-konformaci proteinu, nebyl pozorován dopad zvýšené koncentrace

vápenatých iontů na propustnost membrány³⁶. Dále se pomocí afinitní chromatografie prokázalo, že ANT se váže na CypD, ale pokud je zároveň přítomný cyklosporin A (CsA), tak k navázání nedochází³³. Tyto pokusy vedly k přesvědčení, že ANT opravdu musí být součástí mPTP, až do chvíle, kdy byl proveden experiment s mitochondriemi izolovaných z myších jater, v nichž byla exprese genů pro ANT potlačena (konkrétně geny pro dva izotypy *ANT1* a *ANT2*). U těchto mitochondrií nadále docházelo k otevírání mPTP, ačkoliv koncentrace vápenatých iontů potřebná pro indukci proudu musela být až třikrát vyšší než v případě kontrolních mitochondrií³⁷.

Věrohodnost tohoto pokusu je předmětem diskuzí, jelikož nedošlo k ovlivnění ani jiných funkcí ANT, které jsou pro funkci mitochondrie nezbytné. Pravděpodobnost, že došlo k expresi *ANT4*, jako kompenzace k umlčeným genům pro ostatní izoformy i v tkáních, ve kterých se běžně neexprimuje, je nezanedbatelná.

Role adenin nukleotidového přenašeč je v současnosti velmi sporná. Je zřejmé, že má přímý efekt na aktivitu mPTP, ale mechanismus účinku je neznámý.

3.2.2. Cyklofilin D

Cyklofilin D (CypD) je peptidyl-prolyl cis-trans isomerasa nacházející se v matrix mitochondrie. V lidském genomu je kódována genem *PPIF*, který je součástí jaderné DNA³⁸. Cyklofilin D je jediný mitochondriální cyklofilin, nicméně v lidském organismu se nachází 16 typů těchto isomeras a aktivita většiny těchto enzymů je inhibována cyklosporinem A^{39,40}. Například v cytosolu buňky dochází při vzniku komplexu CypD – CsA k inhibici fosfatasy kalcineurinu, která má velmi významnou roli při aktivaci T-lymfocytů⁴¹. V roce 2005 byl proveden experiment⁴² za použití myších mitochondrií s utištěným genem pro CypD *Ppif* a bylo prokázáno, že pokud izomerasa není v mitochondrii přítomna, k otevření póru při běžné koncentraci vápenatých iontů nedojde. Je ovšem nutné zmínit, že jak v mitochondriích neobsahujících CypD, tak v mitochondriích, kdy je izomerasa deaktivovaná CsA, můžeme pozorovat aktivitu mPTP při vysokých koncentracích vápenatých iontů⁴³. Nadále je ovšem otázkou, na jaký protein se CypD při aktivaci mPTP váže a za jakých podmínek. Bez této informace je těžké vytvořit specifický lék, jelikož CsA během cesty do mitochondrie reaguje i s dalšími izomerasami v cytosolu, což může mít pro buňku nežádoucí účinky. Za účelem vyhnout se imunosupresivnímu účinku CsA bylo vyvinuto několik analogických sloučenin např. MeVal-4-Cs, NIM811 a Debio 025, které nereagují s kalcineurinem^{44,45}. Jejich účinky se nadále testují.

3.2.3. Napětově závislý aniontový kanál

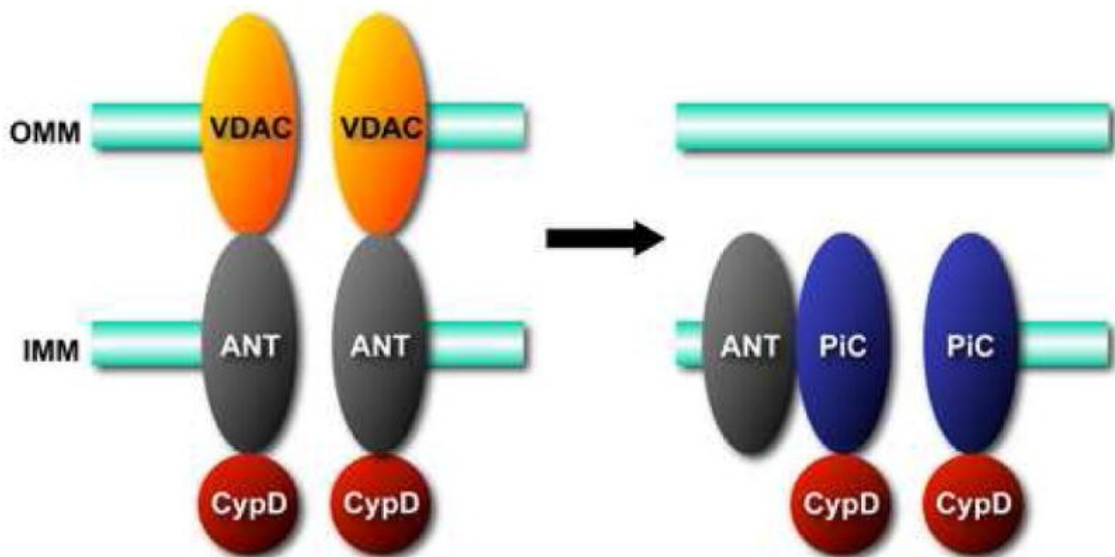
Napětově závislý aniontový kanál (VDAC) se nachází ve vnější membráně mitochondrií velké většiny eukaryotických organismů⁴⁶. Schopnost kanálu vázat hexokinasu značí úzkou provázanost s metabolickými pochody buňky⁴⁷. Afinity chromatografie prokázala, že ANT se váže k CypD v komplexu s proteinem VDAC⁴⁸ (Obr.3 str.14, levá strana). Tento předpoklad byl dále prověřován, ale nedařilo se získat žádné uspokojivé výsledky. V roce 2007 byl proveden experiment⁴⁹ s mitochondriemi izolovanými ze srdce myši, v jejichž genetickém kódu byla potlačena exprese genů pro čtyři izoformy porinového kanálu VDAC. Tyto mitochondrie byly podrobeny různým podmínkám, které mají za standardních okolností za následek otevření mPTP a bobtnání mitochondrií. Po zjištění, že mitochondrie neobsahující VDAC reagují stejně jako mitochondrie kontrolní, se došlo k závěru, že ani VDAC nemůže být součástí struktury mitochondriálního póru přechodné propustnosti.

3.2.4. Fosfátový přenašeč (PiC)

Mitochondriální fosfátový přenašeč se nachází ve vnitřní membráně mitochondrií. Jak už název napovídá, jeho hlavní funkcí je přenos fosfátových zbytků, velmi důležitých při oxidační fosforylaci. Tato transportní funkce se ukázala být také významná pro homeostázu vápníku a z tohoto důvodu je fosfátový přenašeč zkoumán v souvislosti s mPTP.

Fosfátový přenašeč se stal kandidátem na strukturní část mPTP, jelikož se váže na CypD. K tomuto poznatku se došlo při experimentu na glutathion Sepharose s glutathion s-transferasou navázanými molekulami CypD. Na základě zjištění, že molekuly CypD mají schopnost vázat PiC, byl sestaven nový model mPTP³⁶ (Obr.3, str.14, pravá strana).

Následně byly prováděny pokusy na myších s umlčenými geny pro transkripci tohoto přenašeče a došlo se k závěru, že ani tento pór formující protein není hlavním komponentem mPTP⁵⁰. Díky tomuto podezření se však došlo k zjištění závislosti propustnosti póru na koncentraci fosfátových zbytků^{29,51}.



Obrázek 3: První model mitochondriálního póru přechodné propustnosti. Schéma nalevo znázorňuje první návrh na strukturu póru skládající se z adenin nukleotidového přenašeče (ANT) inkorporovaného do vnitřní membrány mitochondrie (IMM), napětově závislého aniontového kanálu (VDAC) nacházejícího se ve vnější membráně mitochondrie (OMM) a cyklofilinu D (CypD). Možnost, že je VDAC součástí póru byla ale později vyloučena a byla navržena další možnost zahrnující fosfátový přenašeč (PiC) (pravá strana obrázku) ⁵².

3.2.5. Role komplexu I

Pravděpodobnost otevření mPTP se zvyšuje s rostoucím elektronovým tokem přes komplex I dýchacího řetězce⁵³. Toto zjištění vedlo k objevu, že mPTP je nějakým způsobem regulován chinony, pravděpodobně přes specifické vazebné místo⁵⁴. Je možné, že s aktivitou komplexu I souvisí také nadprodukce ROS, které jsou nepochybně důležitým regulačním faktorem zkoumaného póru. K nadprodukcí ROS dochází při reversním toku elektronů skrz komplex I. Tento reverzní tok je pozorován při oxidaci sukcinátu a indukuje otevření mPTP⁵⁵.

3.2.6. Translokátorový protein

Translokátorový protein (TSPO) se nachází ve vnější membráně mitochondrie. Poprvé byl pozorován v roce 1977 v buňkách myši nervové tkáně⁵⁶ jako periferní receptor pro benzodiazepin, sekundární receptor pro diazepam. Následující výzkumy ukázaly, že se vyskytuje ve všech myších buňkách a dostal název translokátorový protein⁵⁷. TSPO zprostředkovává transport cholesterolu a protoporfyrinu IX do matrix mitochondrie a předpokládalo se, že se účastní nějakým způsobem i regulace mPTP, jelikož hladina cholesterolu v mitochondrii je také faktorem, který ovlivňuje indukci buněčné smrti. Navíc protoporfyrin byl prokázán jako induktor otevření póru⁵⁸. Proto byl TSPO možným kandidátem na strukturní složku póru, nicméně ablací genů transkribujících tento protein bylo dokázáno, že není nezbytnou a esenciální složkou potřebnou pro formaci tohoto kanálu, a že dokonce ani nehraje roli v jeho regulaci⁵⁹. Nicméně endogenní a syntetické ligandy TSPO jako například Bz-423 přímo ovlivňují funkci ATPasy⁶⁰.

3.3. Druhý model mPTP

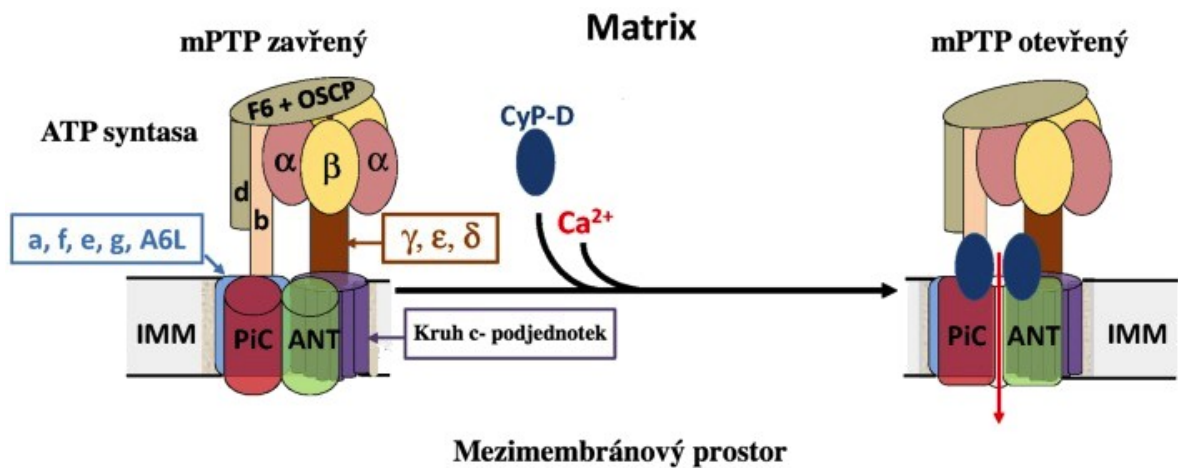
Na sedmnácté evropské bioenergetické konferenci⁶¹ v roce 2012 bylo poprvé diskutováno, že strukturální složkou mPTP by mohl být pátý komplex dýchacího řetězce, ATP syntasa. Z provedených experimentů bylo zcela jasné, že CypD má esenciální úlohu v regulaci póru, a proto bylo prověřováno s jakými dalšími proteiny vnitřní membrány mitochondrie CypD interaguje. Pomocí imunoprecipitace a následného přenosu tzv. Western blottingem bylo potvrzeno, že CypD se váže na periferní stonku ATP syntasy. Také se ukázalo, že k vazbě CypD je zapotřebí určité koncentrace Pi a toto spojení významně snižuje aktivitu ATP syntasy⁶². Každá část periferního stonku byla samostatně imunoprecipitována a vystavena působení CypD. Výsledkem tohoto experimentu je poznání, že místem vazby CypD a periferního stonku je na protein sensitivní na oligomycin (OSCP), a že inhibitor aktivity ATP syntasy, benzodiazepin-423 (Bz-423), se kompetitivně váže na stejné místo na OSCP^{60,63,64}.

3.3.1. Kruh c-podjednotek ATP syntasy tvoří mitochondriální pór přechodné propustnosti

K přesvědčení, že kruh c podjednotek ATP syntasy je pravděpodobným strukturálním komponentem mPTP vedlo pozorování, že purifikované podjednotky *c*, které byly vloženy do liposomu, spontánně tvoří vodivostní kanál⁶⁵. V dalším experimentu⁶⁶ byla měřena pomocí kalceinu aktivita mPTP v buňkách s potlačenou expresí genu pro podjednotku *c* ATP syntasy. Pro indukci mPTP byl použit ionomycin a vápenaté ionty. V těchto buňkách byla pozorována snížená senzitivita mPTP na kalcium. Též byly připraveny buňky neobsahující mitochondriální DNA, která kóduje informaci pro syntézu podjednotky *a* ATP syntasy. Reakce těchto buněk na zvýšenou koncentraci vápenatých iontů v matrix mitochondrie byla stejná jako u buněk kontrolních, tedy došlo k otevření mPTP při aplikaci běžné koncentrace vápenatých iontů. Dá se tedy předpokládat, že podjednotky *a* nemají na formaci mPTP vliv (Obr.4 str.17).

Výše popsané pozorování bylo vyvráceno v roce 2017⁶⁷. Tři geny kódující podjednotku *c* ATP syntasy *ATP5G1*, *ATP5G2* a *ATP5G3*⁶⁸ byly v buňkách umlčeny a následně byly mitochondrie podrobeny vlivům látek běžně indukujících otevření póru. Nebylo pozorováno odlišné chování zmutovaných buněk od buněk kontrolních.

Kruh podjednotek *c* byl podrobně zkoumán v různých organismech a výsledky poukazují na to, že vnitřní prostor tohoto kanálu je tvořen hydrofobními postranními řetězci aminokyselin. Tyto podmínky v podstatě vylučují to, že by mohla dutina kruhu podjednotek *c* fungovat jako nespecificky propustný kanál ⁶⁹.



Obrázek 4: Schéma mitochondriálního póru přechodné propustnosti tvořeného kruhem c podjednotek. Kruh podjednotek *c* ATP syntasy, nacházející se ve vnitřní membráně mitochondrie (IMM), tvoří za přítomnosti cyklofilinu D (CypD) a vápenatých iontů pór přechodné propustnosti. Fosfátový přenašeč (PiC) a adenosin nukleotidový přenašeč (ANT), které jsou v komplexu s ATP syntasou mají regulační funkci⁷⁰

3.3.2. Hypotéza dimerů ATP syntasy formující mPTP

Navázání CypD na dimer ATP syntasy, které je podmíněno přítomností anorganického fosfátu (Pi), utlumuje částečně její aktivitu, která je opět obnovena při aplikaci CsA. V mitochondriích s utlumeným genem pro transkripci CypD není stimulační efekt CsA na katalytickou aktivitu komplexu pozorován⁷¹.

Toto pozorování reakce ATP syntasy na CypD, které není nepodobné reakci mPTP na CypD, vedlo k domněnce, že by dimery ATP syntasy mohly za určitých podmínek ztratit svoji enzymatickou aktivitu a nabýt funkci kanálu přechodné propustnosti. Vazebné místo pro CypD se nachází v oblasti helixu 3 a helixu 4 podjednotky *OSCP*⁶⁴. Stejná oblast je důležitá pro vazbu proteinu Bz-423, který, jak už bylo zmiňováno, je inhibítozem aktivity ATP syntasy⁶⁰. Fakt, že v oblasti, kde působí induktor PTP CypD, působí i inhibitor enzymatické aktivity ATPasy Bz-423 vedl k dalším experimentům, které měly prověřit, jak jsou tyto dva jevy spojeny. Tento předpoklad se prokázal a opravdu protein Bz-423 zvyšuje citlivost mPTP na Ca^{2+} . Dále bylo zkoumáno, zda množství podjednotky *OSCP* ovlivňuje senzitivitu kanálu na otevření póru. Experiment potvrdil, že zvýšené množství exprimovaných podjednotek *OSCP*, zvyšuje citlivost kanálu na otevření indukované vápenatými ionty.

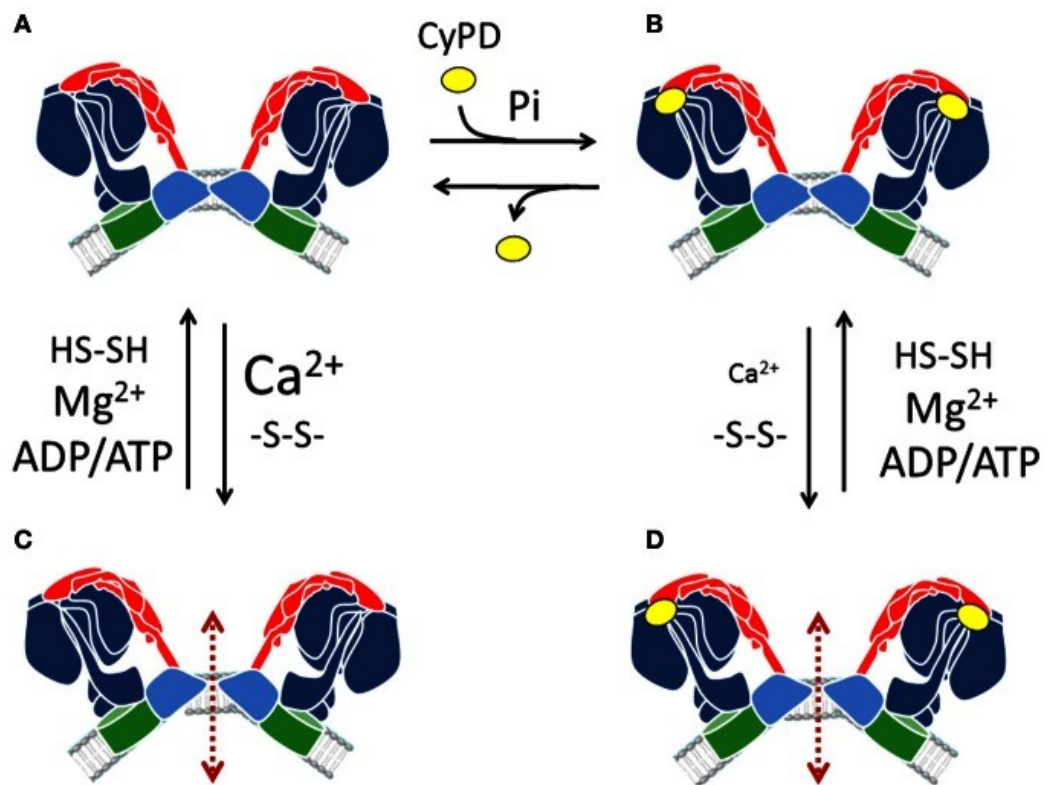
Jak bylo zjištěno, tak směr rotace ATP syntasy je také důležitým faktorem, který ovlivňuje citlivost póru na vápenaté ionty. Pokud je ATP syntasa v konformaci, ve které hydrolyzuje ATP, je zapotřebí větší koncentrace vápenatých iontů k otevření póru, než když je v konformaci ATP syntetizující⁶⁴. Zdali se inhibitor změny konformace ze syntetizující na hydrolyzující, protein IF1, též podílí na regulaci otevření mPTP, zatím nebylo podrobena výzkumu.

Stejný experiment prokazuje, že Bz-423 za přítomnosti vápenatých iontů otevírá vodivostní kanál tvořený dimery ATP syntasy a při přidavku Mg^{2+} , ADP a inhibitoru ATP syntasy γ -imino ATP (AMP-PNP) se tento kanál opět zablokuje. Jelikož dimery ATP syntasy nebyly v komplexu s jinými proteiny, nepředpokládalo se, že by na konduktivitu kanálu měly vliv inhibitory ANT nebo PiC. Tento předpoklad byl experimentálně potvrzen.

Podmínky, při kterých došlo k otevření kanálu tvořeného dimery ATPasy, a byl tedy zaznamenán proud, jsou shodné s těmi, které indukují otevření mPTP a podporují teorii, že dimery ATP syntasy tvoří mPTP.

Předpoklad je takový, že se kanál tvoří mezi dvěma F_0 podjednotkami ATP syntasy, aktivita tohoto kanálu je ovlivněna koncentrací vápenatých iontů v matrix mitochondrie a mnoha dalšími faktory jako P_i , oxidanty, pH, nukleotidy a koncentrací manganatých iontů^{64,62} (viz Obr.5).

Lokace vazebného místa pro vápenaté ionty, podmínky, při kterých se vápenatý iont váže, a mechanismus konformačních změn, které teoreticky následně vedou ke změně funkce ATP syntasy, jsou velmi diskutovanými tématy.



Obrázek 5: Schéma modelu mitochondriálního póru přechodné propustnosti tvořeného dimery pátého proteinového komplexu dýchacího řetězce ATP syntasy. K otevření póru tvořeného dimerem ATP-syntasy za neúčasti cyklofilinu D (CypD, žlutě) (vlevo), je potřeba větší koncentrace kalcia, než v případě, že je CypD navázáno na protein senzitivní na oligomycin (OSCP), který je součástí periferního stonku (červeně) (vpravo). Vazba CypD na OSCP je podporována přítomností fosfátových zbytků. Otevření mPTP je inhibováno přítomností hořčnatých iontů (Mg^{2+}), thioley a raciem substrátu a produktu ATP syntasy ADP/ATP . Iniciováno je přítomností vápenatých iontů⁶².

3.4. Současné teorie

Zajímavým zjištěním bylo, že je možné detekovat propustnost membrány za zvýšené koncentrace vápenatých iontů i u buněk, v jejichž genomu došlo k umlčení genů pro expresi podjednotky *b* a proteinu OSCP⁷². Výsledky tohoto experimentu nepodporují teorii, že dimery ATP syntasy tvoří mitochondriální pór přechodné propustnosti.

Nicméně validita tohoto pokusu byla zpochybněna Bernardim⁷³, jelikož při potlačení exprese genů pro velmi důležité jednotky ATP syntasy, může být funkce enzymu výrazně ovlivněna.

Další velmi zajímavý úkaz poměrně komplikující situaci je existence peptidů, které jsou složením velmi podobné *b* podjednotkám ATP syntasy, a to i v buňkách s potlačenou expresí pro tento gen. Při zkoumání RNA transkriptů se došlo k závěru, že vlivem alternativního splicingu byla vytvořena mRNA kódující protein velmi podobný podjednotkám *b*, lišící se hlavně nepřítomností hydrofobní membránové části⁷².

Pokud se došlo k závěru, že utišením genů pro jednotlivé části ATP syntasy se nemůže dojít k relevantnímu pozorování, je více než logické, že další výzkumy směřují ke studiu strukturních proteinů s mutacemi specifických aminokyselin, které jsou domnělými aktivními místy pro regulaci mPTP faktory jako vápenaté ionty, protony atd.

Dosud se podařilo prokázat, že pokud zmutujeme vybrané histidinové zbytky nacházející se na OSCP, je ztracena citlivost mPTP na snížení pH v matrix mitochondrie a nedochází k inhibici póru při pH 6.5⁷⁴.

Dále byly pozměněny aminokyseliny ve vazebném místě pro dvoumocné kationty β -podjednotky ATPasy. Tyto mitochondrie byly vystaveny působení vápenatých iontů společně s ionomycinem, jenž je ionoforem vápenatých iontů. V těchto podmínkách došlo u mitochondrií bez mutací k otevření kanálu, zatímco u zmutovaných mitochondrií necitlivých na vápník nebyla pozorovaná zvýšená propustnost membrány¹⁰.

Na konci roku 2018 vyšel článek Jasona Karcha a kolektivu, který popisuje první absolutní zablokování mPTP⁷⁵. Jak už je zmíněno výše, delece některých částí nebo aplikace CsA, vždy jen snížila citlivost póru na otevření při působení vápenatých iontů. Tentokrát se poprvé podařilo naprosto deaktivovat pór, a to delecí genů pro všechny typy ANT a zároveň delecí genu pro CypD *Ppif*. ANT byl vyloučen na základě experimentů Kokoszky a kolektivu³⁷, kteří ovšem potlačili expresi genů pouze pro dvě izoformy ANT, ačkoliv myši DNA obsahuje tři, jejichž exprese se v různých tkáních liší. Na základě pozorování Karcha a kol. lze usoudit, že pokud je gen pro některou z izoform zablokovan,

exprese dalších izoform je zvýšena. Při potlačení exprese všech tří izoform ANT bylo pozorováno zásadní snížení citlivosti buňky na otevření mPTP při aplikaci zvyšujících se dávek kalcia, čímž je vyvráceno tvrzení z roku 2014.

Tento experiment podporuje teorii, že mPTP nemusí být pouze jeden, ale mohou existovat dva póry s odlišnou strukturou. Tuto hypotézu podporuje fakt, že mPTP se může nacházet ve dvou různých napěťových stavech a bylo pozorováno bobtnání mitochondrie s velkou a malou amplitudou⁴².

Nadále je ovšem přesná struktura tohoto póru otázkou, kterou se snaží vyřešit mnoho laboratoří po celém světě. Poslední experimenty naznačují, že správným vodítkem pro budoucí výzkumy, je právě předpoklad dvou různých kanálů s odlišnou strukturou.

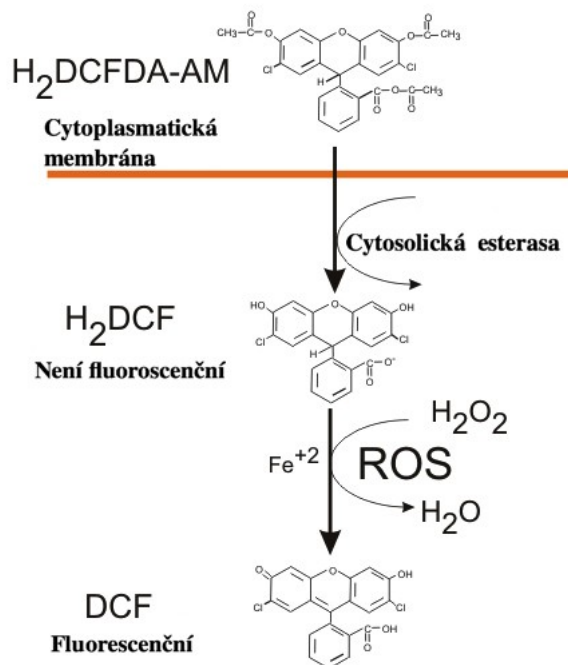
4. Metody analýzy fyzikálních a chemických vlastností mitochondriálního póru přechodné propustnosti

4.1. Způsoby zkoumání elektrofyziologie mitochondriálních membrán

4.1.1. Fluorescenční barviva

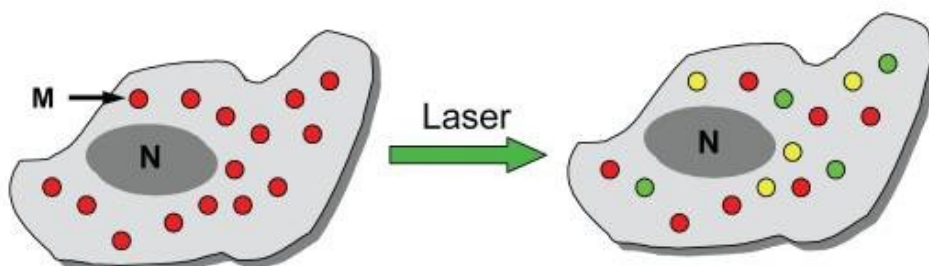
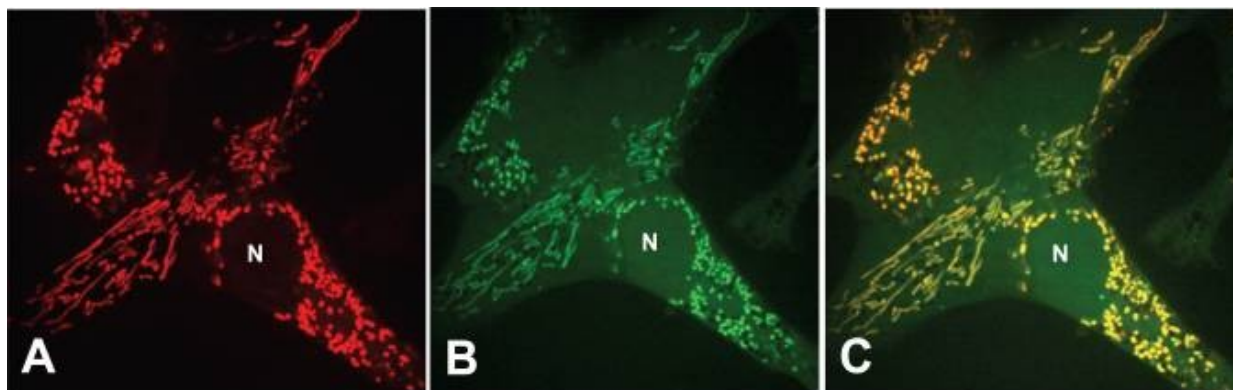
Fluorescenční barviva jsou používána pro měření změny membránového potenciálu. Jsou hojně používána rhodaminová barviva, mezi které patří Rhodamin 123 (Rho-123), ethylester tetramethylrhodaminu (TMRE) a methylester tetramethylrhodaminu (TMRM) a cyaninová barviva, například JC-1. Barvivo se akumuluje v matrix mitochondrie a se ztrátou potenciálu IMM dochází k úniku a zhášení fluorescenčního signálu^{76,77} (Obr.7, str. 23).

Pro fluorescenční stanovení ROS se používá diacetát dichlorodihydrofluoresceinu (H₂DCF-DA). Molekula H₂DCF-DA podléhá oxidaci peroxidem vodíku, hydroxylovými radikály či peroxynitráty a vzniká vysoce fluorescenční dichlorofluorescein, jehož signál je snadno detekovatelný⁷⁸ (Obr.6).



Obrázek 6: Mechanismus aktivace dichlorodihydrofluorescein diacetátu (H₂DCF) reaktivními formami kyslíku (ROS)⁷⁹.

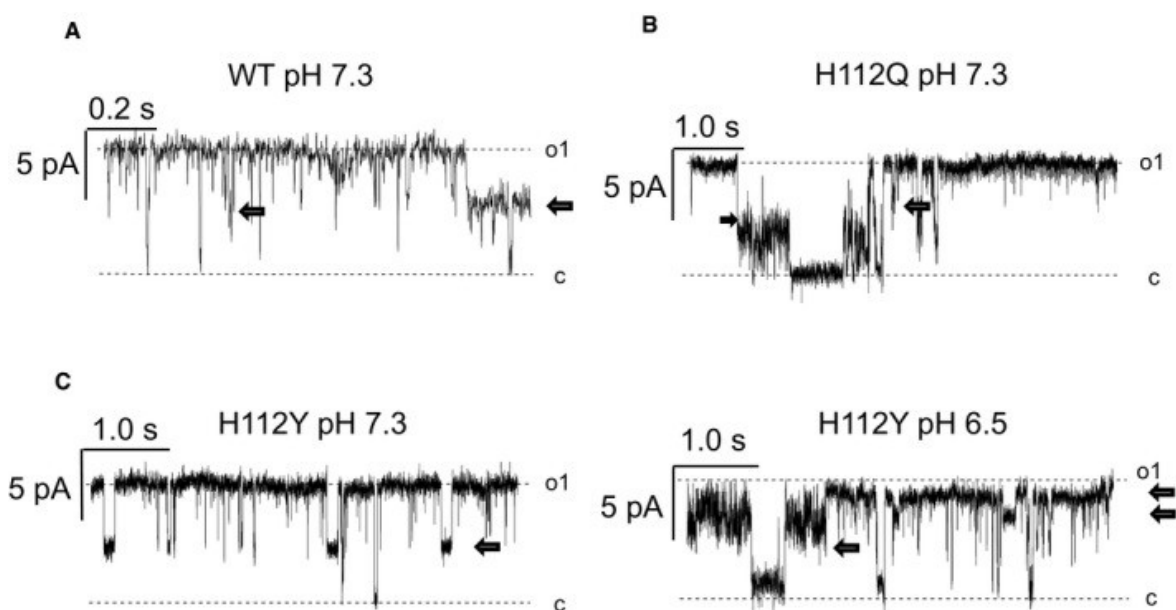
Další metodou využívající fluorescenci je použití esterifikovaného kalceinu, jenž je distribuován do všech organel buňky včetně mitochondrie. Fluorescenci kalceinu je možné zhášet divalentními ionty kobaltu, které ovšem neprojdou membránou mitochondrie. Otevření mPTP je pak možné zaznamenat jako prudký pokles fluorescence mitochondrie v důsledku úniku barviva do cytosolu, kde jsou přítomné kobaltnaté ionty⁶⁶.



Obrázek 7: Detekce poklesu membránového potenciálu za použití tetramethyl rhodamin esteru (TMRE) (A,C), sledování produkce reaktivních forem kyslíku (ROS) dichlorofluoresceinem (DCF) (B,C). Červený fluorescenční signál TMRE je zhášen s klesajícím membránovým potenciálem. Na obrázku A jsou označeny mitochondrie, na obrázku C vidíme smíšený signál DCF a TMRE. Pokud je signál červený nedošlo k produkci ROS a tedy vzniku fluorescentního DCF a nedošlo ani k významné ztrátě membránového potenciálu. Žlutý signál je výsledkem kombinace červeného a zeleného signálu, došlo tedy k produkci ROS, ale membránový potenciál byl zachován. U mitochondrií, které vykazují pouze zelenou fluorescenci došlo ke ztrátě membránového potenciálu provázeného produkcí ROS. N značí jádro buňky⁹⁵.

4.1.2. Metoda terčíkového zámku (patch - clamp)

Tato metoda především umožňuje studium specifických iontových kanálů za daných podmínek. Skleněnou mikropipetou můžeme ohraničit tak malý prostor membrány, že se na něm opravdu nachází pouze jeden pór a měřit proud, který tímto kanálem prochází. Metoda má několik podob, při nichž je možné aktivitu póru měřit *in vivo* nebo můžeme pór přesunout do jiného prostředí a nadále měřit proud v něm⁶⁵.



Obrázek 3: Příklad záznamu měření proudu metodou terčíkového zámku.

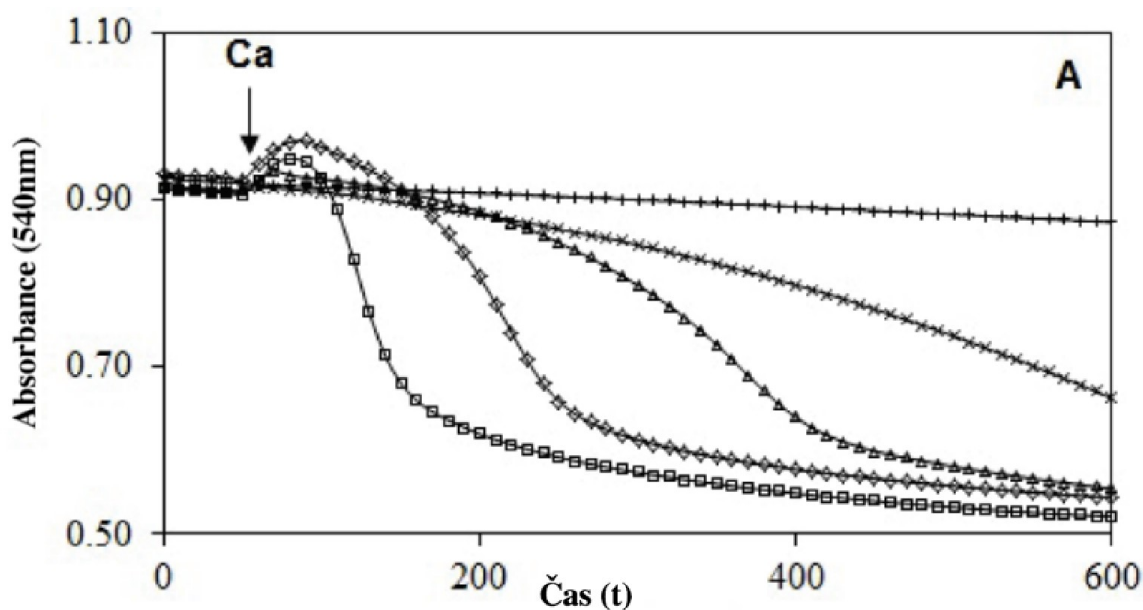
Pomocí mikropipety byla ohraničena oblast obsahující jednotku ATP syntasy v mitoplastech, kontrolních (A) a mitoplastech obsahující geneticky modifikovaný protein transferující oligomycin (OSCP) (B,C). Na membránu bylo vloženo napětí o velikosti 10 mV a pozorován proud procházející kanálem při přidávku látek způsobující permeabilitu⁷⁴.

4.1.3. Osmotické bobtnání

Osmotické bobtnání je proces, který může za kritických podmínek vést k apoptóze či nekróze. V případě, že dojde k otevření mPTP, do mitochondrie se mohou dostat všechny molekuly menší než 1,5 kDa⁵². Mitochondriální proteiny tímto kanálem neprojdou a zůstávají v matrix mitochondrie, tudíž se výrazně zvýší onkotický tlak, a ten je vyvažován vstřebáváním vody. Tento proces vede k nafukování vnitřní membrány, která má ovšem velkou rezervu, jelikož je ve fyziologickém stavu složena do krist. Fatální pro buňku v případě osmotického bobtnání mitochondrie je prasknutí vnější membrány a uvolnění apoptických proteinů jako cytochromu c, AIF, Smac/ Diabolo nebo endonukleasy

G do cytosolu buňky. Zda bude likvidace buňky pokračovat nekroticky či cestou apoptózy určuje množství ATP, kterým buňka v daný moment disponuje⁸⁰.

Pro porozumění těmto dějům je nutné míru bobtnání měřit. Jedním ze způsobů je měření absorbance izolovaných mitochondrií. Množství světla, jež projde mitochondrií je přímo úměrné míře nabobtnání. Jinak řečeno, čím je míra nabobtnání větší, tím méně světla mitochondrie pohltní. Tímto způsobem se sleduje pokles absorbance mitochondrie v důsledku bobtnání a jeho závislost na čase⁸¹ (Obr. 9).



Obrázek 4: Graf závislosti absorbance mitochondrií na čase. Průběh bobtnání mitochondrií izolovaných z myších jater po přidavku Ca^{2+} zachycen pomocí měření absorbance při 520 nm⁸².

Velmi využívaná je v posledních letech metoda retenční kapacity pro kalcium (*calcium retention capacity* – CRC). Tato metoda využívá speciálního fluorescenčního barviva (*Calcium green*). Intenzita záření CRC je závislá na koncentraci vápenatých iontů v cytosolu a molekuly tohoto barviva nepronikají skrz mitochondriální membránu. Sledováním intenzity záření tohoto fluorescenčního barviva tedy můžeme pozorovat kolik vápníku mitochondrie vstřebala. Skokovým nárůstem signálu je pak možné rozpoznat otevření mPTP a únik vápníku zpět do cytosolu⁸¹

Další metoda používá izotopově značenou vodu a manitol, na základě jejichž poměru vyhodnocuje míru změny mitochondriálního objemu. Tato metoda má tu výhodu, že není potřeba mitochondrie z buňky izolovat⁸³.

Pozorovat změny objemu mitochondrie lze také mikroskopem, i když tato metoda nese několik nevýhod. Používá se elektronová mikroskopie, fluorescenční mikroskopie s vysokým rozlišením nebo kryoskopie. Je možné pozorovat jednotlivé části organely a její změny, nicméně pouze *in vitro*. Pokud se snažíme pozorovat změny objemu *in situ*, je nutné vzít v potaz, že obraz, který nese mikroskop, je pouze dvoudimenzionální, tudíž i poměrně velká změna objemu se na plošném zobrazení organely neprojeví tak markantně. Navíc se plocha organely zobrazená mikroskopem může zvětšovat či zmenšovat na základě změny jejího tvaru, který nemusí souviset se změnou objemu⁸⁴.

4.2. Genetické úpravy

Velmi užitečnou technikou pro zjištění, jakou úlohu mají proteiny ve struktuře či regulaci mPTP je příprava mitochondrií s potlačenou expresí genu pro protein, jeho jednotku, či jenom s pozměněným genetickým kódem pro expresi určitých aminokyselin. K základním poznatkům se došlo ablací genu *Ppif*, který kóduje CypD nebo genů *ANT 1 a ANT 2*, jež kódují izomery ANT⁸⁵.

5. Role mPTP v patofyziologii

Ireverzibilní otevření mPTP je součástí projevu mnoha onemocnění. Jak už bylo zmiňováno, v důsledku zvýšené koncentrace vápenatých iontů, membránového potenciálu, pH, ANT, Pi nebo ROS, dochází k otevření tohoto kanálu, naprosté ztrátě funkce mitochondrie, uvolnění cytochromu c, vápenatých iontů, apoptických faktorů a následné apoptóze nebo nekróze⁸⁶. Otevření kanálu ale zapříčiňuje i mnoho dalších látek, o jejichž mechanismu účinku toho dosud mnoho nevíme. Patří mezi ně hormony štítné žlázy nebo melatonin^{87,82}.

5.1. Kardiovaskulární onemocnění

Během ischemicko-reperfuzního poškození dochází ve fázi reperfuze k otevření mPTP vlivem zvýšené hladiny ROS, porušení membránového potenciálu, a výkyvům v pH⁸⁸. Následuje smrt buňky, a to apoptickou či nekrotickou cestou. Jakým způsobem dojde k zániku buňky ovlivňuje její aktuální stav, tedy množství ATP, délka otevření mPTP a také stáří buňky⁸⁹. Bylo prokázáno, že při aplikaci CsA během prvních 2-3 minut reperfuze, se míra poškození tkáně výrazně sníží v důsledku inhibice otevření mPTP. Pokud je látka aplikovaná po uplynutí této doby, její účinky jsou mizivé. Dalším zkoumaným inhibítorem je sangliferin A, který na rozdíl od CsA, nemá tendenci blokovat funkci dalších peptidyl-prolyl cis-trans izomeras⁹⁰.

5.2. Neurodegenerativní onemocnění

Mnoho neurodegenerativních onemocnění se vyznačuje podobnými jevy, jako jsou nadprodukce ROS, porušení homeostázy kalcia, excitotoxicita, dysregulace funkce mitochondrií a akumulace a následná agregace nefunkčních nebo zmutovaných proteinů. Tyto děje často vedou k otevření mPTP a následné smrti nervové buňky a jsou často podmíněné stářím buňky⁹¹. Mezi choroby, v jejichž patologických procesech hraje mPTP důležitou roli, můžeme zahrnout Alzheimerovu chorobu, Parkinsonovu chorobu, amyotrofickou laterální sklerózu nebo Huntingtonovu chorobu.

5.2.1. Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba (AD) je chronické neurodegenerativní onemocnění, jehož první příznaky se projevují až v pokročilém věku. Je způsobeno nadměrným hromaděním tzv. amyloidů beta ($A\beta$), jež tvoří v buňkách agregáty a fibrily a způsobují tak smrt buňky. Další jev provázející AD je fosforylace Tau proteinů. Tau proteiny jsou proteiny, které se váží na mikrotubuly a jejich akumulace v buňkách nervové soustavy je toxická.

Přítomnost $A\beta$ v buňkách zvyšuje tvorbu ROS, porušuje kalciovou homeostázu, snižuje produkci ATP a následně dochází k otevření mPTP, uvolnění apoptických proteinů a smrti buňky⁹¹. Také bylo pozorováno, že v buňkách postižených AD, je zvýšená koncentrace CypD a buňky, které CypD neobsahují, nepodléhají apoptóze i za přítomnosti kalcia a dalších faktorů iniciujících apoptózu.

Jako u většiny chronických neurodegenerativních onemocnění, je i u tohoto případu možné pouze potlačovat příznaky této choroby, nikoliv ji definitivně vyléčit. K vývoji farmak definitivně léčících tuto chorobu je nutné znát její přesný mechanismus, který je s velkou pravděpodobností velmi úzce spojen s funkcí mPTP⁸⁶.

5.2.2. Huntingtonova choroba

Huntingtonova choroba (HD) je dědičné dominantně autosomální onemocnění. Obvykle se projevuje mezi 30-45 rokem života. Je způsobené zmnóžením tripletu CAG bází v genu, který kóduje gen huntingtin⁹². Počet tripletů se pohybuje mezi 36 a 180 a počet zmnóžení přímo ovlivňuje závažnost onemocnění a čas nástupu prvních příznaků. Mutace tohoto genu má vliv na správnou transkripci genů, na funkci proteasomu a poslední studie polemizují nad možností, že se zmutovaný huntingtin přímo váže na mitochondrii, narušuje homeostázu vápníku a tím indukuje otevření mPTP a následnou smrt buňky⁹³. V buňkách postižených HD byla také zaznamenána zvýšená hladina ROS, které též aktivují otevření mPTP. Dále huntingtin inhibuje expresi genu $PGC1\alpha$. To má za následek narušení mnoha metabolických procesů, např. biogeneze mitochondrie a proteinů oxidační fosforylace. Mutace genu pro huntingtin vede k odumírání buněk ve striatu a následně i v kortexu mozku⁹⁴.

6. Souhrn

V první části práce jsou shrnuty základní vlastnosti, struktura a funkce mitochondrie. Text popisuje podrobněji transport kalcia a jeho homeostázu v mitochondrii, enzymové komplexy OXPHOS, především ATP syntasy, a také signalizační kaskády vedoucí ke smrti buňky, ve kterých hraje mitochondrie důležitou roli.

Druhá část se zabývá výzkumem mPTP. Otevření tohoto kanálu nacházejícího se ve vnitřní membráně mitochondrie může být indukováno mnoha faktory např. zvýšenou hladinou vápenatých iontů v matrix mitochondrie nebo zvýšenou hladinou ROS a vede ke ztrátě membránového potenciálu, dysfunkci metabolických procesů probíhajících v mitochondrii, uvolnění proapoptických proteinů a následně k smrti buňky. Citlivost na otevření mPTP je značně snížena při interakci cyklického polypeptidu CsA s enzymem CypD. Na základě tohoto zjištění byly navrhovány experimenty, jejichž cílem bylo odhalit strukturu mPTP. Nejdříve byl navržen model složený z ANT, VDAC a CypD. Od této představy bylo upuštěno po sérii experimentů, které prokazovaly, že v nepřítomnosti proteinů VDAC a ANT stále dochází k otevření póru. Podrobněji byl zkoumán i proteinový kanál PiC a TSPO, ale též se prokázalo, že strukturálními částmi póru být nemohou, i když mají jisté regulační účinky. Po zjištění, že CypD se váže na podjednotku ATP syntasy OSCP, vznikly další modely. První návrh, jež pokládal za hlavní strukturální část kruh *c*-podjednotek membránové domény ATP syntasy, byl zamítnut, jelikož vnitřní prostředí *c*-kruhu se zdá být hydrofobní, tudíž nevhodné pro vytvoření kanálu průchozího pro ionty. Další hypotéza, jež předpokládá, že se pór tvoří na rozhraní dvou ATP syntas, nebyla zatím uspokojivě prokázána ani vyvrácena, a tak je debata na toto téma stále otevřená. V současné době se diskutuje také o existenci dvou pórů s podobnými vlastnostmi. Bylo totiž vůbec poprvé docíleno naprostého zavření mPTP, a to delecí genů pro všechny tři isoformy ANT a také genu pro CypD.

Poslední část se zabývá metodami výzkumu a patologickými procesy, ve kterých je otevření mPTP velmi podstatné.

Výzkum zaměřující se na strukturu a funkci mPTP je proto nesmírně významný z důvodu terapeutického uplatnění při vývoji nových léčebných postupů u rozličných patologických stavů.

Seznam literatury

- (1) Henze, K.; Martin, W.; Evolutionary Biology: Essence of Mitochondria. *Nature* **2003**
- (2) Anderson, S.; Bankier, A. T.; Barrell, B. G.; Bruijn, M. H. L. de; Coulson, A. R.; Drouin, J.; Eperon, I. C.; Nierlich, D. P.; Roe, B. A.; Sanger, F.; et al.: Sequence and Organization of the Human Mitochondrial Genome. *Nature* **1981**
- (3) van der Blik, A. M.; Sedensky, M. M.; Morgan, P. G.: Cell Biology of the Mitochondrion. *Genetics* **2017**
- (4) Kodíček, M.; Valentová, O.; Hynek, R.: Biochemie - Chemický pohled na biologický svět. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha. **2015**
- (5) Osellame, L. D.; Blacker, T. S.; Duchen, M. R.: Cellular and Molecular Mechanisms of Mitochondrial Function. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **2012**
- (6) Boyer, P. D.: The ATP Synthase-a Splendid Molecular Machine. *Annu. Rev. Biochem.* **1997**
- (7) Collinson, I. R.; van Raaij, M. J.; Runswick, M. J.; Fearnley, I. M.; Skehel, J. M.; Orriss, G. L.; Miroux, B.; Walker, J. E.: ATP Synthase from Bovine Heart Mitochondria. In Vitro Assembly of a Stalk Complex in the Presence of F₁-ATPase and in Its Absence. *J. Mol. Biol.* **1994**
- (8) Walker, J. E.; Runswick, M. J.; Poulter, L.: ATP Synthase from Bovine Mitochondria: The Characterization and Sequence Analysis of Two Membrane-Associated Sub-Units and of the Corresponding cDNAs. *J. Mol. Biol.* **1987**
- (9) Mukherjee, S.; Warshel, A.: The F₀F₁ ATP Synthase: From Atomistic Three-Dimensional Structure to the Rotary-Chemical Function. *Photosynth. Res.* **2017**
- (10) Giorgio, V.; Burchell, V.; Schiavone, M.; Bassot, C.; Minervini, G.; Petronilli, V.; Argenton, F.; Forte, M.; Tosatto, S.; Lippe, G.: Ca²⁺ Binding to F-ATP Synthase β Subunit Triggers the Mitochondrial Permeability Transition. *EMBO Rep.* **2017**
- (11) Nesci, S.; Trombetti, F.; Ventrella, V.; Pagliarani, A.: The C-Ring of the F₁F₀-ATP Synthase: Facts and Perspectives. *J. Membr. Biol.* **2016**
- (12) Walker, J. E.; Lutter, R.; Dupuis, A.; Runswick, M. J.: Identification of the Subunits of F₁F₀-ATPase from Bovine Heart Mitochondria. *Biochemistry* **1991**
- (13) Wittig, I.; Schagger, H.: Structural Organization of Mitochondrial ATP Synthase. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Bioenerg.* **2008**
- (14) Jonckheere, A. I.; Smeitink, J. A. M.; Rodenburg, R. J. T.: Mitochondrial ATP

Synthase: Architecture, Function and Pathology. *J. Inherit. Metab. Dis.* **2012**

(15) Chen, C.; Ko, Y.; Delannoy, M.; Ludtke, S. J.; Chiu, W.; Pedersen, P. L.: Mitochondrial ATP Synthasome: Three Dimensional Structure by Electron Microscopy of The ATP Synthase in Complex Formation with Carriers for Pi and ADP/ATP. *J. Biol. Chem.* **2004**

(16) Kerr, J. F. R.; Wyllie, A. H.; Currie, A. R.: Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-Ranging Implications in Tissue Kinetics. *Br. J. Cancer* **1972**

(17) Kale, J.; Osterlund, E. J.; Andrews, D. W.: Bcl-2 Family Proteins: Changing Partners in the Dance towards Death. *Cell Death Differ.* **2018**

(18) Nikolettou, V.; Markaki, M.; Palikaras, K.; Tavernarakis, N.: Crosstalk between Apoptosis, Necrosis and Autophagy. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **2013**

(19) Berridge, M. J.: The Versatility and Complexity of Calcium Signalling. *Novartis Found. Symp.* **2001**

(20) Orrenius, S.; Gogvadze, V.; Zhivotovsky, B.: Calcium and Mitochondria in the Regulation of Cell Death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2015**

(21) Haworth, R. A.; Hunter, D. R.: The Ca²⁺-Induced Membrane Transition in Mitochondria: II. Nature of the Ca²⁺ Trigger Site. *Arch. Biochem. Biophys.* **1979**

(22) Hunter, D. R.; Haworth, R. A. The Ca²⁺-Induced Membrane Transition in Mitochondria: I. The Protective Mechanisms. *Arch. Biochem. Biophys.* **1979**

(23) Crompton, M.; Costi, A.; Hayat, L.: Evidence for the Presence of a Reversible Ca²⁺-Dependent Pore Activated by Oxidative Stress in Heart Mitochondria. *Biochem. J.* **1987**

(24) Karch, J.; Molkenin, J. D.: Identifying the Components of the Elusive Mitochondrial Permeability Transition Pore. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2014**

(25) Galluzzi, L.; Blomgren, K.; Kroemer, G.: Mitochondrial Membrane Permeabilization in Neuronal Injury. *Nat. Rev. Neurosci.* **2009**

(26) Mattson, M. P.; Gleichmann, M.; Cheng, A.: Mitochondria in Neuroplasticity and Neurological Disorders. *Neuron* **2008**

(27) Hom, J. R.; Quintanilla, R. A.; Hoffman, D. L.; de Mesy Bentley, K. L.; Molkenin, J. D.; Sheu, S.-S.; Porter, G. A.: The Permeability Transition Pore Controls Cardiac Mitochondrial Maturation and Myocyte Differentiation. *Dev. Cell* **2011**

- (28) Bernardi, P.; Vassanelli, S.; Veronese, P.; Colonna, R.; Szabó, I.; Zoratti, M.: Modulation of the Mitochondrial Permeability Transition Pore. Effect of Protons and Divalent Cations. *J. Biol. Chem.* **1992**
- (29) Basso, E.; Petronilli, V.; Forte, M. A.; Bernardi, P.: Phosphate Is Essential for Inhibition of the Mitochondrial Permeability Transition Pore by Cyclosporin A and by Cyclophilin D Ablation. *J. Biol. Chem.* **2008**
- (30) Crompton, M.; Ellinger, H.; Costi, A.: Inhibition by Cyclosporin A of a Ca²⁺-Dependent Pore in Heart Mitochondria Activated by Inorganic Phosphate and Oxidative Stress. *Biochem. J.* **1988**
- (31) Halestrap, A. P.; Davidson, A. M.: Inhibition of Ca²⁺-Induced Large-Amplitude Swelling of Liver and Heart Mitochondria by Cyclosporin Is Probably Caused by the Inhibitor Binding to Mitochondrial-Matrix Peptidyl-Prolyl Cis-Trans Isomerase and Preventing It Interacting with the Adenine Nucleotide Translocase. *Biochem. J.* **1990**
- (32) Szabó, I.; Zoratti, M.: The Mitochondrial Permeability Transition Pore May Comprise VDAC Molecules. I. Binary Structure and Voltage Dependence of the Pore. *FEBS Lett.* **1993**
- (33) Woodfield, K.; Rück, A.; Brdiczka, D.; Halestrap, A. P.: Direct Demonstration of a Specific Interaction between Cyclophilin-D and the Adenine Nucleotide Translocase Confirms Their Role in the Mitochondrial Permeability Transition. *Biochem. J.* **1998**
- (34) Liu, Y.; Chen, X. J.: Adenine Nucleotide Translocase, Mitochondrial Stress, and Degenerative Cell Death. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2013**
- (35) Klingenberg, M.: The ADP and ATP Transport in Mitochondria and Its Carrier. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2008**
- (36) Leung, A. W. C.; Halestrap, A. P.: Recent Progress in Elucidating the Molecular Mechanism of the Mitochondrial Permeability Transition Pore. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **2008**
- (37) Kokoszka, J. E.; Waymire, K. G.; Levy, S. E.; Sligh, J. E.; Cai, J.; Jones, D. P.; MacGregor, G. R.; Wallace, D. C.: The ADP/ATP Translocator Is Not Essential for the Mitochondrial Permeability Transition Pore. *Nature* **2004**
- (38) Davis, T. L.; Walker, J. R.; Campagna-Slater, V.; Finerty, P. J.; Paramanathan, R.; Bernstein, G.; MacKenzie, F.; Tempel, W.; Ouyang, H.; Lee, W. H.: Structural and Biochemical Characterization of the Human Cyclophilin Family of Peptidyl-Prolyl Isomerases. *PLoS Biol.* **2010**

- (39) Wang, P.; Heitman, J. :The Cyclophilins. *Genome Biol.* **2005**
- (40) Borel, J. F.; Feurer, C.; Magnée, C.; Stähelin, H.: Effects of the New Anti-Lymphocytic Peptide Cyclosporin A in Animals. *Immunology* **1977**
- (41) Liu, J.; Farmer, J. D.; Lane, W. S.; Friedman, J.; Weissman, I.; Schreiber, S. L.: Calcineurin Is a Common Target of Cyclophilin-Cyclosporin A and FKBP-FK506 Complexes. *Cell* **1991**
- (42) Basso, E.; Fante, L.; Fowlkes, J.; Petronilli, V.; Forte, M. A.; Bernardi, P.: Properties of the Permeability Transition Pore in Mitochondria Devoid of Cyclophilin D. *J. Biol. Chem.* **2005**
- (43) Altschuld, R. A.; Hohl, C. M.; Castillo, L. C.; Garleb, A. A.; Starling, R. C.; Brierley, G. P.: Cyclosporin Inhibits Mitochondrial Calcium Efflux in Isolated Adult Rat Ventricular Cardiomyocytes. *Am. J. Physiol.* **1992**
- (44) Tiepolo, T.; Angelin, A.; Palma, E.; Sabatelli, P.; Merlini, L.; Nicolosi, L.; Finetti, F.; Braghetta, P.; Vuagniaux, G.; Dumont, J.-M.: The Cyclophilin Inhibitor Debio 025 Normalizes Mitochondrial Function, Muscle Apoptosis and Ultrastructural Defects in Col6a1^{-/-} Myopathic Mice. *Br. J. Pharmacol.* **2009**
- (45) Hansson, M. J.; Mattiasson, G.; Månsson, R.; Karlsson, J.; Keep, M. F.; Waldmeier, P.; Ruegg, U. T.; Dumont, J.-M.; Besseghir, K.; Elmér, E.: The Nonimmunosuppressive Cyclosporin Analogs NIM811 and UNIL025 Display Nanomolar Potencies on Permeability Transition in Brain-Derived Mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* **2004**
- (46) Colombini, M. Voltage Gating in the Mitochondrial Channel, VDAC. *J. Membr. Biol.* **1989**
- (47) Shoshan-Barmatz, V.; De Pinto, V.; Zweckstetter, M.; Raviv, Z.; Keinan, N.; Arbel, N.: VDAC, a Multi-Functional Mitochondrial Protein Regulating Cell Life and Death. *Mol. Aspects Med.* **2010**
- (48) Crompton, M.; Virji, S.; Ward, J. M.: Cyclophilin-D Binds Strongly to Complexes of the Voltage-Dependent Anion Channel and the Adenine Nucleotide Translocase to Form the Permeability Transition Pore. *Eur. J. Biochem.* **1998**
- (49) Baines, C. P.; Kaiser, R. A.; Sheiko, T.; Craigen, W. J.; Molkenin, J. D.: Voltage-Dependent Anion Channels Are Dispensable for Mitochondrial-Dependent Cell Death. *Nat. Cell Biol.* **2007**
- (50) Gutiérrez-Aguilar, M.; Douglas, D. L.; Gibson, A. K.; Domeier, T. L.;

Molkentin, J. D.; Baines, C. P.: Genetic Manipulation of The Cardiac Mitochondrial Phosphate Carrier Does Not Affect Permeability Transition. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2014**

(51) Varanyuwatana, P.; Halestrap, A. P.: The Roles of Phosphate and the Phosphate Carrier in the Mitochondrial Permeability Transition Pore. *Mitochondrion* **2012**

(52) Baines, C. P.: The Molecular Composition of the Mitochondrial Permeability Transition Pore. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2009**

(53) Fontaine, E.; Eriksson, O.; Ichas, F.; Bernardi, P.: Regulation of the Permeability Transition Pore in Skeletal Muscle Mitochondria. Modulation By Electron Flow through the Respiratory Chain Complex i. *J. Biol. Chem.* **1998**

(54) Walter, L.; Miyoshi, H.; Leverve, X.; Bernard, P.; Fontaine, E.: Regulation of the Mitochondrial Permeability Transition Pore by Ubiquinone Analogs. A Progress Report. *Free Radic. Res.* **2002**

(55) Starkov, A. A.: The Role of Mitochondria in Reactive Oxygen Species Metabolism and Signaling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2008**

(56) Braestrup, C.; Squires, R. F.: Specific Benzodiazepine Receptors in Rat Brain Characterized by High-Affinity (3H) Diazepam Binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1977**

(57) Papadopoulos, V.; Baraldi, M.; Guilarte, T. R.; Knudsen, T. B.; Lacapère, J.-J.; Lindemann, P.; Norenberg, M. D.; Nutt, D.; Weizman, A.; Zhang, M.-R.: Translocator Protein (18kDa): New Nomenclature for the Peripheral-Type Benzodiazepine Receptor Based on Its Structure and Molecular Function. *Trends Pharmacol. Sci.* **2006**

(58) Pastorino, J. G.; Simbula, G.; Gilfor, E.; Hoek, J. B.; Farber, J. L.: Protoporphyrin IX, an Endogenous Ligand of the Peripheral Benzodiazepine Receptor, Potentiates Induction of the Mitochondrial Permeability Transition and the Killing of Cultured Hepatocytes by Rotenone. *J. Biol. Chem.* **1994**

(59) Šileikytė, J.; Blachly-Dyson, E.; Sewell, R.; Carpi, A.; Menabò, R.; Di Lisa, F.; Ricchelli, F.; Bernardi, P.; Forte, M.: Regulation of the Mitochondrial Permeability Transition Pore by the Outer Membrane Does Not Involve the Peripheral Benzodiazepine Receptor (Translocator Protein of 18 KDa (TSPO)). *J. Biol. Chem.* **2014**

(60) Stelzer, A. C.; Frazee, R. W.; Huis, C. V.; Cleary, J.; Opipari, A. W.; Glick, G. D.; Al-Hashimi, H. M.: NMR Studies of an Immunomodulatory Benzodiazepine Binding to Its Molecular Target on the Mitochondrial F1F0-ATPase. *Biopolymers* **2010**

(61) Bernardi, P.; Giorgio, V.: EBEC 2012—An Energetic Time in Freiburg.

Freiburg, Germany, *EMBO Rep.* **2013**

(62) Bernardi, P.: The Mitochondrial Permeability Transition Pore: A Mystery Solved? *Front. Physiol.* **2013**

(63) Blatt, N. B.; Bednarski, J. J.; Warner, R. E.; Leonetti, F.; Johnson, K. M.; Boitano, A.; Yung, R.; Richardson, B. C.; Johnson, K. J.; Ellman, J. A.: Benzodiazepine-Induced Superoxide Signals B Cell Apoptosis: Mechanistic Insight and Potential Therapeutic Utility. *J. Clin. Invest.* **2002**

(64) Giorgio, V.; von Stockum, S.; Antoniel, M.; Fabbro, A.; Fogolari, F.; Forte, M.; Glick, G. D.; Petronilli, V.; Zoratti, M.; Szabó, I.: Dimers of Mitochondrial ATP Synthase Form the Permeability Transition Pore. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**

(65) Alavian, K. N.; Beutner, G.; Lazrove, E.; Sacchetti, S.; Park, H.-A.; Licznarski, P.; Li, H.; Nabili, P.; Hockensmith, K.; Graham, M.: An Uncoupling Channel within the C-Subunit Ring of the F₁F₀ ATP Synthase Is the Mitochondrial Permeability Transition Pore. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**

(66) Bonora, M.; Bononi, A.; De Marchi, E.; Giorgi, C.; Lebedzinska, M.; Marchi, S.; Patergnani, S.; Rimessi, A.; Suski, J. M.; Wojtala, A.: Role of the c Subunit of the F₀ ATP Synthase in Mitochondrial Permeability Transition. *Cell Cycle* **2013**

(67) He, J.; Ford, H. C.; Carroll, J.; Ding, S.; Fearnley, I. M.; Walker, J. E.: Persistence of the Mitochondrial Permeability Transition in the Absence of Subunit c of Human ATP Synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2017**

(68) Dyer, M. R.; Walker, J. E.: Sequences of Members of the Human Gene Family for the c Subunit of Mitochondrial ATP Synthase. *Biochem. J.* **1993**

(69) Zhou, W.; Marinelli, F.; Nief, C.; Faraldo-Gómez, J. D.: Atomistic Simulations Indicate the C-Subunit Ring of the F₁F₀ ATP Synthase Is Not the Mitochondrial Permeability Transition Pore. *eLife* **2017**

(70) Halestrap, A. P.: The C Ring of the F₁F₀ – ATP Synthase Forms the Mitochondrial Permeability Transition Pore: A Critical Appraisal. *Front. Oncol.* **2014**

(71) Giorgio, V.; Bisetto, E.; Soriano, M. E.; Dabbeni-Sala, F.; Basso, E.; Petronilli, V.; Forte, M. A.; Bernardi, P.; Lippe, G.: Cyclophilin D Modulates Mitochondrial F₀F₁-ATP Synthase by Interacting with the Lateral Stalk of the Complex. *J. Biol. Chem.* **2009**

(72) He, J.; Carroll, J.; Ding, S.; Fearnley, I. M.; Walker, J. E.: Permeability Transition in Human Mitochondria Persists in the Absence of Peripheral Stalk Subunits of

ATP Synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2017**

(73) Bernardi, P.: Why F-ATP Synthase Remains a Strong Candidate as the Mitochondrial Permeability Transition Pore. *Front. Physiol.* **2018**

(74) Antoniel, M.; Jones, K.; Antonucci, S.; Spolaore, B.; Fogolari, F.; Petronilli, V.; Giorgio, V.; Carraro, M.; Di Lisa, F.; Forte, M.: The Unique Histidine in OSCP Subunit of F-ATP Synthase Mediates Inhibition of the Permeability Transition Pore by Acidic pH. *EMBO Rep.* **2018**

(75) Karch, J.; Bround, M. J.; Khalil, H.; Sargent, M. A.; Latchman, N.; Terada, N.; Peixoto, P. M.; Molkentin, J. D.: Inhibition of Mitochondrial Permeability Transition by Deletion of the ANT Family and CypD, *bioRxiv* **2018**

(76) Huang, M.; Camara, A. K. S.; Stowe, D. F.; Qi, F.; Beard, D. A.: Mitochondrial Inner Membrane Electrophysiology Assessed by Rhodamine-123 Transport and Fluorescence. *Ann. Biomed. Eng.* **2007**

(77) Perry, S. W.; Norman, J. P.; Barbieri, J.; Brown, E. B.; Gelbard, H. A.: Mitochondrial Membrane Potential Probes and the Proton Gradient: A Practical Usage Guide. *BioTechniques* **2011**.

(78) Ameziane El Hassani, R.; Dupuy, C.: Detection of Intracellular Reactive Oxygen Species (CM-H2DCFDA). *Bio-Protoc.* **2013**

(79) Held, P.: An Introduction to Reactive Oxygen Species. BioTek Instruments, Inc. **2015**

(80) Sesso, A.; Belizário, J.; Marques, M.; Higuchi, M.; Schumacher, R.; Colquhoun, A.; Ito, E.; Kawakami, J.: Mitochondrial Swelling and Incipient Outer Membrane Rupture in Preapoptotic and Apoptotic Cells. *Anat. Rec. Hoboken Nj 2007* **2012**

(81) Drahotka, Z.; Endlicher, R.; Staňková, P.; Rychtrmoc, D.; Milerová, M.; Červinková, Z.: Characterization of Calcium, Phosphate and Peroxide Interactions in Activation of Mitochondrial Swelling Using Derivative of the Swelling Curves. *J. Bioenerg. Biomembr.* **2012**

(82) Endlicher, R.; Drahotka, Z.; Červinková, Z.: In Vitro and In Vivo Activation of Mitochondrial Membrane Permeability Transition Pore Using Triiodothyronine. **2016**

(83) Quinlan, P. T.; Thomas, A. P.; Armston, A. E.; Halestrap, A. P.: Measurement of the Intramitochondrial Volume in Hepatocytes without Cell Disruption and Its Elevation by Hormones and Valinomycin. *Biochem. J.* **1983**

(84) Frey, T. G.; Renken, C. W.; Perkins, G. A.: Insight into Mitochondrial

Structure and Function from Electron Tomography. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **2002**

(85) Karch, J.; Bround, M. J.; Khalil, H.; Sargent, M. A.; Latchman, N.; Terada, N.; Peixoto, P. M.; Molkentin, J. D.: Inhibition of Mitochondrial Permeability Transition by Deletion of the ANT Family and CypD: *bioRxiv* **2018**

(86) Rao, V. K.; Carlson, E. A.; Yan, S. S.: Mitochondrial Permeability Transition Pore Is a Potential Drug Target for Neurodegeneration. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**

(87) Martinis, P.; Zago, L.; Maritati, M.; Battaglia, V.; Grancara, S.; Rizzoli, V.; Agostinelli, E.; Bragadin, M.; Toninello, A.: Interactions of Melatonin with Mammalian Mitochondria. Reducer of Energy Capacity and Amplifier of Permeability Transition. *Amino Acids* **2012**

(88) Chouchani, E. T.; Pell, V. R.; James, A. M.; Work, L. M.; Saeb-Parsy, K.; Frezza, C.; Krieg, T.; Murphy, M. P.: A Unifying Mechanism for Mitochondrial Superoxide Production during Ischemia-Reperfusion Injury. *Cell Metab.* **2016**

(89) Kroemer, G.; Galluzzi, L.; Vandenabeele, P.; Abrams, J.; Alnemri, E.; Baehrecke, E.; Blagosklonny, M.; El-Deiry, W.; Golstein, P.; Green, D.: Classification of Cell Death. *Cell Death Differ.* **2009**

(90) Halestrap, A. P.; Richardson, A. P.: The Mitochondrial Permeability Transition: A Current Perspective on Its Identity and Role in Ischaemia / Reperfusion Injury. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2015**

(91) Lin, M. T.; Beal, M. F.: Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Nature* **2006**

(92) Johri, A.; Chandra, A.; Beal, M. F.: PGC-1 α , Mitochondrial Dysfunction and Huntington's Disease. *Free Radic. Biol. Med.* **2013**

(93) Costa, V.; Scorrano, L.: Shaping the Role of Mitochondria in the Pathogenesis of Huntington's Disease: Mitochondrial and Huntington's Disease. *EMBO J.* **2012**

(94) Quintanilla, R. A.; Jin, Y. N.; von Bernhardi, R.; Johnson, G. V.: Mitochondrial Permeability Transition Pore Induces Mitochondria Injury in Huntington Disease. *Mol. Neurodegener.* **2013**

(95) Kuznetsov, A. V.; Margreiter, R.: Heterogeneity of Mitochondria and Mitochondrial Function within Cells as Another Level of Mitochondrial Complexity. *Int. J. Mol. Sci.* **2009**

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.

Jméno,příjmení, adresa	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka