

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně očitovat.

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Šimon Antoš

Charakterizace role vybraných anti-apoptických proteinů z Bcl-2 rodiny v mitochondriálním metabolismu

Characterization of a role of selected antiapoptotic Bcl-2 family proteins in mitochondrial metabolism

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Ladislav Anděra, CSc.

Praha, 2021

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, 10. 8. 2021

Bc. Šimon Antoš

Poděkování: Chtěl bych zde poděkovat především svému školiteli doktoru Ladislavu Anděrovi za jeho trpělivou podporu, odborné vedení diplomové práce a celého našeho týmu. Dále bych rád poděkoval členkám našeho mezinárodního týmu Daně Sovilj a Cristině-Daniele Kelemen, které mě naučily většinu zde uvedených metod. Velký dík patří i ostatním členům laboratoře Molekulární terapie při Biotechnologickém ústavu Akademie věd ČR pod vedením profesora Jiřího Neužila, mezi kterými bych zejména rád zmínil doktorku Zuzanu Naháckou. Bez podpory zde uvedených by tato práce nevznikla.

Tato práce byla částečně financována z grantu GAČR č. 19-08772S.

Acknowledgment: Here I would like to thank my supervisor doctor Ladislav Anděra for his patient support, professional guidance of this diploma thesis and our whole team. I also would like to thank other members of our international team Dana Sovilj and Cristina-Daniela Kelemen, who taught me most of the methods used in this Thesis. Many thanks go also to other members of the Molecular therapy laboratory at the Institute of Biotechnology of the Czech Academy of Sciences led by professor Jiří Neužil, among them I would especially like to mention doctor Zuzana Nahácka. Without their support this work would be hardly realized.

This work was partially financed by CSF grant No. 19-08772S.

Abstrakt

Proteiny z rodiny Bcl-2 jsou již po více než tři desetiletí předmětem intenzivního výzkumu, a to zejména pro jejich klíčovou roli v principiálním modu regulované buněčné smrti – apoptóze. V posledním desetiletí se Bcl-2 proteiny stále více propojují s rozmanitými buněčnými signalizacemi a je nyní kladen důraz i na jejich roli v regulaci buněčného metabolismu a respiraci. V této práci jsme analyzovali roli Bcl-2 proteinů pomocí jejich eliminace ve vybraných nádorových liniích metodou CRISPR-Cas12a a následné analýzy mitochondriální respirace, glykolýzy a hladiny klíčových metabolitů. Naše výsledky potvrdily vliv Bcl-2 proteinů na úroveň mitochondriální respirace, přičemž eliminace anti-apoptotických proteinů Bcl-2, Bcl-X_L či Mcl-1 dokázala snížit výrazně vyšší respiraci modelových U87-MG glioblastomových buněk s eliminovanou expresí pro-apoptotických proteinů Bax a Bak na úroveň parentálních buněk. Ztráta multidoménových jak pro-apoptotických, tak i anti-apoptotických proteinů z Bcl-2 rodiny výrazně ovlivňuje mitochondriální respiraci a poukazuje tak na jejich účast v regulaci oxidativní fosforylace.

Klíčová slova: Apoptóza, Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, Bax, Bak, mitochondriální respirace, glykolýza, buněčný metabolismus

Abstract

Proteins from the Bcl-2 family are now for over 30 years widely studied mainly for their key role in apoptosis, a principal mode of regulated cell death. In the last ten years Bcl-2 proteins were also linked to the regulation of cellular signaling, mainly cellular metabolism and respiration. In this study we aimed to analyze non-apoptotic function of Bcl-2 proteins by their genetic elimination using the CRISPR-Cas12a approach and by the subsequent analysis of mitochondrial respiration, glycolysis and metabolic profiling. Our results confirmed that Bcl-2 proteins can modulate the level of mitochondrial respiration. The elimination of anti-apoptotic proteins Bcl-2, Bcl-XL and Mcl-1 decreased high respiration of cells lacking pro-apoptotic proteins Bax and Bak to the levels observed in parental U87-MG glioblastoma cells. Therefore, the loss of anti-apoptotic Bcl-2 proteins has greatly impacted mitochondrial respiration and it points to their role in a regulation of oxidative phosphorylation.

Key words: Apoptosis, Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, Bax, Bak, mitochondrial respiration, glycolysis, cellular metabolism

Obsah

Abstrakt	3
Abstract.....	3
Seznam použitých zkratk	5
1 Úvod	7
2 Cíle práce.....	8
3 Přehled literatury	8
3.1 Zjednodušené schéma apoptotické dráhy a sekvenční vztahy členů Bcl-2 rodiny	8
3.2 Buněčná lokalizace/funkce proteinů z Bcl-2 rodiny.....	12
3.3 Protein Bcl-2 a jeho intracelulární lokalizace, interakce a vztah k metabolismu.....	14
3.4 Protein Bcl-X _L a jeho intracelulární lokalizace, interakce a vztah k metabolismu	18
3.5 Protein Mcl-1 a jeho intracelulární lokalizace, interakce a vztah k metabolismu.....	20
4 Metodika a materiály	21
4.1 Základní buněčné linie a jejich kultivace	21
4.2 Příprava CRISPR vektoru pro eliminaci exprese vybraných genů z Bcl-2 rodiny	22
4.3 Lipofekce a elektroporace cílových buněk	24
4.4 Separace transfekovaných buněk pomocí průtokové cytometrie/sortingu.....	24
4.5 SDS-PAGE a Western blot.....	25
4.6 Analýza mitochondriální respirace a glykolýzy	27
4.7 Analýza buněčné respirace O ₂ k respirometrem	28
4.8 Analýza vybraných komponent buněčného metabolismu	29
5 Výsledky.....	29
5.1 Eliminace exprese vybraných anti-apoptických proteinů z rodiny Bcl-2 pomocí CRISPR-Cas12a.....	29
5.2 Měření OCR a stav mitochondriální respirace	31
5.2.1 Analýza mitochondriální respirace u Bcl-2 deficitních klonů 10 a 15	33
5.2.2 Analýza mitochondriální respirace u Bcl-X _L deficitních klonů 2 a 6	34
5.2.3 Analýza mitochondriální respirace u Mcl-1 deficitních klonů 2 a 8.....	35
5.2.4 Analýza mitochondriální respirace O ₂ k respirometrem	36
5.3 Měření acidifikace média (ECAR) a analýza glykolýzy	37
5.3.1 Analýza glykolýzy u Bcl-2 deficitních klonů 10 a 15	38
5.3.2 Analýza glykolýzy u Bcl-X _L deficitních klonů 2 a 6.....	38
5.3.3 Analýza glykolýzy u Mcl-1 deficitních klonů 2 a 8	39
5.4 Metabolomická analýza.....	39
6 Diskuse	40
7 Souhrn.....	45
8 Přílohy	46
8.1 Příloha 1	46
8.2 Příloha 2	47
8.3 Příloha 3	48
9 Seznam použité literatury	52

Seznam použitých zkratk

* – souhrnná literatura typu review

14-3-3 – rodina regulačních proteinů

ADP – adenosindifosfát

ANT – adenin nukleotid translokáza

Apaf-1 – aktivační faktor apoptotických proteáz 1

APS – peroxodisíran amonný

ATP – adenosintrifosfát

ATPáza – adenosin trifosfatáza

BH doména – Bcl-2 homologická doména

BH3 proteiny – proteiny z rodiny Bcl-2 obsahující pouze doménu BH3

BIOCEV – Biotechnologické a biomedicínské centrum Akademie věd ČR a Univerzity Karlovy ve Vestci

BpiI – restrikční enzym BpiI

Bpr – F prekurzor bacilopeptidázy

CCCP – protonofor carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone

CDK1 – cyklin-dependentní kináza 1

COX – cytochrom c oxidáza

CRISPR-Cas12a – metoda využívající nahromaděných pravidelně rozmístěných krátkých palindromických repetit a Cas12a nukleázy (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats – Cas12a*)

DLC1 – protein 1 deletovaný v rakovině jater

DLC2 – protein 2 deletovaný v rakovině jater

DMEM – Dulbeccovo modifikované esenciální médium

DMSO – dimethylsulfoxid

DRAM1 – modulátor autofagie 1 regulovaný poškozením DNA

DTT – dithiotreitol

ECAR – míra extracelulární acidifikace

ER – endoplazmatické retikulum

Fas – receptor smrti Fas

FasL – ligand receptoru smrti Fas

FCCP – carbonylcyanide-4-trifluoromethoxyphenylhydrazone

FKBP38 – protein 38 vázající peptidyl prolyl cis/trans izomerázu FK506

GFP – zelený fluorescenční protein

GTPáza – guanosintrifosfát fosfohydroláza

GTPáza Drp1 –

hiPSC-CM – kardiomyocyty odvozené od lidských indukovaných kmenových buněk

Hrk – aktivátor apoptózy harakiri

IAPs – proteiny inhibitory apoptózy

IMDM+ - Iscovo modifikované Dulbecco médium plus

IP3R – receptor inositol trifosfátů

LB médium – médium z lysogenního vývaru

Mff – mitochondriální štěpný faktor (*Mitochondrial fission factor*)

Mill – protein *microsporeless 1*

MOMP – permeabilizace vnější mitochondriální membrány

NADPH/NADP⁺ – Nikotinamidadenin dinukleotidfosfát

NADH/NAD⁺ - Nikotinamidadenin dinukleotid

NFM – netučné mléko

NHEJ – nehomologní spojení konců

OCR – míra spotřeby kyslíku

OPA1 – GTPáza exprimovaná z genu Optická atrofie 1

p53 – tumor protein p53

PBS – fosfátem pufovaný fyziologický roztok

PCR – polymerázová řetězová reakce

PenStrep – směs Penicilinu G a Streptomycinu popsaná v kapitole Metody

Rac1 – Ras-příbuzný C3 botulinum toxin substrát 1

ROS – reaktivní formy kyslíku

SDS – dodecylsírán sodný

SDS-PAA – SDS polyakrylamidový gel

SDS-PAGE – elektroforéza v polyakryamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíránu sodného

Smac/DIABLO – druhý z mitochondrie odvozený aktivátor kaspáz

snMcl-1 – zkrácená, jaderná verze proteinu Mcl-1

tBid – zkrácená forma proteinu Bid

TBS – tris pufrovaný fyziologický roztok

TEMED – tertramethylethylendiamin

TIM – protein transportér do mitochondrií

TM – COOH-terminální transmembránová doména

TNF-R – receptor faktoru nádorové nekrózy

TOM – protein transportér vně mitochondrií

TRAIL – TNF vztažený apoptózu indukující ligand

trMcl-1 – zkrácený protein Mcl-1

U87-MG BB^{-/-} - linie lidské glioblastomy s eliminovanou produkcí proteinů Bax a Bak

VDAC1, 2 – na napětí závislý aniont selektivní kanál 1 a 2

VLCAD – acyl-koenzym A dehydrogenáza velmi dlouhých řetězců mastných kyselin (*very long-chain acyl-coenzym A dehydrogenase*)

WB – metoda Western blot

1 Úvod

Proteiny z rodiny Bcl-2 jsou pojmenované proteinu Bcl-2 (protein B buněčného lymfomu 2, *B-cell lymphoma 2*), který byl objeven v osmdesátých letech minulého století (Pegoraro *et al.* 1984). Extenzivní výzkum je zaměřen zejména na jejich klíčovou roli v procesech regulované buněčné smrti. Mitochondriální apoptotická buněčná smrt je v buňkách indukována a regulována interakcemi mezi pro- a anti-apoptotickými členy této rodiny. Role a význam těchto interakcí byly donedávna studovány především v rámci výzkumu a terapie nádorových onemocnění.

Anti-apoptotické proteiny z rodiny Bcl-2 (zejména Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1) jsou v mnoha nádorových onemocněních výrazně nadprodukovány - například u akutní myeloidní leukémie (Kaufmann *et al.* 1998) nebo akutní lymfoblastické leukémie (Findley *et al.* 1997). Zvýšená exprese anti-apoptotických proteinů také přímo souvisí se zvýšenou schopností nádorových buněk odolávat apoptóze indukované například následkem ionizujícího záření (Findley *et al.* 1997), či určitými chemoterapeutiky (*Yamaguchi *et al.* 2019). Extenzivní výzkum molekulárně-funkčních vlastností nejen výše uvedených antiapoptotických proteinů vedl k přípravě a ke klinickému testování jejich specifických nízkomolekulárních inhibitorů. Mezi ně patří například Venetoclax (ABT-199), inhibitor proteinu Bcl-2 schválený a používaný k léčbě chronické lymfocytární leukémie, akutní myeloidní leukémie a lymfomu z malých lymfocytů (*Molica 2020; *Lasica & Anderson 2021). Nicméně právě probíhající výzkum nastiňuje jeho možné využití i v terapii dalších nádorových onemocnění (*Juárez-Salcedo *et al.* 2019; *Kehr & Vogler 2021). V klinickém testování jsou také specifické inhibitory dalších dvou majoritních anti-apoptotických proteinů – Mcl-1 a Bcl-X_L (*D’Aguanno & Del Bufalo 2020).

V posledních letech se výzkum Bcl-2 proteinů věnuje také jejich vztahu k regulaci buněčného metabolismu a signalizace. Studie nejdříve lokalizovaly proteiny Bcl-2 do téměř všech buněčných kompartmentů, včetně jádra, endoplazmatického retikula a zejména mitochondrií. Navazující studie pak lokalizace spojily přímo s regulací signalizace (např. transport Ca²⁺) nebo přímo s buněčným metabolismem. Informace o zapojení a roli proteinů z Bcl-2 rodiny v regulaci buněčného metabolismu jsou doposud poměrně fragmentované a hlubší porozumění vztahu mezi Bcl-2 proteiny a buněčným metabolismem bude nepochybně vyžadovat rozsáhlejší a podrobnější výzkum. V této práci jsme analyzovali vliv proteinů Bcl-2 na úroveň glykolýzy,

mitochondriální respirace a hladiny klíčových metabolitů pomocí CRISPR-Cas12a eliminačních experimentů pro proteiny Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, Bax a Bak.

2 Cíle práce

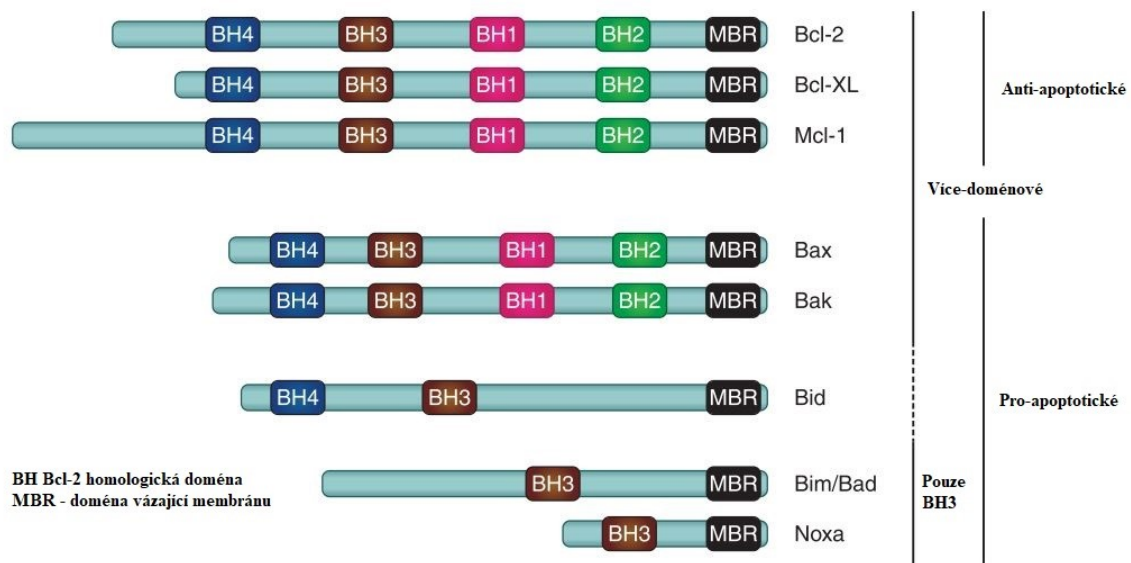
- Prvním cílem této práce bylo připravit funkční buněčné linie s vyřazenou produkcí anti-apoptotických proteinů Bcl-2, Bcl-X_L a Mcl-1 a pro-apoptotických proteinů Bax, Bak pomocí metody CRISPR-Cas12a.
- Navazujícím cílem této práce bylo dále sledovat vliv vyřazení proteinů Bcl-2, Bcl-X_L a Mcl-1 z rodiny Bcl-2 na buněčný metabolismus a případně spojit výsledné trendy změn v mitochondriální respiraci, glykolýze a hladinách metabolitů s našimi dosavadními výsledky výzkumu proteinů Bax, Bak (zatím nepublikovaná data) a uvést je do kontextu s publikovanými zdroji.

3 Přehled literatury

3.1 Zjednodušené schéma apoptotické dráhy a sekvenční vztahy členů Bcl-2 rodiny

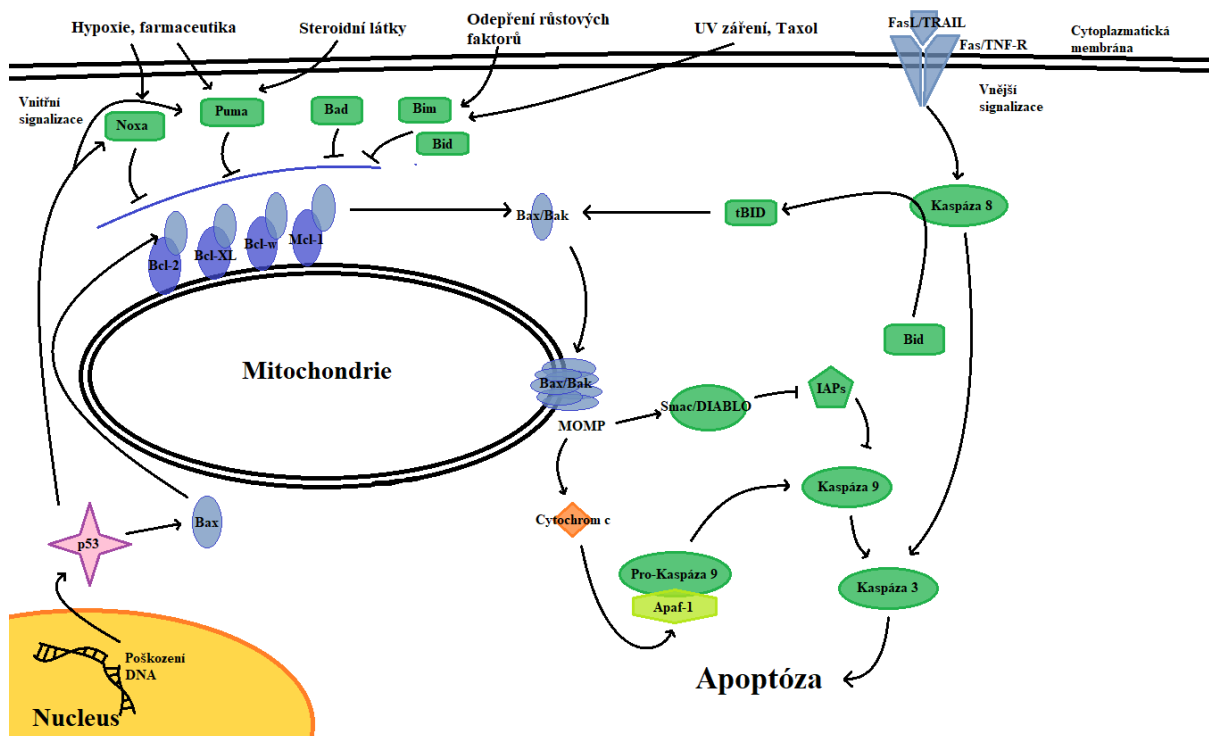
Proteiny z rodiny Bcl-2 jsou rozšířeny a evolučně konzervovány zejména u obratlovců, ale jejich homology lze nalézt i u bezobratlých a některých virů (*Banjara *et al.* 2020). Bcl-2 proteiny se vyskytují již u houbovců (*Porifera*), kde ortology proteinu Bcl-2 a Bak zřejmě fungují podobně jako u obratlovců. Mechanismy aktivace a regulace apoptotické smrti Bcl-2 proteiny se tak zdají konzervované a hrají esenciální roli zvláště v třídě savců (Caria *et al.* 2018).

Bcl-2 proteiny lze zjednodušeně rozdělit podle čtyř hlavních homologických BH domén, které mezi sebou členové Bcl-2 rodiny v různých obměnách sdílejí (obr. 1).



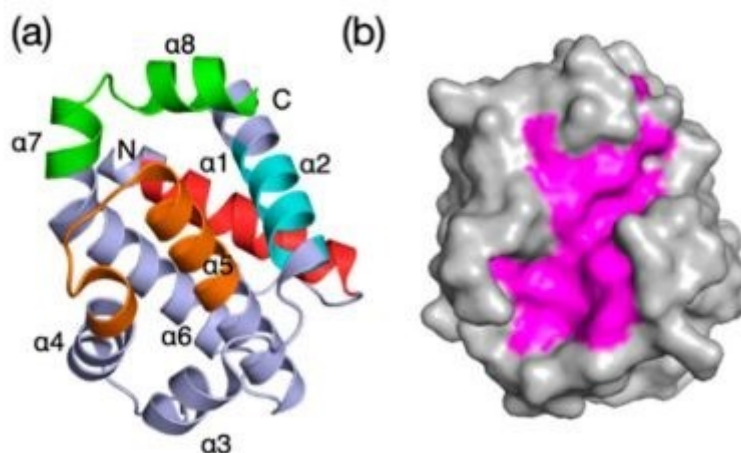
Obrázek 1 – Schématické zobrazení hlavních členů proteinové rodiny Bcl-2 a jejich homologií. Každý člen rodiny Bcl-2 obsahuje minimálně jednu z BH domén a většina z nich také transmembránovou doménu (MBR – membrane-binding region) interagující s vnější mitochondriální membránou, ale také například s membránou endoplazmatického retikula. Tyto homologie dovolují proteinům mezi sebou interagovat. Tak je tomu například u Bak a Bax, které mohou oligomerovat ve vnější membráně mitochondrií a permeabilizovat ji. Důležitá je také doména BH3, která dovoluje pro-apoptickým proteinům typu Bid, Bim, Bad a Noxa interagovat s ostatními proteiny Bcl-2 rodiny. Upraveno a převzato z (*Shamas-Din *et al.* 2013).

Více-doménové proteiny, které obsahují domény BH1-4 rozdělujeme funkčně na pro-apoptické, například Bak, Bax, a anti-apoptické, především Bcl-2, Bcl-X_L a Mcl-1. Vlastní skupinu mají pak pro-apoptické proteiny pouze s doménou BH3 (BH3 proteiny), například Bim, Bad a Noxa (*Shamas-Din *et al.* 2013), přičemž právě interakce BH3 domény těchto proteinů s anti-apoptickými proteiny, např. Bcl-2 či Mcl-1, je součástí jejich pro-apoptické funkce. BH3 doména je mimikována novými protirakovinnými látkami, například již dříve zmíněným Venetoclaxem (*Juárez-Salcedo *et al.* 2019). Bcl-2 proteiny spolu interagují na základě svých strukturních a sekvenčních homologií a vytvářejí tak vnitřní signalizační dráhy apoptózy, jejíž schématický popis je zobrazen na obr. 2.



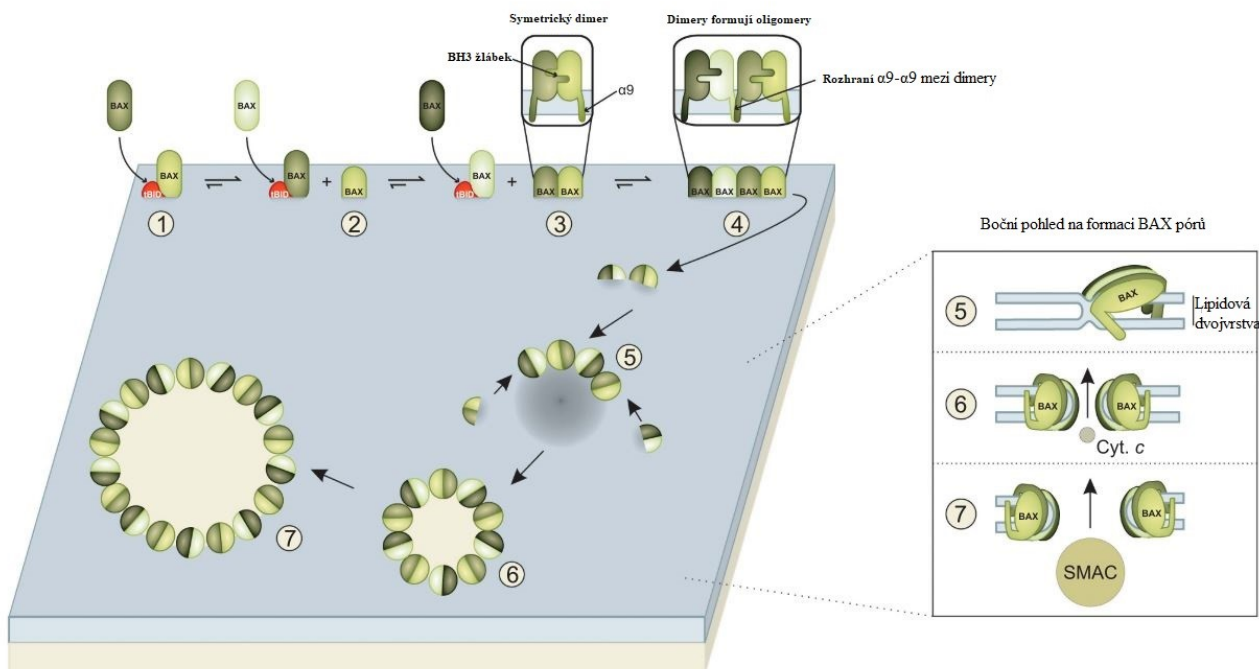
Obrázek 2 – Schématické zobrazení apoptotické signalizace. Vnitřní apoptotická signalizace začíná rozmanitými stresovými signály (poškození DNA, hypoxie, nedostatek růstových faktorů, UV záření a další), které prostřednictvím BH3 proteinů jako např. Puma, Noxa, Bim a Bad inhibují anti-apoptotické proteiny (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1 a další). Anti-apoptotické proteiny tak převážně přestanou inhibovat pro-apoptotické proteiny Bax a Bak, které následně oligomerují ve vnější mitochondriální membráně a způsobují její permeabilizaci (MOMP). MOMP vede k uvolnění cytochromu c a Smac/DIABLO. Cytochrom c společně s Apaf-1 a pro-kaspázou 9 umožní vytváření apoptosomu, multiproteinového komplexu aktivujícímu kaspázu 9. Kaspázu 9 inhibují inhibitory apoptózy IAPs, které ale inhibují Smac/DIABLO. Aktivovaná kaspáza 9 následně aktivuje kaspázu 3. Kaspáza 3 aktivuje řadu procesů, které vyústí v apoptotickou smrt buňky. Apoptóza se dá aktivovat i takzvanou vnější signalizací např. navázáním některých ligandů z TNF rodiny (jako např. FasL či TRAIL) na relevantní receptory, což vede k aktivaci kaspázy 8 a následně kaspázy 3. Aktivovaná kaspáza 8 také štěpí protein Bid v jeho zkrácenou pro-apoptotickou verzi tBid. V rámci poškození DNA aktivuje faktor p53 nepřímou apoptózu aktivací transkripce proteinů pro-apoptotických proteinů Bax, Noxa a Puma. Převzato a upraveno z (*Kang & Reynolds 2009).

Pro molekulárně-funkční interakce Bcl-2 proteinů je esenciální specifická struktura – žlábek tvořený helikálními svazky, který umožňuje interakci s BH3 doménami (Obr. 3).



Obrázek 3 – 3D zobrazení struktur lidského proteinu Bcl-XL (PDB 1R2D). A – postupně označené homologické motivy BH1-4 (oranžová, zelená, modrá, červená). B – zobrazení proteinu Bcl-XL (PDB 1R2D) s fialovým zvýrazněním specifického vazebného žlábků. Převzato z (*Banjara *et al.* 2020).

Homo- či heterotypické interakce s tímto žlábkem pak hrají esenciální roli v apoptotické signalizaci aktivované/modulované proteiny z Bcl-2 rodiny. BH3 motivy, zprostředkující tyto interakce, jsou, obdobně jako proteiny samé, evolučně konzervované již od bezobratlých živočichů (např. háďátka *C. elegans*) a jsou tedy zcela zásadní pro funkci proteinů z rodiny Bcl-2 (*Banjara *et al.* 2020). Z BH3 proteinů zejména proteiny Bim a tBid hrají významnou roli jak v blokování majoritních anti-apoptotických Bcl-2 proteinů, tak i v přímém ovlivnění pro-apoptotických proteinů Bax a Bak. Tyto proteiny po uvolnění z interakce s anti-apoptotickými proteiny mění svoji transmembránovou strukturu a svojí multimerizací vytvářejí ve vnější mitochondriální membráně kanály o průměru 100-200 nm, a tím umožňují průchod proteinů jako cytochrom c či Smac/DIABLO (Obr.4) (*Kale *et al.* 2018).



Obrázek 4 – Schématické zobrazení oligomerace Bax ve vnější membráně mitochondrií. 1. Bax nejdříve interaguje se zkráceným proteinem Bid (tBid) přímo ve vnější membráně mitochondrií. 2. Postupně se do membrány inkorporují další proteiny Bax, které prochází několika konformacemi, během čehož se C koncový transmembránový helix $\alpha 9$ vsune do membrány a překlene ji. 3. Bax zformuje homodimery skrze interakce mezi jejich BH3 doménami, přičemž nejistým způsobem nejdříve zaniknou heterodimery Bax/tBid, pravděpodobně z důvodu větší afinity Bax monomerů k sobě. 4. Bax dimery oligomerují, což je podpořeno mnohými interakcemi, především pak interakcemi jejich transmembránových $\alpha 9$ helixů. 5. Na konce oligomerů se přidávají další dimery a tento komplex postupně destabilizuje lipidovou dvojvrstvu. 6. Oligomery postupně formují nejdříve malé póry, jimiž mohou procházet cytochromy c (12 kDa). 7. Vyšší koncentrace dimerů v membráně vede ke zvětšování pórů, což dovoluje průchod i větším proteinům SMAC (dimer 54 kDa). Uvedené schématické zobrazení aktivace proteinu Bax se pak zřejmě příliš neliší od aktivace proteinu Bak. Přeloženo a převzato z (*Kale *et al.* 2018).

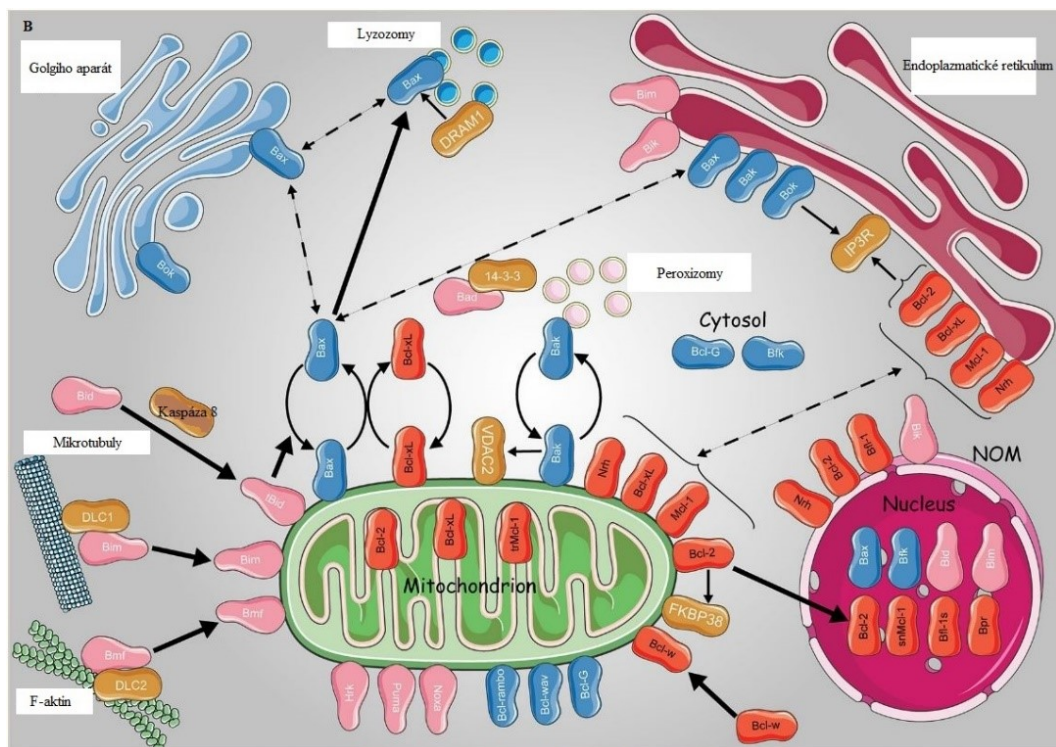
3.2 Buněčná lokalizace/funkce proteinů z Bcl-2 rodiny

Proteiny z Bcl-2 rodiny interagují nejen s mitochondriemi, kde aktivují a regulují mitochondriální apoptotickou signalizaci (viz výš), ale lokalizují do mnohých dalších buněčných kompartmentů (Obr. 5A,5B). Jejich role v různých buněčných kompartmentech je zatím méně prozkoumaná než jejich způsob fungování v mitochondriích. Z dostupných výsledků je však již zřejmé, že například v endoplasmatickém retikulu (ER) participují na regulaci distribuce buněčného vápníku (*Vervliet *et al.* 2017). Vedle lokalizace v ER (zejména multidoménové pro- a anti-apoptické proteiny) jsou proteiny Bcl-2 rodiny lokalizovatelné i na vnitřní mitochondriální membráně, jaderné membráně či přímo v buněčném jádře, Golgiho aparátu a cytoplasmě. Jejich delokalizace v cytoplasmě dost často souvisí s blokováním jejich role v mitochondriích (např. Bad, Bax či Bcl-X_L) (*Popgeorgiev *et al.* 2018).

A	Domény					Jméno genu	Jméno proteinu	Subcelulární lokalizace						
	BH4	BH3	BH1	BH2	TM			M	C	ER	NOM	N	G	P
Anti-apoptické	●	●	●	●	●	<i>BCL2</i>	Bcl-2	●	●	●	●			
	●	●	●	●	●	<i>BCL2L1</i>	Bcl-xL	●	●	●				
	●	●	●	●	●	<i>MCL1</i>	Mcl-1	●	●		●			
	●	●	●	●	●	<i>BCL2L2</i>	Bcl-w	●	●					
	●	●	●	●		<i>BCL2A1</i>	Bfl-1, Bcl-2a1	●	●		●	●		
	●	●	●	●		<i>BCL2L10</i>	Nrh, Bcl-B	●	●		●			
				●		<i>BCL2L12</i>	Bpr					●		
Pro-apoptické	●	●	●	●	●	<i>BAX</i>	Bax	●	●	●		●		
	●	●	●	●	●	<i>BAK1</i>	Bak	●	●	●				●
	●	●	●	●	●	<i>BOK</i>	Bok, Mtd	●	●		●	●		
	●	●	●	●	●	<i>BCL2L16</i>	Bcl-wav	●						
		●		●		<i>BCL2L15</i>	Bfk		●			●		
		●	●	●		<i>BCL2L14</i>	Bcl-G	●	●					
	●	●	●	●		<i>BCL2L13</i>	Bcl-rambo, Mil1	●						
Proteiny obsahující pouze doménu BH3		●				<i>BCL2L11</i>	Bim, Bod	●	●	●		●		
		●				<i>BID</i>	Bid	●	●			●		
		●				<i>BAD</i>	Bad	●	●					
		●				<i>BMF</i>	Bmf	●	●					
		●				<i>BBC3</i>	Puma	●						
		●				<i>PMAIP1</i>	Noxa	●						
		●				<i>BIK</i>	Bik, Nbk			●	●			
		●				<i>HRK</i>	Hrk	●	●					

Obrázek 5A – Vnitrobuněčná lokalizace proteinů z Bcl-2 rodiny. Bcl-2 proteiny jsou rozděleny podle jejich funkce v apoptotické signalizaci, podle druhu Bcl-2 homologických domén (BH1-4) a přítomnosti transmembránové domény (TM). Vnitrobuněčná lokalizace je značena černými tečkami v jednotlivých místech: mitochondrie (M), cytosol (C), endoplazmatické retikulum (ER), vnější jaderná membrána (NOM), Jádro (N), Golgiho aparát (G) a peroxizomy (P). Převzato z (*Popgeorgiev *et al.* 2018).

Proteiny z rodiny Bcl-2 pak evidentně interagují i v mnohých regulačních kaskádách. Bad protein tak například po fosforylaci interaguje s konzervovanými regulačními proteiny z rodiny 14-3-3, čímž značně přispívá k proliferaci nádorového bujení a k přežívání nádorových buněk (Mann *et al.* 2019). Podobně protein Bad, v rámci mechanismu aktivace komplexu I dýchacího řetězce a regulace spotřeby kyslíku, stimuluje oxidativní metabolismus sacharidů, mastných kyselin a aminokyselin (Mann *et al.* 2019). Je zde však nutné dodat, že u této a řady dalších interakcí se předpokládá více spojení s funkční regulací apoptotické kaskády a s rezistencí nádorových buněk ke smrti než s jinými ději mimo apoptotické a nádorové situace buněk, např. každodenní regulace metabolismu zdravých buněk (*Popgeorgiev *et al.* 2018).



Obrázek 5B – Schéma vnitro-buněčné lokalizace a dynamiky Bcl-2 proteinů. Na obrázku můžeme vidět dynamiku mezi anti-apoptotickými více-doménovými Bcl-2 proteiny (oranžová), pro-apoptotickými více-doménovými Bcl-2 proteiny (modrá), proteiny Bcl-2 pouze s BH3 doménou (růžová) a proteiny mimo Bcl-2 rodinu (žlutá). Tlusté šipky představují stresové translokace, tenké šipky translokace za fyziologického stavu a přerušované šipky představují domnělé translokace. trMcl-1 – zkrácený protein Mcl-1, snMcl-1 – zkrácená jaderná verze proteinu Mcl-1, Bfl-1s – zkrácená isoforma Bfl-1. Převzato a přeloženo z (*Popgeorgiev *et al.* 2018). Některé elementy obrázku autoři vytvořili pomocí Servier Medical art image bank (www.servier.com).

3.3 Protein Bcl-2 a jeho intracelulární lokalizace, interakce a vztah k metabolismu

26 kDa Bcl-2 protein je zejména lokalizován v mitochondriích, ale vyskytuje se i v jiných buněčných kompartmentech, především pak v ER a buněčném jádře (Obr. 5A,5B) (Krajewski *et al.* 1993; Gotow *et al.* 2000; Kaufmann *et al.* 2003). Původní lokalizační studie identifikovala Bcl-2 jako protein vnitřní membrány mitochondrií (Hockenbery *et al.* 1990), ale následné analýzy tyto výsledky zpochybnily. Například Nakai a kolegové (1993) se pokusili kontroverzi vyřešit a pomocí *in vitro* experimentu s izolovanými mitochondriemi jater potkaního modelu uvedli, že se Bcl-2 protein integruje pouze do vnější membrány a do vnitřní dále neprostupuje. Nicméně další studie naznačila, že Bcl-2 také může asociovat s vnitřní membránou mitochondrií a kolokalizuje v ní s β podjednotkou F_1F_0 ATPázy (Gotow *et al.* 2000).

První studie, zabývající se vztahem Bcl-2 proteinu a jeho vlivu na mitochondriální metabolismus, byly publikovány krátce po uvedených lokalizačních studiích. V roce 2003 Manfredi a kolegové zjistili, že nadprodukce proteinu Bcl-2 znatelně zvýšila oxidativní fosforylaci a výměnu adenin nukleotidů mezi mitochondriemi a cytolem v buňkách s mutovanou mitochondriální DNA (a tedy s poškozeným dýchacím řetězcem) z důvodu snížené aktivity elektron transportního řetězce (mutace C3256T a T8356C). Pozitivní role Bcl-2

by v tomto případě mohla spočívat buď ve stabilizaci komplexů dýchacího řetězce (např. cytochromu c), což by mělo za následek větší efektivitu přenosu elektronů a tedy i oxidativní fosforylace, anebo by za lepší oxidativní fosforylací mohl být i zvýšený flux ATP do mitochondrií, který by při hydrolýze ATP na ADP na F_1F_0 ATPáze mohl stimulovat snížený membránový potenciál mutantních buněk přesunem H^+ iontů do mezimembránového prostoru a stabilizovat tak dýchací řetězec (Manfredi *et al.* 2003).

Chen a Pervaiz (2007) v této návaznosti poukázali na Bcl-2 protein jakožto na regulační protein komplexu IV dýchacího řetězce cytochrom c oxidázy (COX). Indukovaná vyšší exprese Bcl-2 proteinu dle autorů vedla ke zvýšení mitochondriální respirace a vyšší aktivitě COX. Autoři dále na základě experimentů s antimycinem A, vyvolávajícím oxidativní stres (inhibitor komplexu III), navrhli model, v jehož rámci Bcl-2 funguje jako regulátor mitochondriálního metabolismu nádorových buněk, který za normálního stavu přispívá k lehce pro-oxidačnímu stavu nádorových buněk, ale zároveň dokáže ve stresové situaci nebezpečné nadprodukce ROS regulovat skrze COX mitochondriální respiraci a dosáhnout tak ekvilibria mezi produkcí energie a pro buňku nebezpečných forem kyslíku (Chen & Pervaiz 2007). Chen a Pervaiz (2010) v navazujícím výzkumu odhalili přímou interakci mezi COX podjednotkou Va a proteinem Bcl-2 skrze jeho BH2 doménu a C-terminální oblast. Bcl-2, díky této fyzické interakci, nepřímo zvyšuje transport COX Va (společně s druhou podjednotkou COX Vb) z jádra do mitochondrií a při stresových podmínkách tuto podjednotku zároveň stabilizuje. V úvahu je tedy třeba vzít možnost, že efekt, který Bcl-2 má na regulaci mitochondriální respirace skrze regulaci COX aktivity, je především jeho pravděpodobná chaperonová funkce k podjednotce COX Va a zvýšení jejího transportu do mitochondrií (Chen & Pervaiz 2010).

Zvýšený tok ATP do mitochondrií, popsáný v práci Manfrediho a kolegů (2003), je asociován s ATP/ADP antiporterem ANT, se kterým Bcl-2 fyzicky interaguje ve vnitřní membráně mitochondrií, zvyšuje jeho aktivitu a translokaci ATP/ADP (Belzacq *et al.* 2003). Přesně opačný efekt má zřejmě v apoptotických podmínkách protein BAX (Belzacq *et al.* 2003).

Pro-oxidační efekt Bcl-2 proteinu na mitochondrie by mohl být spojen i s jeho interakcí s GTPázou Rac1, která moduluje aktivitu ROS-produkujícího komplexu NADPH oxidázy. Bcl-2 přímo interaguje s Rac1, zřejmě skrze BH3 doménu. BH3 mimetika blokují jak tuto interakci, tak i zvýšenou produkci ROS (Velaithan *et al.* 2011).

Bcl-2 nicméně může mít v mitochondriích i anti-oxidační roli a přímou integrací s antioxidantem glutathionem může modulovat jeho hladinu v mitochondriích. Vazbu mezi glutathionem a Bcl-2 zároveň inhibují BH3 mimetika či BH3 protein BimL, což minimálně u

BH3 mimetik vyvolává oxidativní stres, který mimo jiné vede k oxidaci ANT, degradaci OPA1 GTPázy a fragmentaci mitochondrií v neuronech (Zimmermann *et al.* 2007). Dalším výzkumem bylo zjištěno, že Bcl-2 může interagovat i s transportérem glutathionu ve vnitřní mitochondriální membráně - 2-oxoglutarátovým přenašečem. Bcl-2 tak dle autorů hraje centrální anti-oxidační roli, ve které pomocí přímé vazby na glutathion a interakcí s 2-oxoglutarátovým přenašečem společně regulují transport a samotnou hladinu glutathionu v mitochondriích, což ve výsledku chrání mitochondrie před oxidativním stresem (Wilkins *et al.* 2012). Bcl-2 také může modulací aktivity superoxid dismutázy regulovat hladinu ROS v β buňkách pankreatu, což může hrát roli v přežití β buněk při vysokých požadavcích na metabolismus (Aharoni-Simon *et al.* 2016).

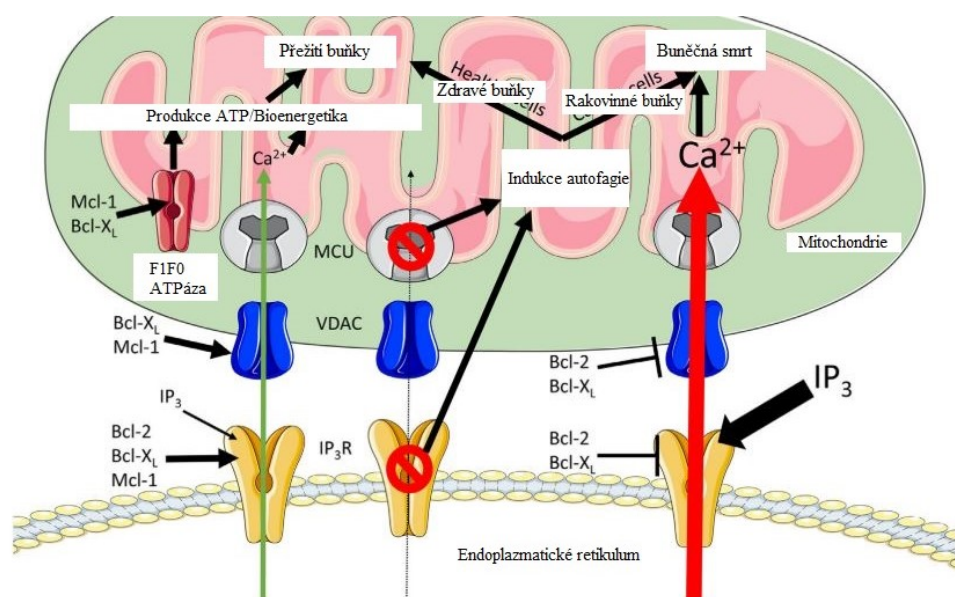
Imahashi a kol. (2004) studovali souvislost mezi proteinem Bcl-2 a ischemií srdce. Zjistili, že Bcl-2 zřejmě napomáhá ochraně srdce modulací metabolismu – snížením spotřeby ATP mitochondriemi a snížením vnitrobuněčného okyselení závislejícím na F_1F_0 -ATPáze. Přičemž snížení spotřeby ATP mitochondriemi může být zapříčiněno inhibicí F_1F_0 -ATPázy, uzavíráním VDAC, či regulací ANT translokázy (Imahashi *et al.* 2004), se kterou Bcl-2 fyzicky interaguje (Belzacq *et al.* 2003). Nižší spotřeba ATP vede k nižšímu využití glykolytického ATP F_1F_0 -ATPázou, které F_1F_0 -ATPáza využívá během ischemie (anaerobní podmínky zvyhodňují glykolýzu) ke stabilizaci životně důležitého membránového potenciálu. Nižším využitím anaerobní glykolýzy laktát dehydrogenáza produkuje méně laktátu z pyruvátu, čímž se snižuje okyselení cytosolu. Více ATP během ischemie také znamená méně dalších iontových změn a nižší aktivaci degradativních enzymů (Imahashi *et al.* 2004).

Expres Bcl-2 je zvýšena v leukemických kmenových buňkách, vyznačujících se nižší hladinou ROS a vyšším příspěvkem oxidativní fosforylace k produkci ATP. Inhibice Bcl-2 (především pomocí ABT-263 a ABT-737) vedla mimo jiné k výraznému snížení oxidativní fosforylace, umožňující efektivnější eradikaci i nedělících se leukemických kmenových buněk (Lagadinou *et al.* 2013). Obdobně potlačení exprese Bcl-2 u karcinomu jazyka vedlo ke snížení mitochondriálního membránového potenciálu, snížení hladiny ATP, zvýšení hladiny ROS a následnému snížení proliferace a stimulace apoptózy (Xiong *et al.* 2016).

Přestože je protein Bcl-2 protein a jeho zvýšená exprese v rakovinných buňkách často spojována s rezistencí vůči apoptóze a chemoterapii, některé studie přisuzují proteinu Bcl-2 i proti-nádorovou funkci. Bcl-2 je schopný zpomalit buněčný cyklus pomocí snížení hladiny ROS a ATP, což propojuje regulaci buněčného cyklu a protein Bcl-2 s metabolickými procesy. Snížení ROS a ATP tedy v závislosti na proteinu Bcl-2 zpomalilo přestup z G0/G1 fáze do

S fáze buněčného cyklu, což dle autorů otevírá nové možnosti na poli terapie nádorových onemocnění, zvláště pak pro rakovinné buňky s vysokou expresí proteinu Bcl-2 (Du *et al.* 2017).

Vedle s mitochondriemi spojenými modulacemi apoptózy a buněčného metabolismu je Bcl-2 protein lokalizován v membráně ER, kde má vliv na regulaci hladin vápníku v ER a cytoplasmě. Bcl-2 interaguje s receptory inositol 1,4,5-trifosfátů, které zodpovídají za uvolňování Ca^{2+} iontů z endoplazmatického retikula a inhibuje jejich aktivaci inositol 1,4,5-trifosfáty, a tím výrazně přispívá k regulaci Ca^{2+} signalizace. Zároveň je tato regulace spojována především s funkcí proteinu Bcl-2 během procesu apoptózy, neboť nárůst koncentrace cytoplazmatického a mitochondriálního vápníku přispívá k aktivaci apoptózy (Chen *et al.* 2004). Další výzkum vedl k širšímu porozumění role Bcl-2 proteinů v rámci Ca^{2+} signalizace, která funguje na rozhraní ER a mitochondrií, přičemž ER skrze jednotlivé kanály poskytuje mitochondriím Ca^{2+} , které jsou životně důležité pro mitochondriální energetickým metabolismus, produkci ATP a apoptotickou signalizaci. Proteiny z rodiny Bcl-2 pak export Ca^{2+} z endoplazmatického retikula do mitochondrií dokáží regulovat téměř na každém stupni transportního procesu (Obr.6)(*Vervliet *et al.* 2017).



Obrázek 6 – Schéma signalizace a transportu Ca^{2+} z endoplazmatického retikula (ER) do mitochondrií a jeho regulace proteiny z rodiny Bcl-2 v rámci metabolismu a buněčné smrti. Zelená šipka zobrazuje stálý přísun Ca^{2+} nutný pro reakce Krebsova cyklu a přežití buněk, které proteiny z rodiny Bcl-2 regulují při výstupu z ER pomocí inositol 1,4,5-trifosfátového receptoru (IP_3R), při vstupu do mitochondrií zvýšením propustnosti aniontového kanálu závislého na napětí 1 (VDAC1). Mcl-1 i Bcl-X_L dokáží pak regulovat syntézu ATP přímo na F₁F₀ ATPáze. Na druhou stranu červená šipka znázorňuje nadbytečný transport Ca^{2+} do mitochondrií, který vede k permeabilizaci vnější mitochondriální membrány a buněčné smrti. Anti-apoptotické proteiny Bcl-2 a Bcl-X_L mohou tento transport inhibovat jak na úrovni IP_3R , tak na úrovni VDAC. Na schématu je znázorněná i možná blokáce Ca^{2+} transportu inhibicí IP_3R či vyražením mitochondriálního Ca^{2+} uniportu, která vede k indukci autofágie, jež může buňku zachránit v případě nižší proliferace u zdravých buněk, nebo vést k buněčné smrti více proliferujících rakovinných buněk. IP_3 – inositol 1,4,5-trifosfát. Přeloženo a převzato z (*Vervliet *et al.* 2017).

3.4 Protein Bcl-X_L a jeho intracelulární lokalizace, interakce a vztah k metabolismu

Bcl-X_L je přibližně 30 kDa velký protein, který se převážně nachází v cytosolu či v asociaci s vnější membránou mitochondrií, neboť má na svém konci specifickou mitochondriální zaměřovací sekvenci v podobě nejméně dvou zásaditých aminokyselinových zbytků po obou stranách C-koncové transmembránové domény (TM)(Kaufmann *et al.* 2003). Protein Bcl-X_L je možné experimentálně směřovat i do jiných buněčných kompartmentů výměnou této sekvence za C-koncovou sekvenci proteinu Bcl-2, který poměrně nespecificky směřuje do různých buněčných kompartmentů, a zajímavé je, že přitom neztrácí svůj anti-apoptotický efekt (Kaufmann *et al.* 2003).

Jedna z prvních informací spojujících Bcl-X_L protein s mitochondriálním metabolismem poukázala na vliv Bcl-X_L exprese na potenciál vnitřní membrány mitochondrií. Bcl-X_L sice snižuje membránový potenciál v přítomnosti nedostatku růstových faktorů či působením starosporinu (stimulace apoptózy), ale dokáže udržet oxidativní fosforylaci na stejné úrovni. Toho by Bcl-X_L mohl dosáhnout zvýšením efektivity oxidativní fosforylace pomocí regulace F₁F₀ ATPázy, vlastní porinovou funkcí, či vlivem na kanály VDAC, ANT a chránit tak buňky s aktivovanou apoptotickou signalizací před smrtí. Bcl-X_L také chrání buňky před buněčnou smrtí v reakci na inhibici dýchacího řetězce (inhibitory antimycin A a oligomycin) (Vander Heiden *et al.* 1997). V následující studii se autoři zabývali ochranou funkce Bcl-X_L při nedostatku růstových faktorů způsobující nedostatečný transport ATP/ADP přes mitochondriální membrány, což vede postupně k hyperpolarizaci vnitřní mitochondriální membrány (v závislosti na zastavení F₁F₀ ATPázy v důsledku nedostatku ADP), zvětšení objemu mitochondriální matrix, ztrátě integrity vnější mitochondriální membrány, uvolnění cytochromu c a k apoptóze. Bcl-X_L zvyšuje ATP/ADP transport přes VDAC/ANT komplex, a tím udržuje v chodu F₁F₀ ATPázu využívající membránový potenciál ke tvorbě ATP z ADP i při nedostatku růstových faktorů (Vander Heiden *et al.* 1999). Bcl-X_L se dokáže přímo vázat na VDAC a stimuluje jeho uzavírání. Oproti tomu Bax a Bak naopak stimuluji otevřenou konformaci VDAC (Shimizu *et al.* 1999). Za podmínek stimulujících zavření VDAC (např. β-NADH stimulace, apoptotická signalizace) dokáže Bcl-X_L naopak chránit buňky a transport metabolitů (především transport ATP/ADP) do mitochondrií udržováním otevřené konformace VDAC (Vander Heiden *et al.* 2001). Ve výše zmíněné studii autoři krom studia Bcl-2 proteinu zároveň prokázali i podobný vliv u proteinu Bcl-X_L na zvýšený transport ATP do mitochondrií, tedy, že exprese Bcl-X_L, podobně jako Bcl-2, zvyšuje ATP/ADP transport do mitochondrií s mutovanou mitochondriální DNA a defektním dýchacím řetězcem (mutace C3256T a

T8356C), a tím moduluje poškozenou oxidativní fosforylaci v těchto buňkách (Manfredi *et al.* 2003).

S regulací ATP transportu do mitochondrií zřejmě souvisí i role Bcl-X_L proteinu během synaptické stimulace u olihní. Zvýšení exprese Bcl-X_L (podobně jako aplikace ATP) dokáže posílit synaptický přenos a přispět ke zotavení z následků synaptické deprese nezávisle na hladinách vápníku, a to zřejmě z důvodu vyššího transportu ATP přes vnější mitochondriální membránu (Jonas *et al.* 2003). Tento a další výzkum iniciovaly celou sérii dalších studií vztahu Bcl-X_L a neuronální fyziologie, které pomohly odkrýt přímá spojení mezi proteinem Bcl-X_L a mitochondriálním metabolismem.

Především se pak odkryla přímá vazba Bcl-X_L proteinu na beta podjednotku F₁F₀ ATPázy, díky které Bcl-X_L zvyšuje efektivitu dýchacího řetězce snížením úniku H⁺ protonů skrz F₁F₀ ATPázu, čímž Bcl-X_L zvyšuje její aktivitu, a dokonce, během neurální stimulace, podporuje i produkci ATP (Alavian *et al.* 2011). Tato zjištění podpořila i další studie, ve které se ukázalo, že Bcl-X_L stabilizuje potenciál vnitřní membrány mitochondrií a zabraňuje úniku protonů. Jeho eliminace naopak vede k výrazným fluktuacím membránového potenciálu a snížené energetické schopnosti neuronů ve stresových podmínkách, což může být pro neurony nakonec smrtelné v důsledku depolarizace vnitřní mitochondriální membrány. Přičemž tato schopnost Bcl-X_L je opět spojována s F₁F₀ ATPázou (Chen *et al.* 2011).

Právě na interakci mezi Bcl-X_L a F₁F₀ ATPázou zaměřila pozdější studie, ve které autoři dokázali vysledovat sérii reakcí na excitotoxický stimulus u potkaních kortikálních neuronů, v nichž tento stimulus způsobil akumulaci cyklinu B1 a jeho následného komplexu s cyklin-dependentní kinázou 1 (CDK1). Tento komplex fosforyluje Ser62 Bcl-X_L a fosforylovaný Bcl-X_L zamezuje spojení s beta podjednotkou F₁F₀ ATPázy. F₁F₀ ATPáza se tím zřejmě inhibuje, což vede ke zvýšení mitochondriálního ROS a ke s ním spojenému poškození komplexu I dýchacího řetězce a ve výsledku způsobuje depolarizaci vnitřní mitochondriální membrány a nakonec i apoptózu neuronů (Veas-Pérez de Tudela *et al.* 2015).

Spojení proteinu Bcl-X_L a metabolismu je pak často přímo spojované s jeho anti-apoptotickou funkcí. Bcl-X_L dokáže například ovlivňovat hladinu acetyl-koenzymu A a s ní spojenou N-alfa-acetylaci proteinových konců. Zřejmě pak především hladinu acetyl-koenzymu A snižuje, následkem čehož autoři studie identifikovali na nadprodukcí Bcl-X_L závislou hypoacetylaci N konců buněčných proteinů, což zřejmě napomáhalo i rezistenci buněk k apoptóze (Yi *et al.* 2011).

Nakonec je zajímavé zmínit i spojení Bcl-X_L a endocytózy váčků hipokampálních neuronů. Bcl-X_L (v závislosti na kalmodulinu) přímo interaguje s GTPázou Drp 1, mitochondriálním štěpným faktorem Mff a klathrinem, a zvyšuje tím endocytózu v neuronech během synaptické aktivity (Li *et al.* 2013).

3.5 Protein Mcl-1 a jeho intracelulární lokalizace, interakce a vztah k metabolismu

Mcl-1 je přibližně 40 kDa velký protein s podobnou intracelulární lokalizací jako u proteinu Bcl-2. Asociuje především s vnější membránou mitochondrií, poté i s endoplazmatickým retikulem, ale například na rozdíl od Bcl-2 se zřejmě nevyskytuje v jaderné membráně (Obr. 3A, 3B) (Yang *et al.* 1995).

Jedna ze zásadních studií spojujících protein Mcl-1 s mitochondriálním metabolismem byla publikována už v roce 2012 a Perciavalle a kolegové (2012) v ní zpracovali rozdílnou lokalizaci a působení izoform Mcl-1 na mitochondrie. Delší izoformy Mcl-1 (40 kDa, 38 kDa) zůstávají u vnější mitochondriální membrány a plní klasickou anti-apoptickou funkci. Kratší izoforma (36 kDa) se pak vytvoří proteolytickým zkrácením na N konci během transportu do matrix mitochondrií přes transportéry TOM a TIM, kde se ukotví na vnitřní mitochondriální membráně a směřuje do matrix. Krátká izoforma sice ztrácí svoji anti-apoptickou funkci, ale na novém místě udržuje strukturu vnitřní mitochondriální membrány a normální chod oxidativní fosforylace, ovlivňuje mitochondriální fúzi a je nezbytná pro správné skládání superkomplexů dýchacího řetězce I, III, IV a F₁F₀ ATPázy (Perciavalle *et al.* 2012).

Ztráta Mcl-1 v myokardu pak podobně vedla k výrazným změnám struktury mitochondrií, které se zdály neuspořádané s fragmentovanou až degradovanou strukturou krist. Změny struktury zároveň provázela i snížená úroveň respirace. Eliminace proteinů Bax, Bak i Mcl-1 sice ochránila myokard před fatální kardiomyopatií, nicméně defekty mitochondriální funkce na úrovni buněk zůstaly stejné (Wang *et al.* 2013).

Změny v mitochondriální struktuře byly později dále dokumentovány a ve výsledku spojeny s GTPázami Drp1 (zásadní faktor pro dělení mitochondrií) a OPA1 (podobně důležitý faktor mitochondriální fúze), se kterými protein Mcl-1 asociuje skrze BH3 vazebnou doménu, přičemž ovlivňuje aktivitu Drp 1 a stabilitu OPA1 (Rasmussen *et al.* 2018). Roli v dynamické struktuře mitochondrií zřejmě hraje i poměr mezi delší izoformou Mcl-1, vázající se k vnější mitochondriální membráně a zkrácenou izoformou v mitochondriálním matrixu, přičemž tento poměr také dokáže ovlivnit mitochondriální hladiny Ca²⁺ skrze hyperpolarizaci vnitřní mitochondriální membrány (Morciano *et al.* 2016). Nejnovější inhibiční studie (inhibitor Mcl-

1 S63845) potvrdila vliv Mcl-1 na strukturu mitochondrií a nově i na cytoskeletální strukturu. Z inhibice Mcl-1 tak vzešly kratší, globulární mitochondrie s výrazně sníženou mitochondriální respirací a cytoskelet kardiomyocytů (hiPSC-CM – kardiomyocyty odvozené od lidských indukovaných kmenových buněk) s nižší hustotou F-aktinu, vyšší příměsí stresových vláken a obecně nižší organizací myofibril (Rasmussen *et al.* 2020).

Autoři navazujících studií pak spojili Mcl-1 s metabolickými ději mimo dýchací řetězec. Inhibicí Mcl-1 v buňkách akutní myeloidní leukémie dokázali obecně snížit buněčný metabolismus na úrovni Krebsova cyklu, glykolýzy a pentózofosfátového cyklu (Carter *et al.* 2020). Dále pak byla objevena i přímá interakce a regulace acyl-koenzym A dehydrogenázy (VLCAD) skrze α helix BH3 domény matrixové izoformy Mcl-1. Regulací aktivity VLCAD může Mcl-1 specificky ovlivňovat β oxidaci dlouho-řetězcových mastných kyselin (Escudero *et al.* 2018).

4 Metodika a materiály

4.1 Základní buněčné linie a jejich kultivace

Z lidských nádorových buněčných linií jsme pro studium možné role anti-apoptotických Bcl-2 proteinů vybrali tři nádorové linie původem z fyziologicky odlišných tkání: dvě přisedle rostoucí nádorové linie – lidský kolorektální karcinom HCT-116, lidský glioblastom U87-MG a jednu hematopoietickou v suspenzi rostoucí linii B buněčný lymfom HBL-2.

Dále jsme v této práci využívali i námi připravené buněčné linie s genetickou delecí proteinů Bax a Bak: HCT116 BAX⁻/BAK⁻, U87-MG BAX⁻/BAK⁻ (U87-MG BB^{-/-}) a HBL-2 BAX⁻/BAK⁻, které byly připravené stejně jako linie připravené v této práci (viz Příprava plazmidového konstrukt, Lipofekce a Elektroporace) (nepublikovaná data).

Buněčné linie HCT116 a U87-MG jsme kultivovali v médiu DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose*, Sigma-Aldrich) s aditivou 10% fetálního hovězího séra (FBS, Sigma-Aldrich), antibiotik (Streptomycin + Penicilin G, 100 x zásobní roztok obsahuje 10g Penicilinu G + 5 g Streptomycinu na 1L - PenStrep) a neesenciálních aminokyselin (100 x zásobní roztok ThermoFisher Scientific kat. číslo 11140050). Linie HBL-2 byla pak kultivována v médiu IMDM+ (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*, Sigma-Aldrich) s 15% FBS a antibiotiky (viz výše).

Buňky byly kultivovány v humidifikovaném CO₂ inkubátoru s 20% O₂, 5% CO₂ a při teplotě 37°C a v kultuře udržovány každé 2-3 dny pravidelným dělením. U buněk rostoucích v suspenzi

(HBL-2) se jednalo o odebrání části buněčné suspenze a doplnění buněčného média (IMDM+) – obvyklý objemový poměr ponechaných buněk k médiu 1:4 až 1:6. V případě buněk rostoucí přisedle (U87-MG, HCT-116) je nejprve zapotřebí úplně odebrat kultivační médium, opláchnout buňky pufrům 1X PBS (*Phosphate-Buffered Saline*, Sigma Aldrich) a poté je enzymaticky (trypsin/EDTA roztok obsahující 0,05% trypsin a 0,02% EDTA) oddělit od povrchu. K uvolněným buňkám se poté přidá kultivační medium se sérem (DMEM + 10% FBS – FBS obsahuje inhibitor trypsinu α 1-antitrypsin – v poměru 10:1 (FBS:Trypsin/EDTA) pro inhibici trypsinu a buňky se resuspendují pipetováním. Část buněk se odebere a ke zbytku se doplní medium, opět obvyklý objemový poměr ponechaných buněk k médiu 1:4 až 1:6.

4.2 Příprava CRISPR vektoru pro eliminaci exprese vybraných genů z Bcl-2 rodiny

K přípravě buněčných linií s genetickou delecí v proteinech Bcl-2, Bcl-X_L a Mcl-1 jsme využívali metodického přístupu využívajícího nukleázu CRISPR-Cas12a, v rámci které se do cílových buněk pomocí transfekce vnese plasmid exprimující nukleázu Cas12a a specifickou „guide“ RNA (crRNA – Cas12a na rozdíl od Cas9 umožňuje inkorporaci řady více cílících RNA interagující např. s několika místy v daném genu – se třemi v námi připravených vektorech), která navede Cas12a protein na námi vybranou sekvenci ve specifickém genu (např. vybraném exonu Bcl-2 či v intronech přilehlém k exonu vybraného pro delecii) a na tomto místě pak Cas12a DNA štěpí. Nespecifický opravný proces buňky (Non-homologous end joining – NHEJ) pak s určitou pravděpodobností štěpené místo nedokonale opraví, čímž dochází k eliminaci exprese námi vybraného genu pro protein (Bax, Bak, Bcl-2, Bcl-X_L a Mcl-1) – buď non-sense posunem čtecího rámce ve vybraném exonu či eliminací tohoto exonu. Pro všechny naše vyřazovací (*knock-out*) studie jsme využívali plazmid 55 pX AsCpf1-Venus-NLS crRNA entry (Příloha 1), do kterého jsme pomocí klonování inkorporovali řady crRNA oligonukleotidů pro jednotlivé Bcl-2 geny – tedy pro proteiny Bcl-2, Bcl-X_L a Mcl-1 (sekvence oligonukleotidů dostupné v Příloze 2).

Restrikční štěpení vektoru

Expresní plazmid 55 pX AsCpf1-Venus-NLS crRNA entry je nezbytné před ligací crRNA oligonukleotidů štěpit restrikční endonukleázou BpiI, a to ve směsi: 2 μ l (3 μ g) vektoru, 5 μ l 10x FastDigest Green pufru (ThermoFisher Scientific), 38 μ l H₂O (pro PCR použití), 5 μ l BpiI (ThermoFisher Scientific). Štěpení probíhalo v thermocykleru (Eppendorf *Mastercycler* flexlid) při 37°C po 200 min, enzym byl následně inaktivován při 65°C po dobu 10 minut. Po reakci byla správnost štěpení ověřena pomocí agarózové gelové elektroforézy a štěpený

plasmid byl následně izolován pomocí preparativní agarózové elektroforézy a sady Nucleospin Gel and PCR clean-up (Macherey-Nagel).

Fosforylace oligonukleotidů, hybridizace a ligace

5' OH skupiny syntetizovaných oligonukleotidů byly před hybridizací oligonukleotidů a jejich ligace do štěpeného vektoru fosforylovány pomocí T4 polynukleotid kinázy. Reakční směs obsahovala: 1 μ l 100 μ M oligonukleotidu F, 1 μ l 100 μ M oligonukleotidu R, 1 μ l 10x T4 ligačního pufru (ThermoFisher Scientific), 6,5 H₂O (pro PCR použití) a 0,5 μ l T4 polynukleotid kinázy (ThermoFisher Scientific, 10U/ μ l). Fosforylace oligonukleotidů spojená s jejich navazující hybridizací probíhala v thermocykleru (Eppendorf *Mastercycler* flexlid) v této sekvenci: 37°C po 30 min, 95°C po 5 min a následné hybridizaci oligonukleotidů umožňující postupné snižování teploty o 5°C/min na 25°C.

Ligace oligonukleotidů s purifikovaným štěpeným vektorem byla realizována pomocí T4 DNA ligázy ve směsi: 1 μ l štěpeného vektoru (76,6 ng/ μ l), 0,5 μ l 200x ředěných hybridizovaných DNA oligonukleotidů, 1 μ l 10x T4 ligačního pufru, 1 μ l T4 ligázy (ThermoFisher Scientific, 1 U/ μ l) a 6,5 μ l H₂O (pro PCR použití). Reakce probíhala při teplotě 23°C během po dobu 1 h.

Transformace bakterií a purifikace plasmidové DNA

Ligační reakci (5 μ l) jsme poté transformovali do 50 μ l kompetentních bakterií *E. coli* TOP10. 30 min inkubace na ledu, následovaná tepelným šokem při 42°C po 60 s, další 2 min inkubace na ledu a po přidání 700 μ l LB média 30-60 min kultivace při 37°C za průběžného třepání (300 rpm, Thermomixer confort, Eppendorf). 100 μ l buněčné kultury bylo poté nanášeno na povrch agarové misky obsahující ampicilin (100 μ g/ml, LB/Amp) a miska byla inkubována přes noc při 37°C.

Po inkubaci byly pozitivní kolonie selektovány pomocí PCR reakce obsahující: Dream Taq Green PCR MM (7,9 μ l), Primer PXPR (F) + sgRNA (R)(10 μ M, 0,3 μ l) – hybridizující se sekvencemi plasmidové DNA hraničící s ligačním BpiI místem, DMSO (0,8 μ l), 10% Tween-20 (0,16 μ l), H₂O (6,6 μ l, pro PCR použití), jako kontrola byl použit neštěpený vektor (10 ng/ μ l) a místo DMSO a Tween-20 pak H₂O (pro PCR použití). Z narostlé bakteriální kolonie se sterilní špičkou odeberou buňky a ty se přenesou jak na další LB/Amp misku tak i do PCR reakce. Relevantní sekvence je pak amplifikována pomocí PCR v termocykleru (Eppendorf *Mastercycler* flexlid) a programu: 30 s 95°C, 30x 95°C (30s) 68°C (60s) 68°C 10

min, 68°C 5 min. Amplifikované sekvence DNA byly poté analyzovány pomocí agarózové elektroforézy na 2% gelu.

Kolonie, resp. bakteriální kultury obsahující klonovací vektor s oligonukleotidovým insertem jsme zaočkovali do 50 ml LB/Amp média v 500 ml Erlenmayerovy láhvi a inkubovali přes noc na třepačce (37°C, 200 rpm). Plasmidová DNA byla z *E. coli* kultur izolována pomocí sady DNA PureLink™ Expi Endotoxin-Free Maxi Plasmid Purification Kit (Invitrogen, ThermoFisher Scientific), přičemž jsme postupovali dle návodu výrobce. Koncentraci purifikované DNA jsme následně zjistili fotometricky (NanoDrop, ThermoFisher Scientific).

4.3 Lipofekce a elektroporace cílových buněk

Pro transfekci přisedlých buněčných linií U87-MG a HCT-116 expresními plazmidy 55 pX AsCpf1-Venus-NLS crRNA entry obsahujícími Bcl-2, Bcl-X_L nebo Mcl-1 crRNA pole jsme využili lipofekce transfekčním činidlem Lipofectamine™ 3000 (Life Technologies™, ThermoFisher Scientific) dle protokolu od firmy Life Technologies™.

Buněčná linie HBL-2 rostoucí v suspenzi byla výše uvedenými plazmidy transfekována elektroporací na přístroji Neon® (Invitrogen, ThermoFisher Scientific) a podle doporučení výrobce s nastavením přístroje: tři pulzy 1600 V (10 Pw).

4.4 Separace transfekovaných buněk pomocí průtokové cytometrie/sortingu

Transfekované buňky byly sklizeny 36-48 hodin po transfekci a následně byl buněčný pelet resuspendován v DMEM bez aditiv. Resuspendované vzorky byly poté separovány pomocí průtokové cytometrie (BD FACSAria™ Fusion Cell Sorter od firmy BD Biosciences) v Servisní laboratoři zobrazovacích metod (Biotechnologické a biomedicínské centrum Akademie věd ČR a Univerzity Karlovy ve Vestci – BIOCEV) na základě detekce signálu žlutého fluorescenčního proteinu Venus v transfekovaných buňkách do 96-jamkové destičky po jedné buňce na jamku. Přičemž první zhruba tři dny buňky rostou pouze v médiu (DMEM, IMDM+) se sérem a neesenciálními aminokyselinami a po třech dnech se přidá již klasické médium obsahující i antibiotika Pen-Strep. Klonální kultury jsou kultivovány po dobu zhruba tří týdnů, než se přemístí do 6-jamkové destičky a následně analyzují pomocí SDS polyakrylamidové elektroforézy (SDS-PAGE) a Western blotu - ověření eliminace exprese Bcl-2, Bcl-X_L či Mcl-1 proteinů.

4.5 SDS-PAGE a Western blot

Seznam chemikálií a materiálů (pokud neuvedeno jinak, všechny uvedené chemikálie byly pořízeny od firmy Sigma-Aldrich):

- SDS-PAGE vzorkový pufr – složení: Tris-HCl 80 mM (pH 6,8), SDS 2%, glycerol 10%, v H₂O.
- Separační pufr – složení: 200 mM glycin, 25 mM Tris Base, 0,1% w/v SDS
- WB transferový pufr – 200 mM glycin, 25 mM Tris Base, 20% metanol
- Nitrocelulózová membrána 0,2 μm (BIO-RAD)
- ATX Ponceau S red barvicí roztok (Fluka)
- 1X TBS/Tween-20 0,05% (TBS-T)
- 1:1 bromfenolová modř (0,1%) : DTT (1 M)
- Tris-HCl – zásobní roztoky o daném pH a molaritě byly připraveny rozpuštěním Tris-base a upravením pH pomocí HCl.
- Separační polyakrylamidový gel – příprava (na jeden 12% gel, aparatura a skla BIO-RAD): 2,45 ml ddH₂O, 1,9 ml 1,5 M Tris – HCl (pH 8,8), 3 ml 30% Bisakrylamid, 0,075 ml 10% SDS, 0,075 ml 10% APS, 0,01 TEMED.
- Zaostřovací polyakrylamidový gel – příprava (k jednomu 12% gelu, aparatura a skla BIO-RAD): 1,81 ml ddH₂O, 0,625 ml 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 0,37 ml 30% Bisakrylamid, 0,025 ml 10% SDS, 0,025 ml 10% APS, 0,0025 TEMED.
- Roztok 5% netučného mléka v TBS/Tween-20
- BSA – hovězí sérový albumin

Příprava vzorků na SDS-PAGE:

Buněčné pelety pro analýzu exprese Bcl-2 proteinů pomocí WB jsou lyzovány v SDS-PAGE vzorkovém pufru a následně jsou nukleové kyseliny odstraněny centrifugální filtrací skrze 200 μl pipetovací špičky s filtrem (Eppendorf ep Dualfilter T.I.P.S.[®]). Špičky s filtrem se skombinují s plastovou záchytnou zkumavkou. Vzorek se nanese na filtr špičky a zkumavky s filtrem a vzorkem se centrifugují (14 600 x g, 23°C, 5 min). Koncentrace proteinů v eluátu byly určeny pomocí BCA metody (Pierce[™] BCA Protein Assay Kit) a spektrofotometru (Infinite M200 TECAN) a vzorky proteinů byly následně naředěny na stejnou koncentraci. K naředěným vzorkům se následně přidá směs DTT/bromfenolové modři (10 μl DTT/bromfenolové modři na 100 μl eluátu) a vzorky se inkubují 5 min na 95°C, načež je možné již použít pro SDS-PAGE.

SDS-PAGE

Rozdělení proteinů na polyakrylamidovém gelu (12%) pomocí elektroforézy v přítomnosti SDS probíhalo dle klasického protokolu, ve kterém se připraví polyakrylamidové gely dle složení

uvedeným výše v seznamu chemikálií a proteiny se pod napětím (napětí 100 mV při průchodu zaostřovacím gelem, napětí 110 mV při průchodu separačním gelem) nejprve zaostří na hranici obou gelů a následně se na separačním gelu rozdělí ve vertikální elektroforetické aparatuře (Mini-PROTEAN[®] Tetra Handcast Systems a zdroj PowerPac[™] HC High-Current Power Supply od firmy BIO-RAD) ponořené do separačního pufru. SDS polyakrylamidový (SDS-PAA) gel se separovanými proteiny poté použijeme při metodě Western blot (WB).

Western blot

SDS-PAA gely z SDS-PAGE analýzy se přenesou na nitrocelulózovou membránu do blotovacího nosiče a ponoří se do WB transferového pufru v blotovací aparatuře (Mini-PROTEAN[®] Tetra Handcast Systems a zdroj PowerPac[™] HC High-Current Power Supply od firmy BIO-RAD), ve kterém jsou proteiny pod napětím (100 mV po dobu 1 h) přeneseny z SDS-PAA gelu na nitrocelulózovou membránu. Membrány s přenesenými proteiny jsou pro kontrolu účinnosti a stejnoměrnosti přenosu barveny pomocí barvičky ATX Ponceau S red. Membrány se následně promyjí v TBS/Tween-20 (TBS-T) do odstranění barvicího roztoku. Membrány se blokují v 5% netučném mléce (NFM) po dobu nejméně 1 h (nutný stálý pohyb membrán – např. rotace 50 ml Falcon zkumavek s membránami, Stuart Roter Mixer SRT6D). Následně se membrány inkubují přes noc v roztoku s primární protilátkou (ředění 1:1000 protilátky v 5% BSA v TBS-T) proti danému proteinu (opět za rotace 50 ml Falcon zkumavek s membránami):

Použité protilátky

- Primární: králičí monoklonální protilátka proti Mcl-1 (D5V5L, kat. číslo 39224), králičí monoklonální protilátky proti Bcl-XL (54H6, kat. číslo 2764), králičí monoklonální protilátka proti Bcl-2 (D55G8, kat. číslo 4223) a králičí monoklonální protilátka proti beta-aktinu konjugovaná s křenovou peroxidázou (13E5, kat. číslo 5125) byly pořízeny od firmy Cell Signaling Technology[®]
- Sekundární: kozí protilátky IgG proti králičím primárním protilátkám konjugované s křenovou peroxidázou (kat. číslo 1706515) od firmy BIO-RAD

Po inkubaci s primární protilátkou se membrány promyjí v TBS-T (3 x 10 min) a inkubují se 1 h v roztoku se sekundární protilátkou (ředění 1:3000 protilátky v 5% NFM v TBS-T) při pokojové teplotě opět za stálé rotace. Poté se membrány znovu promyjí v TBS-T (3 x 10 min) a pozitivní luminiscenční pruhy jsou vizualizovány na Azure c600 zobrazovacím systémem

(AZURE Biosystems) pomocí substrátové sady SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate od firmy ThermoFisher Scientific. Pro ověření množství proteinů v buněčných lyzátech membrány znovu promyjeme v TBS-T a dále je přes noc inkubujeme při stálé rotaci v roztoku primární protilátky proti β -aktinu s konjugovanou křenovou peroxidázou. Další den membrány promyjeme v TBS-T a vyhodnotíme/vizualizujeme opět pomocí Azure c600 (AZURE biosystems) a substrátové sady Radiance ECL (AC2204) od firmy AZURE Biosystems.

Protokol pro Western blot je také možné najít na stránkách prodejce protilátek Cell Signalling Technology®: <https://www.cellsignal.com/products/primary-antibodies/mcl-1-d5v5l-rabbit-mab/39224>

4.6 Analýza mitochondriální respirace a glykolýzy

Pro analýzu mitochondriální respirace/oxidativní fosforylace a glykolýzy jsme zejména využili buněčný analyzátor Seahorse XFe96 Analyzer od firmy Agilent Technologies. Přístroj pomocí dvou spřažených fluorometrických sensorů kvantifikuje koncentraci molekulárního O_2 a H^+ protonů ve vzdálenosti cca. 200 μm nad analyzovanými buňkami. Tyto parametry jsou reflektovány dvěma parametry mírou spotřeby kyslíku (OCR) pro buněčnou/mitochondriální respiraci (vyšší spotřeba kyslíku = vyšší oxidativní respirace) a mírou extracelulární acidifikace (ECAR) pro glykolýzu (zvýšené vylučování protonů = vyšší glykolýza). Přístroj nejdříve změří bazální hodnoty OCR a ECAR a následně může změřit reflexi v OCR a ECAR na přidání specifických inhibitorů či aktivátorů respirace či glykolýzy. V našich experimentech jsme pro měření širšího stavu oxidativní fosforylace využili chemikálie oligomycin, CCCP, směs Rotenonu a antimycinu A. Přičemž oligomycin je inhibitorem ATPázy, snižuje tak OCR a reakce na něj je určující pro respiraci spojenou s produkcí ATP. CCCP podobně jako FCCP funguje jako tzv. „*uncoupler*“, který odděluje produkci ATP od spotřeby kyslíku a jeho přidání způsobí nárůst OCR na buněčné maximum. Směs Rotenonu a antimycinu A pak inhibuje elektron-transportní řetězec a sníží OCR na minimální hodnotu. Pro měření širšího vztahu glykolýzy pak byly použity chemikálie a substráty: glukóza, oligomycin, 2-deoxyglukóza. Glukóza se používá k stimulaci glykolýzy, a tedy zvyšuje ECAR. Oligomycin inhibuje ATPázu, a tedy také stimuluje glykolýzu inhibicí produkce ATP oxidativní fosforylací. 2-deoxyglukóza naopak inhibuje glykolýzu kompetitivní inhibicí (kompetice s glukózou) hexokinázy a glukóza-6-fosfát izomerázy, a tudíž ECAR snižuje.

Příprava a provedení Seahorse analýzy OCR a ECAR proběhla dle pokynů výrobce k nahlédnutí stránek výrobce, na kterých lze nalézt protokol, příručku k přístroji a další principiální informace: <https://www.agilent.com/en/products/cell-analysis/how-seahorse-xf-analyzers-work>). Případně lze využít i protokolu od autorů protokolu pro měření OCR a ECAR (Plitzko *et al.* 2017; Plitzko & Loesgen 2018). V Tab. 1 je možné vidět náš protokol pro měření OCR a ECAR na přístroji Seahorse XFe96 Analyzer v programu Wave (verze 2.6.1) od výrobce přístroje Agilent Technologies.

Program	Bazální respirace	1. injekce	2. injekce	3. injekce
Čas	18 min (3 měření)	18 min (3 měření)	18 min (3 měření)	18 min (3 měření)
OCR	/	1 μ M oligomycin	1 μ M CCCP	0,5 μ M Rotenon/antimycin A
ECAR	/	10 mM glukóza	1 μ M oligomycin	50 mM 2-deoxyglukóza

Tabulka 1 – Protokol průběhu měření OCR a ECAR na přístroji Seahorse XFe96 Analyzer od firmy Agilent Technologies využitý v této práci. Protokol probíhá časově a každá fáze trvá přibližně 18 min a v každé fázi přístroj měří hodnoty OCR a ECAR 3krát. OCR odpovídá měření oxidativní fosforylace a ECAR odpovídá glykolýze. Jednotlivé injekce inhibitorů či stimulantů ovlivňují specificky hodnoty OCR a ECAR (viz text).

Pro normalizaci našich výsledků z analýzy OCR a ECAR na počet buněk v jamce jsme použili mikroskop ImageXpress[®] Micro a program MetaXpress (verze 6.2.3.733) od firmy Molecular Devices. Buňky byly barvené pomocí Hoechst 33342 barviva vážícího DNA i v nepermeabilizovaných buňkách. Normalizace a vizualizace výsledků pak byla zpětně provedena v programu Wave (verze 2.6.1) od firmy Agilent Technologies.

4.7 Analýza buněčné respirace O₂k respirometrem

Pro alternativní analýzu mitochondriální respirace jsme použili Oxygraph – O₂k-Respirometer (Oroboros Instruments) s elektrodou měřící koncentraci kyslíku v médiu/roztoku s buňkami dle instrukcí jeho výrobce. Výhoda měření spotřeby kyslíku pomocí oxygrafu je jeho vysoká citlivost, avšak oproti přístroji Seahorse XFe96 Analyzer (Agilent Technologies) lze pomocí Oxygrafu analyzovat simultánně pouze dva vzorky buněk v suspenzi a jednotlivé inhibitory či stimulanty mitochondriální respirace se injektují do měřících komor manuálně. Pro oxygraf analýzu jsme využili a postupně přidávali do měřících komůrek: sukcinát (20 μ l 1 M), ADP (30 μ l 3 mM), oligomycin (1 μ l 5 mM), CCCP (3x 1 μ l 1 mM), Rotenon (2 μ l 1 mM), malonát (10 μ l 1 M), antimycin A (1 μ l 5 mM). Oproti protokolu pro Seahorse analýzu se zde navíc využívá: sukcinát jako substrát pro komplex II dýchacího řetězce; ADP, jež stimuluje ATPázu; malonát, jež inhibuje komplex II dýchacího řetězce.

4.8 Analýza vybraných komponent buněčného metabolismu

Analýza metabolomu probíhala pomocí kapalně chromatografie spojené s hmotnostní spektrometrií a prováděla ji pro nás laboratoř OMICS a Proteomika při institutu BIOCEV. Vzorky pro metabolomickou analýzu jsme připravovali podle protokolu popsáno v (Lu *et al.* 2018). Ve stručnosti U87-MG buňky byly uvolněny trypsinizací, promyty ledovými pufovanými BS solemi (134 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 7,4) a inkubovány na ledu v extrakčním roztoku A (40:40:20 – acetonitril:metanol:H₂O obsahující 0,1 M kyselinu mravenčí). Buňky jsme v roztoku A resuspendovali (50 μ l na 1×10^5 buněk) a inkubovali 3 min na ledu. Extrakt jsme poté neutralizovali pomocí hydrogenuhličitanu amonného – 8,7 μ l 15% NH₄HCO₃ na 100 μ l lyzátu a sonikovali v ledové vodní lázni po 2 minuty. Vzorky jsme poté centrifugovali (16 000 x g, 4°C, 15 min) a supernatanty předali členů laboratoře OMICS pro další zpracování.

5 Výsledky

5.1 Eliminace exprese vybraných anti-apoptotických proteinů z rodiny Bcl-2 pomocí CRISPR-Cas12a

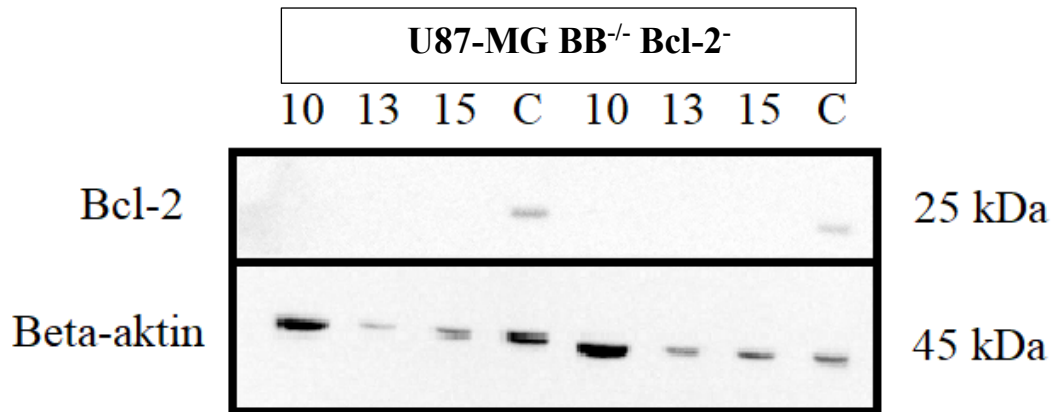
Naším primárním záměrem při přípravě buněk s eliminovanou expresí třech bazálních anti-apoptotických proteinů z Bcl-2 rodiny bylo získat 3 klony od každého proteinu v každé naší buněčné linii (HCT116, HBL-2 a U87-MG) a v každé linii i na pozadí eliminace Bax a Bak, které bychom mohli následně analyzovat a určit vliv jednotlivých delecí na buněčný, zejména pak mitochondriální metabolismus.

	Bcl-2 ⁻	Bcl-X _L ⁻	Mcl-1 ⁻
HBL-2	0 (1)	2 (1)	0 (1)
HBL-2 Bax ⁻ /Bak ⁻	0 (1)	0 (1)	0 (1)
HCT116	/	0 (2)	3 (2)
HCT116 Bax ⁻ /Bak ⁻	0 (1)	0 (1)	0 (1)
U87-MG	0 (6)	0 (6)	0 (6)
U87-MG Bax ⁻ /Bak ⁻	3 (2)	3 (2)	3 (2)

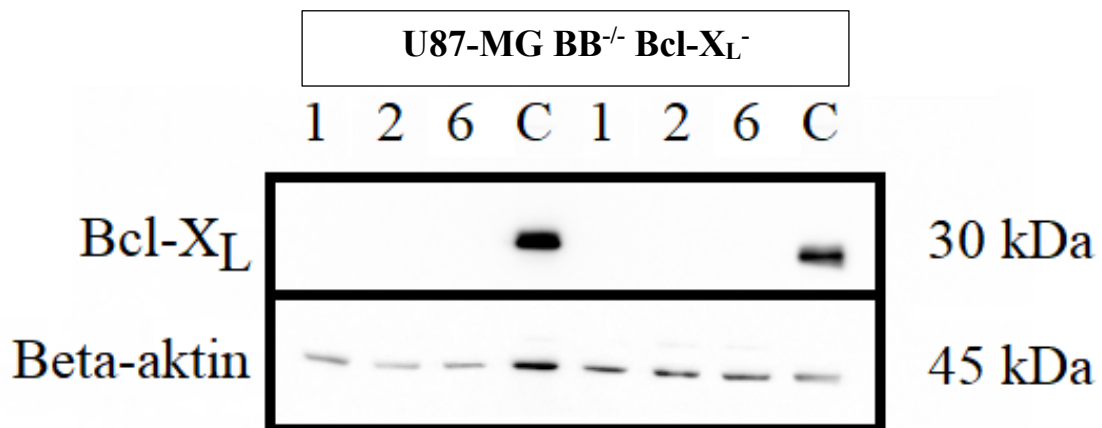
Tabulka 2 – Přehled výsledných získaných klonů a provedených transfekcí. Původně bylo naším plánem získat 3 klony postrádající jeden ze tří vybraných proteinů. Číslo v tabulce značí počet získaných klonů a číslo v závorce počet provedených transfekcí. Červeně značené číslo znamená ztrátu klonů v důsledku bakteriální kontaminace mykoplasma. HCT116 téměř neexprimují Bcl-2, proto u nich eliminace exprese tohoto proteinu nebyla brána v úvahu.

V Tab. 2 je vidět přehled našich dokončených klonů. Bohužel se už ze začátku ukázala velmi malá úspěšnost eliminace genové exprese těchto proteinů, a proto jsme se soustředili hlavně na

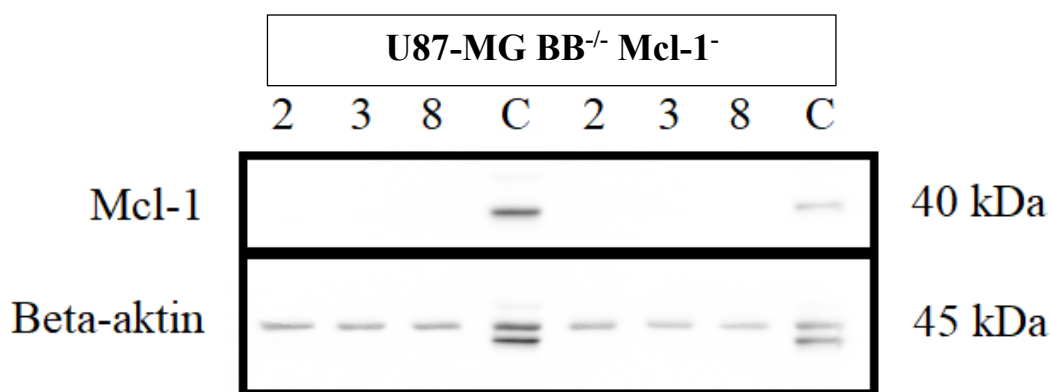
získání pozitivních výsledků v jedné buněčné linii (U87-MG) na pozadí divokého typu a buněčné linie s vyřazenými proteiny Bax a Bak (6 lipofekcí a následných WB analýz). Ve výsledku jsme dosáhli vyřazení všech tří proteinů z rodiny Bcl-2 pouze v případě buněčné linie U87-MG s vyřazenou expresí proteinů Bax a Bak (Obr. 7, 8, 9).



Obrázek 7 – Výsledek analýzy Western blot pro přítomnost proteinu Bcl-2 u klonů U87-MG BB^{-/-} 10, 13 a 15. Výsledek dokázal nepřítomnost proteinu Bcl-2 u těchto klonů, jak dokládá kontrola (vzorek z parentální linie U87-MG BB^{-/-} 2) a přítomnost beta-aktinu ve vzorcích.



Obrázek 8 - Výsledek analýzy Western blot pro přítomnost proteinu Bcl-X_L u klonů U87-MG BB^{-/-} 1, 2 a 6. Výsledek dokázal nepřítomnost proteinu Bcl-X_L u těchto klonů, jak dokládá kontrola (vzorek z parentální linie U87-MG BB^{-/-} 2) a přítomnost beta-aktinu ve vzorcích.



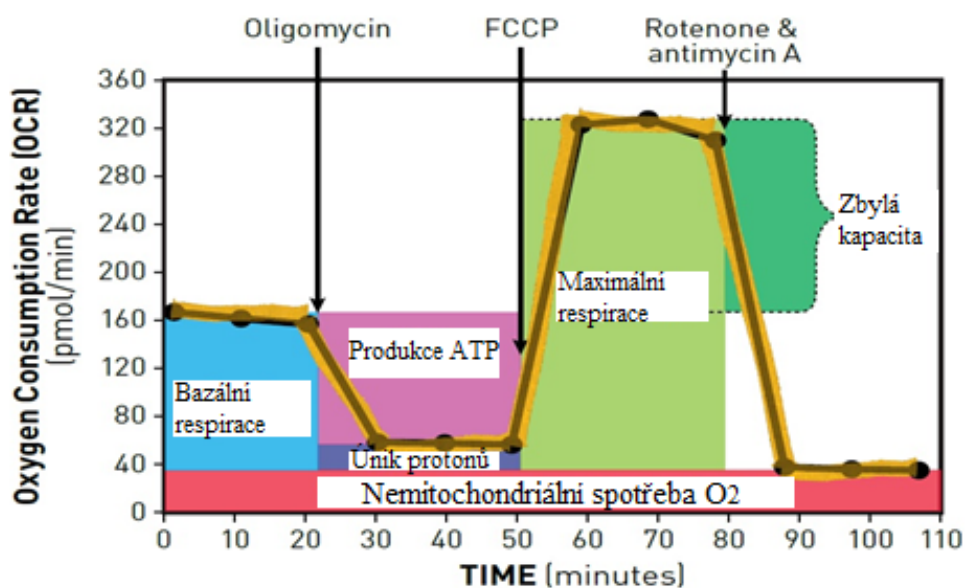
Obrázek 9 - Výsledek analýzy Western blot pro přítomnost proteinu Mcl-1 u klonů U87-MG BB^{-/-} 2, 3 a 8. Výsledek dokázal nepřítomnost proteinu Mcl-1 u těchto klonů, jak dokládá kontrola (vzorek z parentální linie U87-MG BB^{-/-} 2) a přítomnost beta-aktinu ve vzorcích.

Kromě eliminace exprese Bcl-X_L v buňkách U87-MG BB^{-/-} se nám podařilo získat i dva Bcl-X_L deficitní klony i v případě B buněčného lymfomu HBL-2. Tyto klony jsou nyní předmětem výzkumu ve spolupracující laboratoři prof. Pavla Klenera jr. (1. Lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Praha). Úspěch jsme měli zpočátku i u nádorové linie HCT116, nicméně u té bohužel došlo ke kontaminaci mykoplasrou, a nebyla tedy dále zkoumána.

5.2 Měření OCR a stav mitochondriální respirace

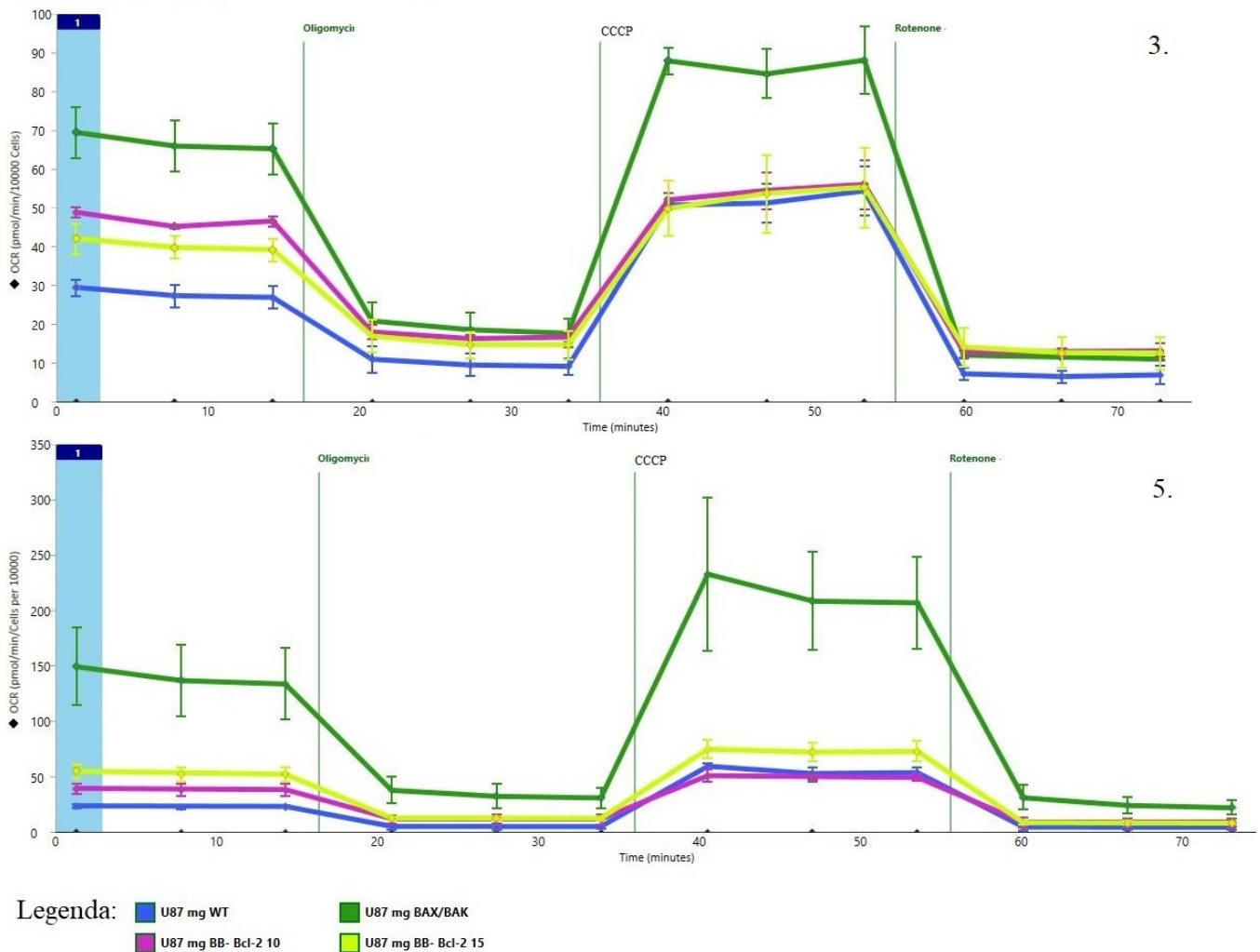
U všech třech připravených klonů buněk U87-MG BB^{-/-} s eliminovanou expresí jednoho z anti-apoptotických proteinů (Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1) jsme na analyzátoru Seahorse XFe96 charakterizovali jejich bazální mitochondriální respiraci. Podle výsledků dvou analýz jsme pro další experimenty vybrali ze tří připravených klonů dva klony, u kterých jsme analýzy OCR dále opakovali. Nakonec bylo provedeno pět měření mitochondriální respirace za využití analyzátoru Seahorse XFe96 a analýza mitochondriální respirace pomocí O2k-Respirometru. Obr. 10 je vysvětlující k výsledným grafům z analýzy OCR pomocí přístroje Seahorse XFe96 Analyzer. Názorně demonstruje jednotlivá měření, která můžeme získat z tohoto typu analýzy. Přičemž u jednotlivých analýz nás více než izolované hodnoty zajímají spíše rozdíly mezi jednotlivými liniemi, které by svědčily o funkci proteinů z rodiny Bcl-2 v mitochondriálním metabolismu.

Profil Seahorse XF mitochondriální respirace



Obrázek 10 – Vysvětlení následujících grafů z analýz OCR na přístroji Seahorse XFe96 Analyzer od firmy Agilent Technologies. Na obrázku můžeme sledovat efekty jednotlivých stimulantů a inhibitorů na spotřebu kyslíku, a co změna ve spotřebě kyslíku (OCR) reálně znamená. Přístroj nejdříve měří hodnoty bazální respirace buněk. Po přidání inhibitoru ATPázy oligomycinu se OCR sníží o produkci ATP. Následně se přidá tzv. *uncoupler* FCCP nebo CCCP, které oddělí spotřebu kyslíku od produkce ATP, která je nyní inhibována a dojde k nárůstu OCR na hodnotu maximální respirace, které jsou buňky schopné. V poslední řadě se přidají inhibitory elektron transportního řetězce rotenon a antimycin A, které úplně inhibují mitochondriální respiraci, což nám vypoví hodnotu úniku protonů přes vnitřní mitochondriální membránu bez produkce ATP. Zbylá spotřeba kyslíku po inhibici rotenonem a antimycinem A představuje už jen kyslík, který se spotřebovává mimo mitochondrie a respiraci. OCR se měří v pmol/minutu a osa X pak představuje čas měření v minutách. Převzato a přeloženo od výrobce Agilent Technologies.

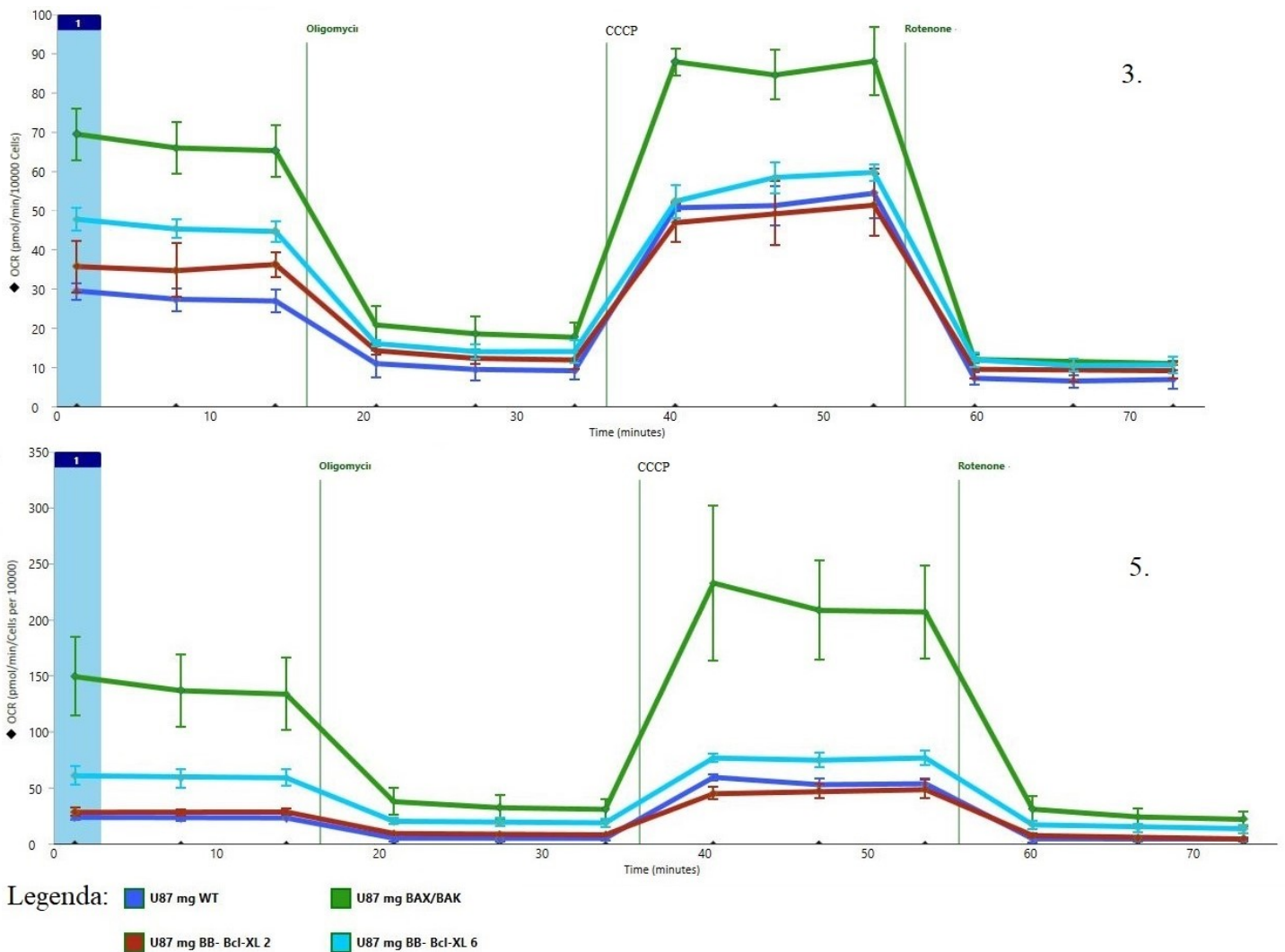
5.2.1 Analýza mitochondriální respirace u Bcl-2 deficitních klonů 10 a 15



Obrázek 11 – Dva reprezentativní výsledky (3. a 5.) analýzy OCR u linie U87 BB^{-/-} Bcl-2^{-/-}. Na obrázku je možné vidět postup analýzy OCR v čase u parentálních buněk U87-MG (modrá linie), U87-MG BB^{-/-} (zelená linie), U87-MG BB^{-/-} Bcl-2^{-/-} klon 10 (fialová linie) a U87-MG BB^{-/-} Bcl-2^{-/-} klon 15 (světle zelená linie). Osa Y udává OCR v jednotkách pmol/min/10000 buněk a osa X udává čas v minutách. Vysvětlení jednotlivých částí grafu viz Obr. 10 a kapitola Metodika.

Z našich dřívějších analýz vyplynulo, že eliminace exprese pro-apoptotických proteinů Bax a Bak vedla k výraznému nárůstu bazální i maximální respirace. Z eliminace exprese jak proteinu Bcl-2 (Obr. 11), tak i dalších dvou anti-apoptotických proteinů Bcl-X_L a Mcl-1 (viz výsledky níže) vyplývá, že vyřazení jejich exprese v glioblastomu U87-MG potlačilo zvýšení mitochondriální respirace indukované vyřazením exprese obou majoritních pro-apoptotických proteinů Bax a Bak.

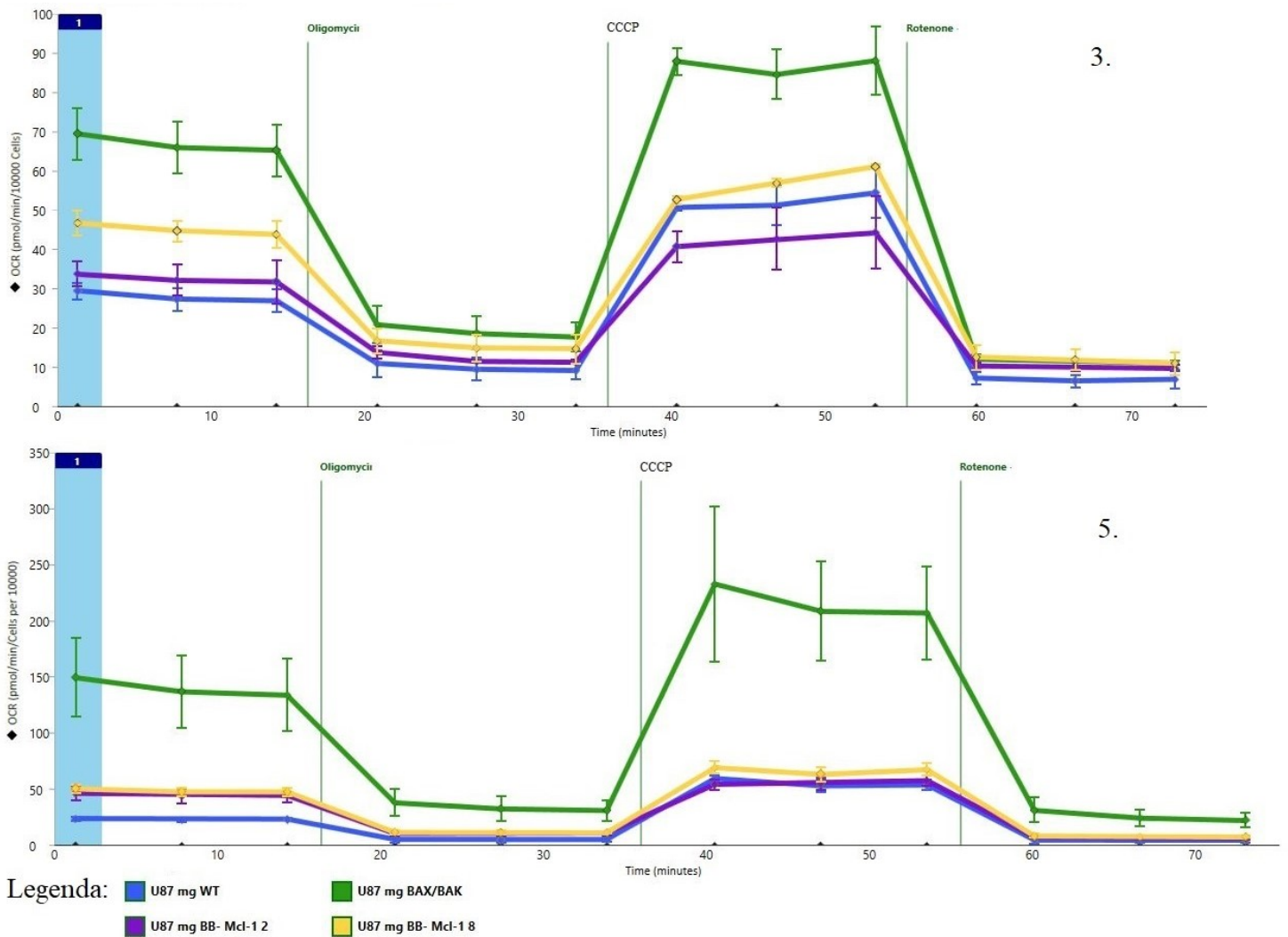
5.2.2 Analýza mitochondriální respirace u Bcl-XL deficitních klonů 2 a 6



Obrázek 12 - Dva reprezentativní výsledky (3. a 5.) analýzy OCR u linie U87 BB^{-/-} Bcl-XL^{-/-}. Na obrázku je možné vidět postup analýzy OCR v čase u parentálních U87-MG (modrá linie), U87-MG BB^{-/-} (zelená linie), U87-MG BB^{-/-} Bcl-XL^{-/-} klon 2 (červená linie) a U87-MG BB^{-/-} Bcl-XL^{-/-} klon 6 (světle modrá linie). Osa Y udává OCR v jednotkách pmol/min/10000 buněk a osa X udává čas v minutách. Vysvětlení jednotlivých částí grafu viz Obr. 10 a kapitola Metodika.

Analýza mitochondriální respirace v U87-MG BB^{-/-} buněk s eliminovanou expresí Bcl-XL ukázala obdobně jako u buněk s vyřazenou expresí Bcl-2 (viz výše) potlačení jak bazální, tak i maximální respirace až na úroveň parentálních buněk U87-MG.

5.2.3 Analýza mitochondriální respirace u Mcl-1 deficitních klonů 2 a 8

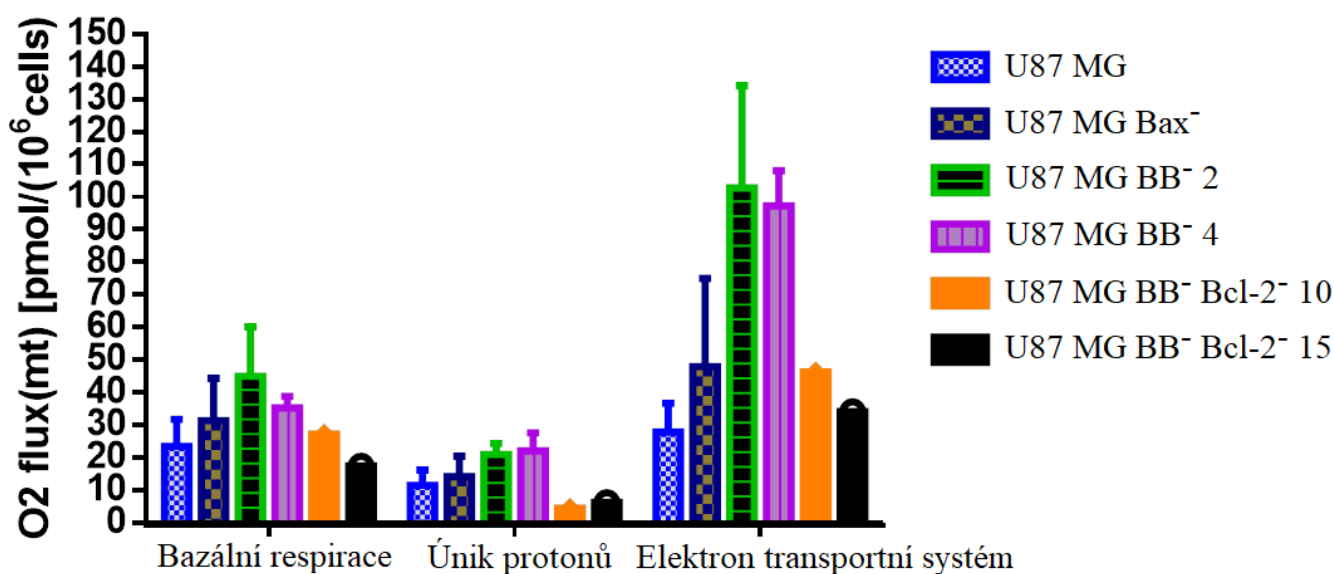


Obrázek 13 - Dva reprezentativní výsledky (3. a 5.) analýzy OCR u linie U87 BB^{-/-} Mcl-1^{-/-}. Na obrázku je možné vidět postup analýzy OCR v čase u parentálních buněk U87-MG (modrá linie), U87-MG BB^{-/-} (zelená linie), U87-MG BB^{-/-} Mcl-1^{-/-} klon 2 (fialová linie) a U87-MG BB^{-/-} Mcl-1^{-/-} klon 8 (žlutá linie). Osa Y udává OCR v jednotkách pmol/min/10000 buněk a osa X udává čas v minutách. Vysvětlení jednotlivých částí grafu viz Obr. 10 a kapitola Metodika.

Analýza vlivu vyřazení Mcl-1 na OCR u U87-MG BB^{-/-} (Obr. 13), ukázala velice podobný efekt na respiraci jako u předešlých proteinů Bcl-2 a Bcl-X_L, což je ve výsledku velice zajímavé, protože se v zásadě jedná od tří proteiny sice ze stejné rodiny obsahující podobné homologické domény, nicméně dosavadní studie (viz kapitola Úvod) jim připisují rozdílné úlohy a lokalizace v rámci mitochondriální funkce. Ztráta těchto proteinů tak dokáže zcela zrušit konstantně vyšší bazální, a dokonce i maximální respiraci u buněk postrádajících proteiny Bax a Bak.

5.2.4 Analýza mitochondriální respirace O2k respirometrem

Analýzu mitochondriální respirace U87-MG $BB^{-/-}$ Bcl-2⁻ 10 a 15 pomocí přístroje O2k-Respirometer (Oroboros Instruments) byla provedena zatím pouze jednou, a pro potvrzení výsledků ji bude zapotřebí zopakovat. Nicméně přestože O2k-Respirometer analyzuje koncentraci a úbytek kyslíku odlišným přístupem (elektrochemicky O₂ elektrodou oproti Seahorse XFe96 Analyzer – fluorimetrický senzor O₂) z první analýzy vyplývají obdobná data jako z měření mitochondriální respirace analyzátozem Seahorse XFe-96 (Obr. 14).

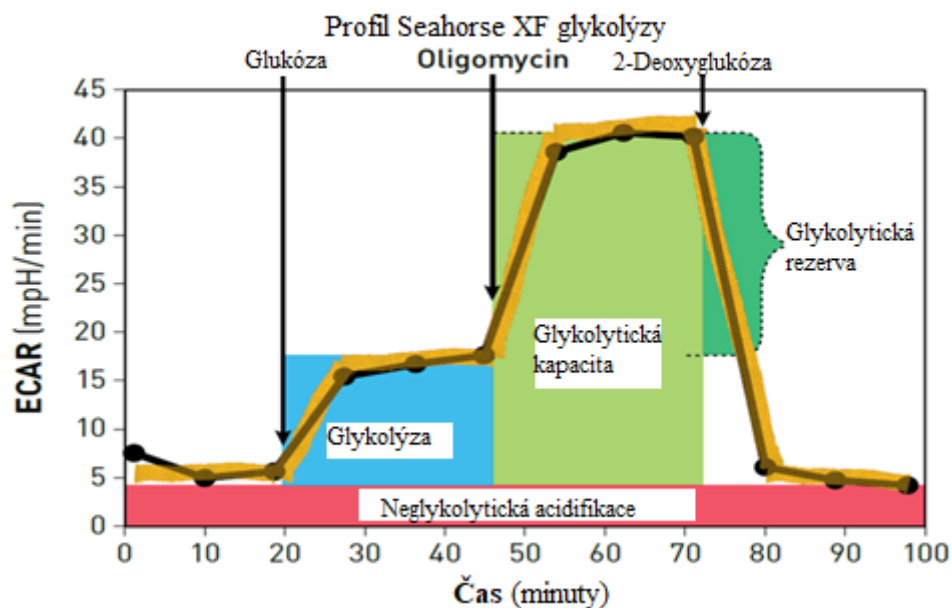


Obrázek 14 – Analýza stavu mitochondriální respirace v jednotlivých buněčných liniích pomocí přístroje O2k-Respirometer (Oroboros Instruments). U87-MG $BB^{-/-}$ 2 vykazuje nejvyšší bazální respiraci, aktivitu elektron transportního systému a je zároveň i parentální linií pro linie s vyřazenou produkcí proteinu Bcl-2, které podobně jako u předešlých OCR analýz vykazují hodnoty podobné parentálním buňkám. Graf představuje kombinaci výsledků předešlých analýz pro U87-MG, U87-MG Bax⁻, U87-MG $BB^{-/-}$ 2, U87-MG $BB^{-/-}$ 4 a nové analýzy buněčných linií U87-MG $BB^{-/-}$ Bcl-2⁻ 10, U87-MG $BB^{-/-}$ Bcl-2⁻ 15.

Vyřazení proteinů Bax a Bak stimuluje elektron transportní systém a bazální respiraci, přičemž vyřazení proteinu Bcl-2 obdobně jako při analýze mitochondriální respirace analyzátozem Seahorse XFe96 výrazně snižuje jak bazální, tak i maximální (ETS) respiraci na úroveň parentálních buněk U87-MG.

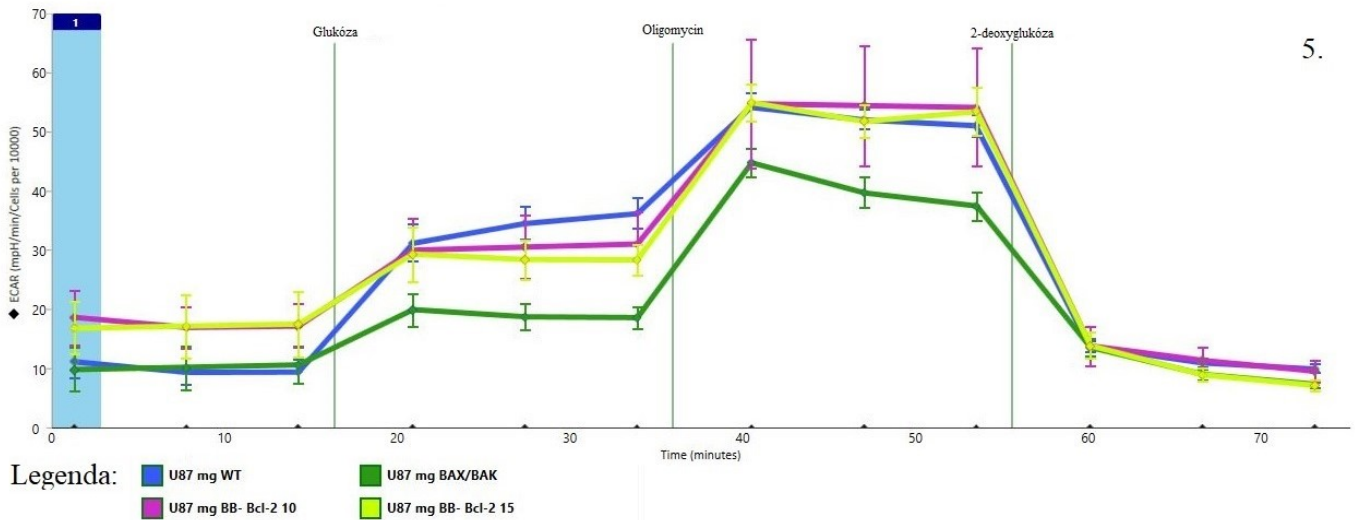
5.3 Měření acidifikace média (ECAR) a analýza glykolýzy

Měření ECAR odpovídajícího stavu glykolýzy probíhalo souběžně, ale nezávisle s měřením mitochondriální respirace na přístroji Seahorse XFe96 Analyzer (Agilent Technologies). Po prvních dvou analýzách jsme používali dále stejné klony jako u měření mitochondriální respirace. Zde uvádíme pouze jedno reprezentativní měření, neboť jsme u výsledků analýzy glykolýzy nezaznamenávali velké rozdíly, které by vedly k zásadnějším závěrům o funkci proteinů Bcl-2 v rámci glykolytické kaskády. Schéma měření glykolýzy pomocí analyzátoru Seahorse XFe96 je možné vidět na obrázku 15.



Obrázek 15 - Vysvětlení následujících grafů z analýz ECAR na přístroji Seahorse XFe96 Analyzer od firmy Agilent Technologies. Na obrázku můžeme sledovat efekty jednotlivých stimulantů a inhibitorů na extracelulární acidifikaci (ECAR), a co změna v ECAR reálně znamená. Přístroj nejdříve měří hodnoty bazální glykolýzy buněk. Po přidání glukózy se glykolýza stimuluje a ECAR stoupá. Následně se přidá inhibitor ATPázy oligomycin, čímž se inhibuje oxidativní produkce ATP ve prospěch glykolýzy. V poslední řadě se přidá inhibitor prvních enzymů glykolytické kaskády hexokinázy a glukóza-6-fosfát izomerázy, čímž se glykolýza postupně zastaví a zbývá už jen neglykolytická acidifikace. ECAR se měří v mpH/min. Převzato a přeloženo od výrobce Agilent Technologies.

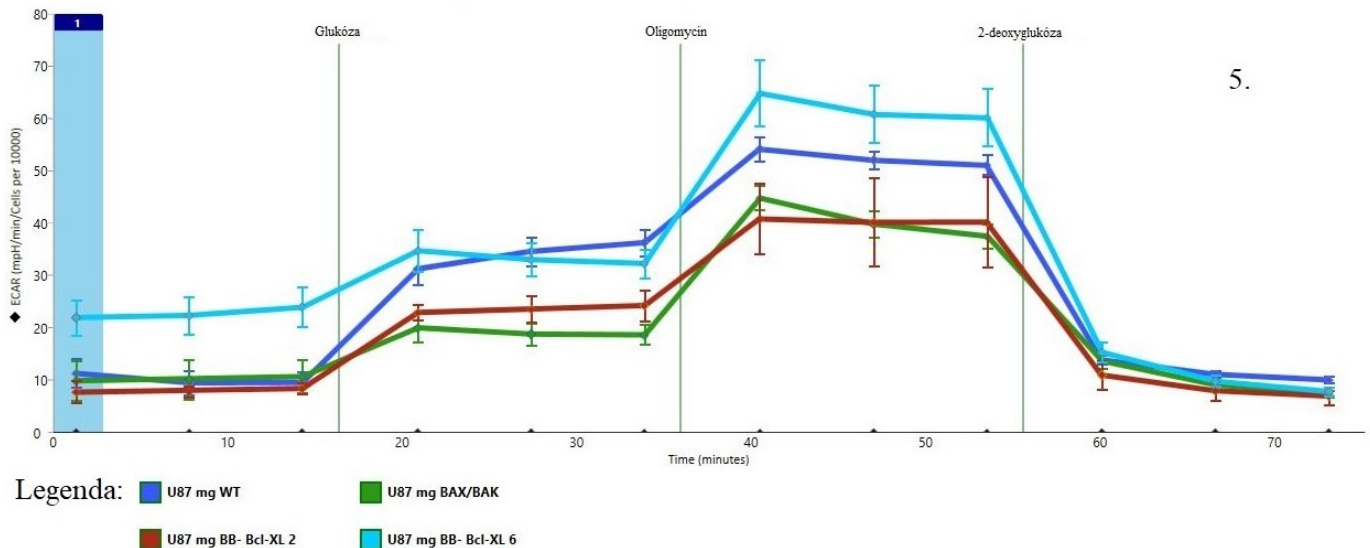
5.3.1 Analýza glykolýzy u Bcl-2 deficitních klonů 10 a 15



Obrázek 16 – reprezentativní výsledek ECAR analýzy klonů 10 a 15 U87-MG BB^{-/-} Bcl-2^{-/-}. Na obrázku je možné vidět postup analýzy ECAR v čase u parentální linie U87-MG (modrá linie), U87-MG BB^{-/-} (zelená linie), U87-MG BB^{-/-} Bcl-2^{-/-} klon 10 (fialová linie) a U87-MG BB^{-/-} Bcl-2^{-/-} klon 15 (světle zelená linie). Osa Y udává ECAR v jednotkách mpH/min/10000 buněk a osa X udává čas v minutách. Vysvětlení jednotlivých částí grafu viz Obr. 15 a kapitola Metodika.

Z analýzy klonů 10 a 15 U87-MG BB^{-/-} Bcl-2^{-/-} (Obr.16) vyplynulo, že podobně jako OCR se po vyřazení proteinu Bcl-2 změní energetický profil U87-MG BB^{-/-} a přiblíží se zpět k parentálním buňkám. Přičemž je zřejmé, že vyřazení Bax a Bak snižuje celkově glykolýzu a dodatečné vyřazení Bcl-2 glykolytické reakce zase navýší.

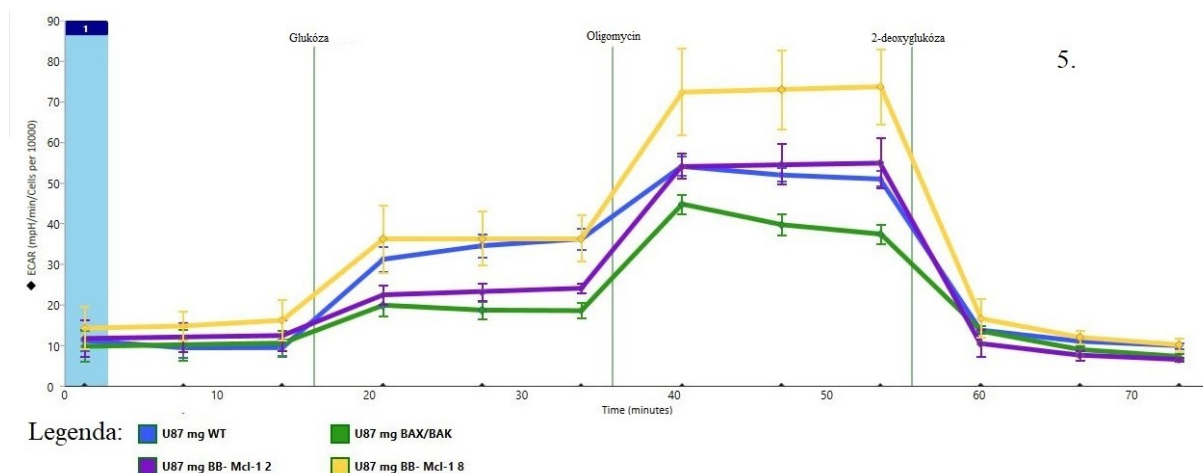
5.3.2 Analýza glykolýzy u Bcl-X_L deficitních klonů 2 a 6



Obrázek 17 - reprezentativní výsledek ECAR analýzy klonů 2 a 6 U87-MG BB^{-/-} Bcl-X_L^{-/-}. Na obrázku je možné vidět postup analýzy ECAR v čase u parentálních buněk U87-MG (modrá linie), U87-MG BB^{-/-} (zelená linie), U87-MG BB^{-/-} Bcl-X_L^{-/-} klon 2 (červená linie) a U87-MG BB^{-/-} Bcl-X_L^{-/-} klon 6 (světle modrá linie). Osa Y udává ECAR v jednotkách mpH/min/10000 buněk a osa X udává čas v minutách. Vysvětlení jednotlivých částí grafu viz Obr. 15 a kapitola Metodika.

Z analýzy ztráty postupně Bax, Bak a Bcl-X_L nevyšly žádné zřejmé souvislosti (Obr. 17). Zdá se, že jednotlivé klony nemají konzistentní glykolytický profil – klon č. 6 vykazoval zvýšený ECAR oproti BB^{-/-} buňkám, klon č. 2 naopak nikoliv.

5.3.3 Analýza glykolýzy u Mcl-1 deficitních klonů 2 a 8



Obrázek 18 - reprezentativní výsledek ECAR analýzy klonů 2 a 8 U87-MG BB^{-/-} Mcl-1⁻. Na obrázku je možné vidět postup analýzy ECAR v čase u parentálních buněk U87-MG (modrá linie), U87-MG BB^{-/-} (zelená linie), U87-MG BB^{-/-} Mcl-1⁻ klon 2 (fialová linie) a U87-MG BB^{-/-} Mcl-1⁻ klon 8 (žlutá linie). Osa Y udává ECAR v jednotkách mpH/min/10000 buněk a osa X udává čas v minutách. Vysvětlení jednotlivých částí grafu viz Obr. 15 a kapitola Metodika.

Glykolytický profil U87-MG BB^{-/-} buněk s vyřazenou expresí Mcl-1 se obdobně jako buněk U87-MG BB^{-/-} Bcl-2⁻ vyznačoval nárůstem ECAR, a tedy i glykolýzy (Obr. 18). Můžeme tedy vyvodit, že následkem ztráty proteinů Bcl-2, Bcl-X_L a Mcl-1 se až na klonální výjimky (U87-MG BB^{-/-} Bcl-X_L klon č. 2) zvýší glykolytická aktivita U87-MG buněk s eliminovanou expresí pro-apoptotických proteinů Bax a Bak na či i nad úroveň parentálních U87-MG buněk.

5.4 Metabolická analýza

Metabolickou analýzu (kapalinová chromatografie a hmotnostní spektrometrie) pro nás vypracovávala laboratoř OMICS a Proteomiky při ústavu BIOCEV. Podobně jako u měření respirace na O2k-Respirometru jsme z časových důvodů provedli pouze jednu metabolickou analýzu, kterou bude třeba v navazujícím výzkumu potvrdit. Z provedené metabolické analýzy vyplývá, že 2 klony U87-MG BB^{-/-} Bcl-2⁻ mají podobný metabolický profil jako U87-MG BB^{-/-} 2, který se nicméně liší od parentálních buněk například v hladinách NADH, NAD⁺, kyseliny pyrohroznové, aspartátu, hydroxyglutarové kyseliny (viz Příloha 3).

6 Diskuse

Doposud publikované studie ukázaly, že anti-apoptické proteiny z rodiny Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-X_L a Mcl-1) se podílejí na regulaci mitochondriálního metabolismu, glykolýzy, Krebsova cyklu a beta oxidace mastných kyselin, nicméně teprve nyní získáváme bližší informace o tom, jakými způsoby tato regulace probíhá.

V této studii jsme analyzovali vliv proteinů Bcl-2, Bcl-X_L a Mcl-1 na metabolismus parentálních nádorových linií a linií s delecí exprese genů pro pro-apoptické proteiny Bax a Bak. K tomuto účelu jsme se připravovali nádorové linie lidské glioblastomy (U87-MG), kolorektálního karcinomu (HCT-116) a B buněčného lymfomu (HBL-2) s delecemi exprese genů pro proteiny Bcl-2, Bcl-X_L a Mcl-1 pomocí metody CRISPR-Cas12a. Po sérii eliminačních experimentů se nám nakonec podařilo připravit eliminace pro všechny tři proteiny pouze u linie U87-MG BB^{-/-} a pro protein Bcl-X_L u linie HBL-2. Základní metoda CRISPR-Cas12a se v našem případě ukázala jako málo efektivní. Transfekce pomocí lipofekce a elektroporace zdá se byly účinné, neboť se pomocí průtokové cytometrie po každé transfekci podařilo vždy vyselektovat 192 klonů s vyřazenou produkcí jednoho ze tří proteinů Bcl-2. Z těchto 192 klonů po tří týdenní inkubaci pravidelně dorůstalo pouze okolo 30% klonů a z těchto 30% pak ve většině případů nevyšly žádné klony se skutečně vyřazenou produkcí Bcl-2 proteinů dle Western blot analýz. U parentální linie to znamenalo šest lipofekcí s celkovým počtem pro jeden ze tří zvolených proteinů 1152 vyříděných klonů, ze kterých jsme analyzovali celkově až 180 dorostlých klonů, přičemž žádný nevykazoval úplnou eliminaci pro daný protein.

Tento neúspěch se dá z části přičknout zásadní funkci těchto proteinů v regulaci apoptózy. Všechny tři zkoumané proteiny chrání buňky před regulovanou smrtí, což je zvláště významné pro nádorové linie, které jsou už ze své podstaty k apoptóze citlivé a mnoho nádorových linií tyto proteiny aktivně nadprodukuje, čímž odolávají apoptóze (Findley *et al.* 1997; Kaufmann *et al.* 1998; *Yamaguchi *et al.* 2019). Není tudíž překvapivé, že se nám nepodařilo vyřadit anti-apoptické proteiny u parentálních nádorových linií, ve kterých může snadno převážit pro-apoptická signalizace zejména proteinů Bax a Bak. Přesto je vyřazení těchto proteinů u parentálních buněk možné, i když to v některých případech přináší významné fyziologické defekty, kterým lze do určité míry předejít současným vyřazením pro-apoptických proteinů Bax a Bak (Wang *et al.* 2013). To se potvrdilo i v našem případě, neboť se nám podařilo připravit linie s eliminací produkce zvláště Bcl-2, Bcl-X_L a Mcl-1 právě na pozadí vyřazení Bax a Bak u linie lidské glioblastomy U87-MG. Na pozadí parentálních buněk se nám podařilo

připravit pouze dva klony Bcl-X_L v linii HBL-2, se kterými nyní pracujeme v dosud nepublikované studii zaměřující se čistě na proteiny Bax a Bak. Klony jsme také poskytli spolupracující laboratoři prof. Pavla Klenera jr. (1. Lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Praha). Obtížnost přípravy nádorových linií s vyřazenou produkcí anti-apoptotických proteinů dokládá i to, že většina citovaných prací spíše pracuje s jejich umělou nadprodukcí, což nás ale původně motivovalo ke CRISPR-Cas12a zprostředkované eliminaci exprese těchto proteinů, a tím i možnému rozšíření znalostí vztahu proteinů Bcl-2 a buněčného metabolismu.

Uvedená literatura připisuje proteinům Bcl-2, Mcl-1 a Bcl-X_L poměrně odlišné funkce a lokalizace v rámci buněčného metabolismu a jednotlivé studie často více propojují širší anti-apoptotickou signalizaci s regulací metabolismu, nežli vyloženě dokládají nové funkce těchto proteinů čistě na úrovni buněčného metabolismu.

Citované práce spojují funkci proteinu Bcl-2 s metabolickou regulací hlavně na úrovni hladiny ROS a ATP. Efekt Bcl-2 proteinu na buněčný metabolismus se pak především projevuje v reakci na rozmanité stresové podmínky, což mnohé práce připisují spíše širší anti-apoptotické funkci nežli běžné regulaci buněčných metabolických procesů. Ve většině uvedených studií se pracuje s jeho uměle zvýšenou expresí nebo se využívá buněčných linií s přirozeně zvýšenou expresí genu pro protein Bcl-2, které tento protein k přežití zřejmě potřebují. Je tedy otázka, jak důležitý je Bcl-2 protein jako regulátor v běžných situacích, nestresových podmínkách a u linií, které i po eliminaci tohoto proteinu dále zdárně proliferují.

Podobně jako protein Bcl-2 reguluje výměnu ATP/ADP pomocí ANT translokázy (Belzacq *et al.* 2003) Bcl-X_L může tuto výměnu regulovat na úrovni VDAC/ANT (Vander Heiden *et al.* 1999, 2001). Na rozdíl od Bcl-2 se ale Bcl-X_L dokáže přímo vázat na beta podjednotku F₁F₀ ATPázy a zvyšovat tak její efektivitu (Alavian *et al.* 2011).

Protein Mcl-1 pak ovlivňuje mitochondriální metabolismus skrze svou kratší izoformu (36 kDa), která se nejen transportuje do matrix mitochondrií, ale posléze se naváže do vnitřní mitochondriální membrány, kde je nezbytná pro správnou fyziologii vnitřní mitochondriální membrány a superkomplexů dýchacího řetězce (Perciavalle *et al.* 2012). Mcl-1 i Bcl-X_L také interagují s faktorem dělení mitochondrií GTPázou Drp 1 (Li *et al.* 2013; Rasmussen *et al.* 2018).

Původně jsme předpokládali, že budou mít jednotlivé vybrané anti-apoptotické proteiny a jejich vyřazení individuální vliv na buněčný metabolismus. Proto jsme ve výzkumu ověřovali možnost jejich separovaného zkoumání a směřovali k prokázání charakteristického vlivu

proteinu Bcl-2, Bcl-X_L a Mcl-1 na mitochondriální respiraci, glykolýzu a hladiny metabolitů. Cílem bylo vzájemné porovnávání a analýza možných rozdílů, které by přímo poukazovaly na jejich rozdílné funkce v rámci buněčného metabolismu. Nicméně naše výsledky a uvedená literatura nás nutí spíše na ně pohlížet dohromady v rámci jejich anti-apoptické a homeostatické funkce.

Vyřazení proteinů Bax a Bak v glioblastomové linii U87-MG, podle našich zjištění, vedlo k výraznému zvýšení bazální a maximální mitochondriální respirace a k určitému potlačení glykolýzy. V rámci této diplomové práce jsme následně zjistili, že eliminace kteréhokoliv z tří anti-apoptických proteinů Bcl-2, Bcl-X_L a Mcl-1 vedla ke zpětnému snížení původně vyšší bazální a maximální respirace U87-MG buněk s eliminovanou produkcí Bax a Bak zpátky na úroveň podobné parentálním buňkám a zároveň i k nárůstu glykolýzy. Anti-apoptické proteiny se tedy stávají validním kandidátem pro sledované zvýšení respirace v nepřítomnosti Bax a Bak, což poukazuje na jejich společnou regulaci mitochondriálního metabolismu. Bcl-2, Bcl-X_L a Mcl-1 by pozorovaného efektu mohli dosáhnout cílením na společný bod v regulaci mitochondriálního metabolismu. Takovým bodem byl mohl být transport ATP/ADP do matrix mitochondrií. Z uvedené literatury vyplývá, že Bcl-2, Bcl-X_L i Bax regulují transportéry ATP/ADP komplex VDAC/ANT (Vander Heiden *et al.* 1999; Belzacq *et al.* 2003) a komplex VDAC/ANT by pak mohl být kandidátem pro tuto regulaci. Na druhou stranu eliminace Mcl-1 také snížila respiraci na úroveň parentálních buněk, což svědčí proti obecné anti-apoptické regulaci mitochondriální respirace, neboť delší Mcl-1 izoformy (40 kDa a 38 kDa), které zůstávají vně mitochondrií, mají anti-apoptickou funkci. Naopak kratší izoforma (36 kDa) se vytváří při průniku Mcl-1 do matrixu, kde ztrácí svoji anti-apoptickou funkci a získává nové, z hlediska respirace klíčové funkce ve vnitřní mitochondriální membráně (Perciavalle *et al.* 2012).

To nás přivádí k alternativní hypotéze. Bcl-2, Bcl-X_L a Mcl-1 by mohly zvyšovat mitochondriální respiraci v nepřítomnosti Bax a Bak každý zvlášť, samostatně. U proteinu Bcl-X_L si tak lze představit, že by mohl, například po ztrátě proteinů Bax a Bak, více interagovat s beta podjednotkami F₁F₀ ATPázy a celkově tak zvyšovat respiraci (Alavian *et al.* 2011; Veas-Pérez de Tudela *et al.* 2015). Bcl-2 a Bax fungují proti sobě při transportu přes antiport ANT, u kterého Bcl-2 zvyšuje aktivitu, zatímco Bax má zřejmě opačný efekt (Belzacq *et al.* 2003). U proteinu Mcl-1 by pak nepřítomnost Bax a Bak mohla vést ke změně v poměru mezi dlouhými izoformami a krátkými izoformami, což má v důsledku vliv na mitochondriální fyziologii, přičemž se tento poměr dá ovlivnit změnou mitochondriální hladiny Ca²⁺ (Morciano

et al. 2016). Nepřítomnost Bax a Bak by mohla výrazně změnit rovnováhu Ca^{2+} signalizace mezi endoplazmatickým retikulem a mitochondriemi, neboť Bax, Bak i Bcl-2, Bcl-X_L a Mcl-1 mají vliv na inositol 1,4,5-trifosfátový receptor, který je zodpovědný za transport Ca^{2+} do mitochondrií (Obr. 5B, 6)(*Vervliet *et al.* 2017; *Popgeorgiev *et al.* 2018).

Existuje i možnost, že by ke snížení mitochondriální respirace u U87-MG BB^{-/-} mohlo docházet následkem vyřazení Bcl-2, Bcl-X_L a Mcl-1 nezávisle na vyřazení proteinů Bax a Bak. Tuto možnost jsme nemohli plně dokázat, neboť se nám nepodařilo vyřadit Bcl-2, Bcl-X_L a Mcl-1 u parentálních buněk. Nicméně citované studie dokládají výrazné snížení bazální a maximální respirace (OCR) v důsledku inhibice či vyřazení produkce proteinu Mcl-1 u myších embryonálních fibroblastů (Perciavalle *et al.* 2012), mitochondrií izolovaných z myších kardiocytů (Wang *et al.* 2013), buněk akutní myeloidní leukémie (Carter *et al.* 2020) a kardiocytů odvozených z lidských indukovaných pluripotentních kmenových buněk (Rasmussen *et al.* 2020). Teoreticky obdobný efekt měla zvýšená produkce proteinu Bcl-2 u buněk lidské leukémie, která vedla naopak ke zvýšení mitochondriální respirace (Chen & Pervaiz 2007). Oproti tomu delece genu pro Bcl-X_L nezměnila maximální spotřebu O₂ oproti parentálním hematopoetickým buňkám (FL5.12)(Vander Heiden *et al.* 1999). Nakonec je zajímavé dodat, že mitochondrie izolované z myších kardiocytů s vyřazenou produkcí Mcl-1, Bax a Bak vykazují také snížení spotřeby kyslíku oproti pouze dvojitému vyřazení proteinů Bax a Bak, jako tomu je u našich výsledků U87-MG BB^{-/-} Mcl-1⁻² a 8 v porovnání s U87-MG BB^{-/-}. Oproti naší práci v této studii autoři nezaznamenali nárůst mitochondriální respirace po vyřazení pouze proteinů Bax a Bak jako tomu je u U87-MG BB^{-/-}, což by mohlo být v důsledku toho, že sledovali změny respirace u izolovaných mitochondrií na rozdíl od analýzy celých buněk U87-MG BB^{-/-} v našem případě (Wang *et al.* 2013).

Předpokládali jsme, že metabolická analýza odhalí bližší rozdíly následkem vyřazení Bcl-2 proteinů, především pak rozdíl mezi anti-apoptotickými proteiny Bcl-2, Bcl-X_L a Mcl-1 a pro-apoptotickými Bax, Bak. Vyřazení Bax, Bak změnilo hladiny některých klíčových metabolitů, avšak další eliminace proteinů Bcl-2, Bcl-X_L a Mcl-1 hladiny metabolitů výrazně neovlivnil. Nedá se tak spojit určitá hladina metabolitů se sledovaným snížením v mitochondriální respiraci, které vyvolá vyřazení Bcl-2, Bcl-X_L a Mcl-1 v U87-MG BB^{-/-}.

Výsledky našeho výzkumu ukazují ke skupinové roli Bcl-2 proteinů v regulaci buněčného metabolismu, tedy k rozdělení proteinů dle jejich role v apoptóze. Lze si představit, že pro-apoptotické proteiny působí proti anti-apoptotickým proteinům v rámci mitochondriální respirace a vyřazení jedné skupiny vede ke změně rovnováhy v respiraci a zřejmě i recipročně

v glykolýze parentálních buněk. Pro-apoptotické proteiny by tak mohly potlačovat pro-respirační anti-apoptotické proteiny a ztráta obou by vedla k návratu respirace na úroveň parentálních buněk. Domníváme se však, že je tento pohled velmi zjednodušený a přikláníme se k individualistickému charakteru Bcl-2 proteinů v rámci buněčného metabolismu. Zde uvedené hypotézy vysvětlující sledované změny v mitochondriální respiraci se navzájem nutně nevylučují a je možné, že další výzkum prokáže dílčí správnost každé z nich.

Do budoucna by bylo přínosné připravené linie podrobit analýze klíčových proteinů, se kterými Bcl-2 proteiny v rámci mitochondriální respirace interagují. Je nutné také zopakovat a rozšířit analýzu metabolomu, která by mohla odhalit na jaké části metabolických kaskád Bcl-2 proteiny přesně míří. V úvahu také připadá analýza stavu ROS v mitochondriích a cytosolu, neboť z dostupné literatury vyplývá, že anti-apoptotické proteiny Bcl-2 figurují především v reakci na stresové podmínky, a to právě regulací hladin ROS v matrix mitochondrií. Připravené nádorové linie bychom tak mohli vystavit různým formám stresové signalizace (např. odebrání růstových faktorů, zvýšení ROS v mitochondriích), což by nám dovolilo otestovat zvládání jednotlivých stresových podmínek v rámci vyřazení jednoho určitého anti-apoptotického proteinu či jejich kombinace v nádorových buněčných liniích.

7 Souhrn

Primárním cílem této práce bylo připravit nádorové linie s vyřazenou produkcí anti-apoptotických proteinů Bcl-2 na pozadí parentálních buněk a odvozené nádorové linie s vyřazenou produkcí pro-apoptotických proteinů Bax a Bak, které byly připraveny v rámci naší dosud nepublikované studie.

Úspěšně byl připraven set tři klonálních linií s eliminovanou expresí jednoho ze 3 majoritních anti-apoptotických proteinů Bcl-2, Bcl-X^L a Mcl-1 na pozadí U87-MG buněk s již eliminovanou expresí pro-apoptotických proteinů Bax a Bak: U87-MG BB^{-/-} Bcl-2⁻, U87-MG BB^{-/-} Bcl-X^L⁻, U87-MG BB^{-/-} Mcl-1⁻ (u každé tři klony) a dva klony nádorové linie na pozadí parentálních buněk HBL-2 Bcl-X^L⁻, které byly poskytnuty k dalšímu výzkumu laboratoři prof. Pavla Klenera jr. (1. Lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Praha).

Druhým cílem této práce bylo dokázat vliv eliminace proteinů Bcl-2, Bcl-X^L a Mcl-1 na mitochondriální respiraci, glykolýzu a hladiny metabolitů.

V rámci dosud nepublikované studie proteinů Bax, Bak jsme zjistili, že eliminace jejich genové exprese v glioblastomové linii U87-MG vede k významnému vzrůstu mitochondriální respirace. V této práci se podařilo tento vzrůst kompletně redukovat zpět na úroveň parentálních buněk U87-MG pomocí delece genové exprese anti-apoptotických proteinů Bcl-2, Bcl-X^L a Mcl-1. Naše výsledky tak naznačují významnou roli proteinů Bcl-2, Bcl-X^L a Mcl-1 v rámci regulace mitochondriální respirace. Přestože mají studované proteiny dle dosavadní literatury individuální role v rámci mitochondriální fyziologie, naše studie poukázala na jejich podobný vliv na oxidativní fosforylaci následkem jednotlivé eliminace každého ze studovaných proteinů, což nasvědčuje propojení jejich širších anti-apoptotických rolí s mitochondriální respirací.

V rámci analýzy glykolýzy jsme pozorovali tendenci ukazující na zvýšení ECAR, a tím i glykolýzy u U87-MG BB^{-/-} buněk s eliminovanou expresí jednoho z anti-apoptotických proteinů Bcl-2, Bcl-X^L či Mcl-1.

Preliminární analýza metabolomu neprokázala změny v hladinách klíčových metabolitů po eliminaci Bcl-2, Bcl-X^L a Mcl-1 v buňkách deficientních na Bax, Bak. Nádorová linie U87-MG BB^{-/-} má jiný metabolický profil u určitých metabolitů (aspartát, NADH, NAD⁺, kyselina hydroxyglutarová a další) nežli parentální buňky a ten si víceméně uchovává i po jednotlivé eliminaci Bcl-2, Bcl-X^L a Mcl-1.

Místa pro vstup crRNA oligonukleotidů:

BS AsCpf1 entry	caccgTAATTTCTACTCTTGTAGATggGTCTTCgaGAAGACct
BS AsCpf1 entry	aaacAAAagGTCTTctcGAAGACccATCTACAAGAGTAGA

- Fialová – přesahy pro klonování do vektoru pX330.
- Modrá – povinné G
- Zelená – místa pro klonování BbsI
- Červená – terminátor

8.2 Příloha 2

Použité sekvence oligonukleotidů pro klonování crDNAs cílených na vybrané sekvence v exonech a intronech genů Bcl-2, Bcl-X_L a Mcl-1 do Cas12a expresního plasmidu

Bcl-2 CPF1 exon2_introns F

AGATCCACGGTGGTGGAGGAGCTCTTCAATTTCTACTCTTGTAGATGCCGTGTTAC
TTGTAGTGTGTATAAATTTCTACTCTTGTAGATGATGGCAGGCGTTATCGGTCAGG

Bcl-2 CPF1 exon2_introns R

AAACCTGACCGATAACGCCTGCCATCATCTACAAGAGTAGAAATTATACACACT
ACAAGTAACACGGCATCTACAAGAGTAGAAATTGAAGAGCTCCTCCACCACCGT
GG

BclXL CPF1 exon 2/introns F

AGATGATGCCCCGGGAGGTGATCCCCATAATTTCTACTCTTGTAGATTACCCCCGTC
TTCTCCGAAATGCAATTTCTACTCTTGTAGATGCCTCTGGTCAGAGATCCCCAAC

BclXL CPF1 exon 2/introns R

AAAGTTGGGGATCTCTGACCAGAGGCATCTACAAGAGTAGAAATTGCATTTCGG
AGAAGACGGGGGTAATCTACAAGAGTAGAAATTATGGGGATCACCTCCCGGGCA
TC

Mcl-1 CPF1 exon1/introns F

AGATGCTACGGAGAAGGAGGCCTCGGCAATTTCTACTCTTGTAGATCATGAGCAC
CTCGGGCCTTCTCGAATTTCTACTCTTGTAGATAACACTGACTCGTTTCGGTTTCC

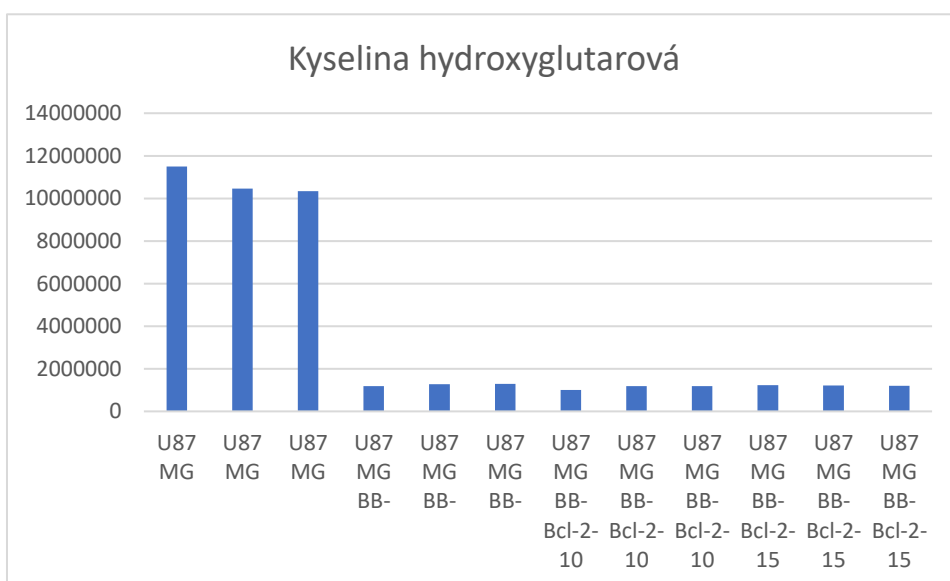
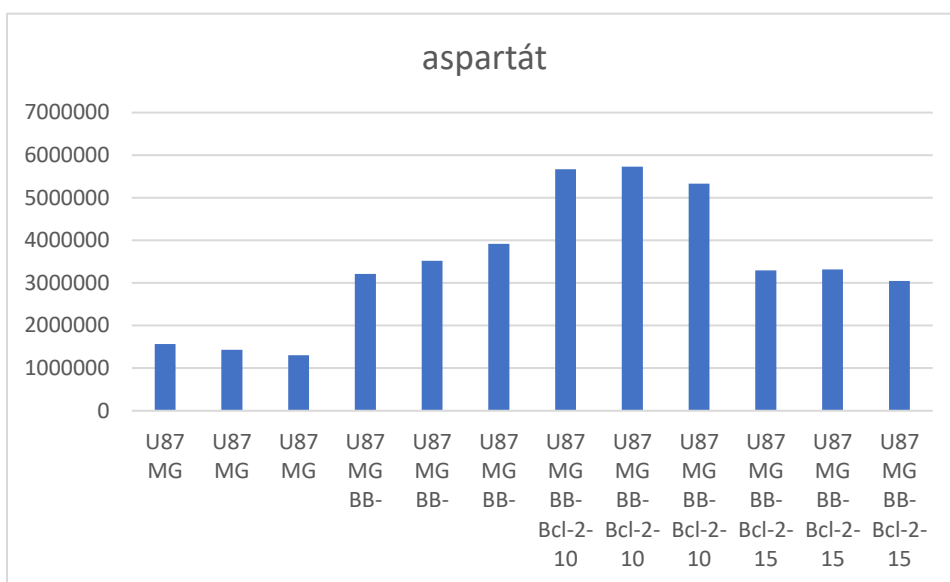
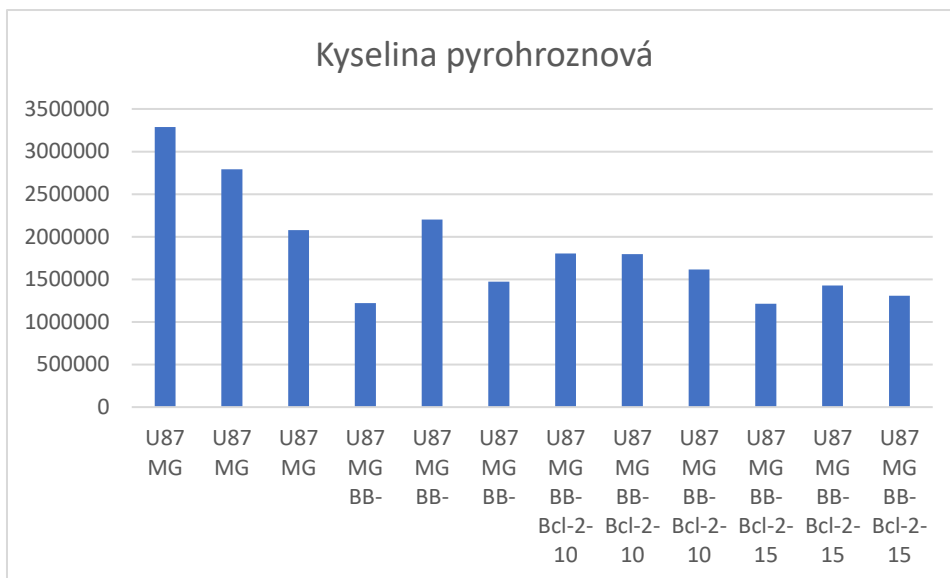
Mcl-1 CPF1 exon1/introns R

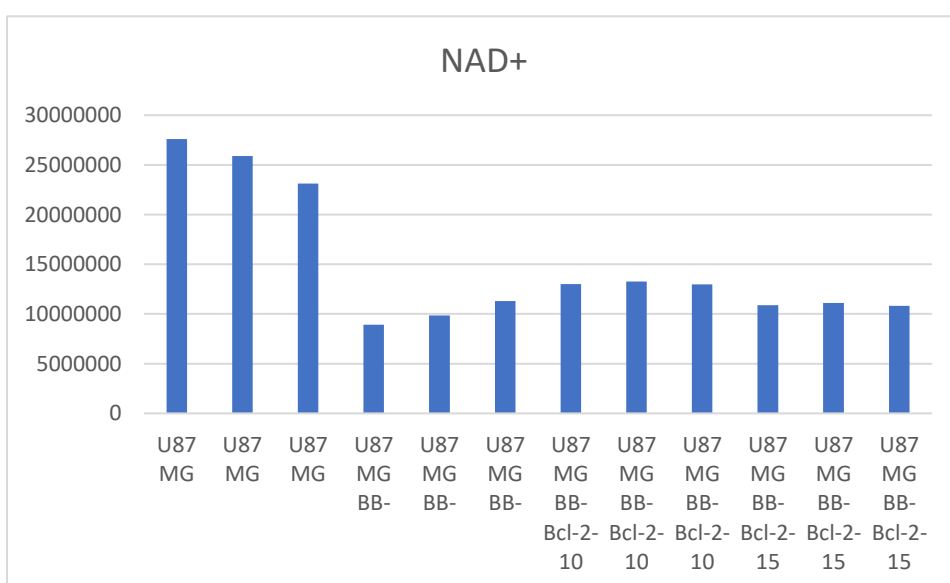
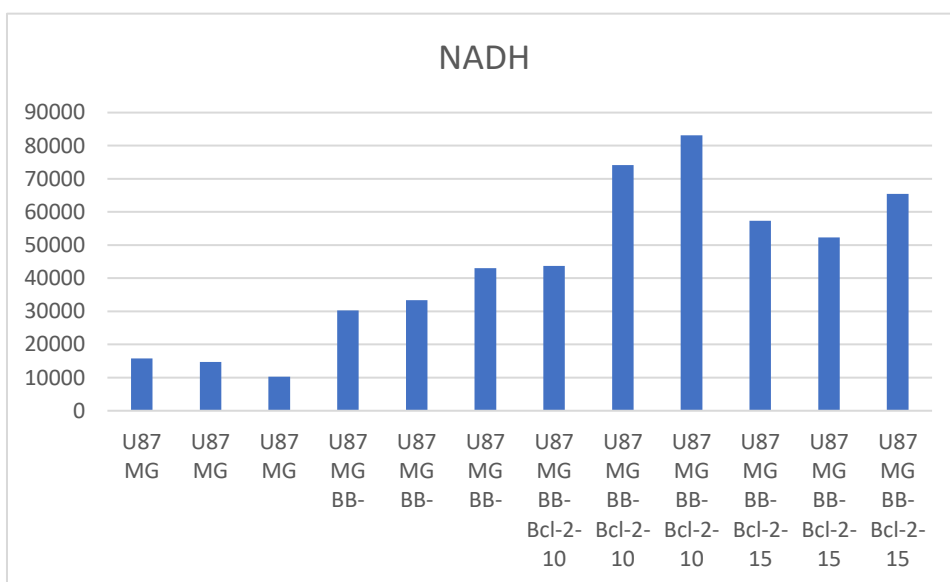
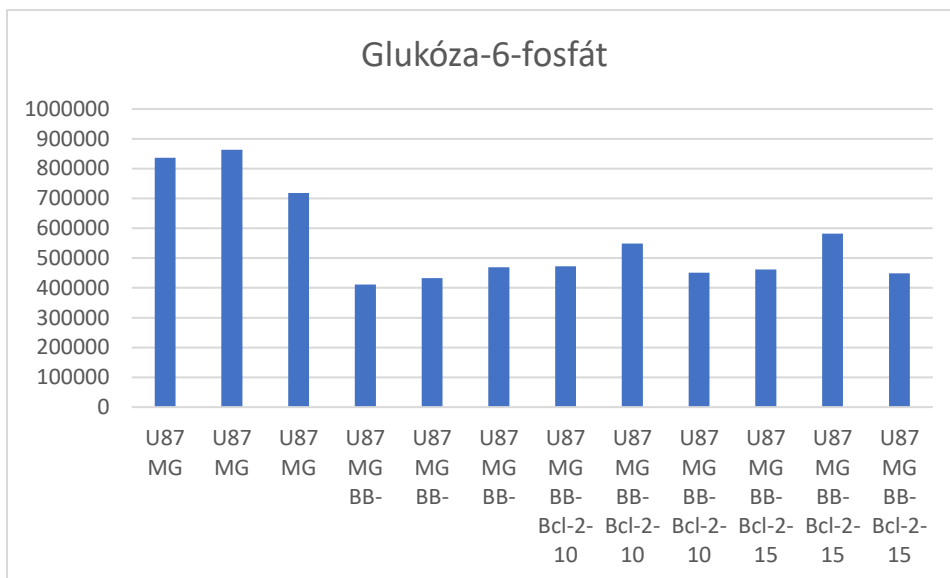
AAAAGGAAACCGAAACGAGTCAGTGTTATCTACAAGAGTAGAAATTCGAGAAGG
CCCGAGGTGCTCATGATCTACAAGAGTAGAAATTGCCGAGGCCTCCTTCTCCGTA
GC

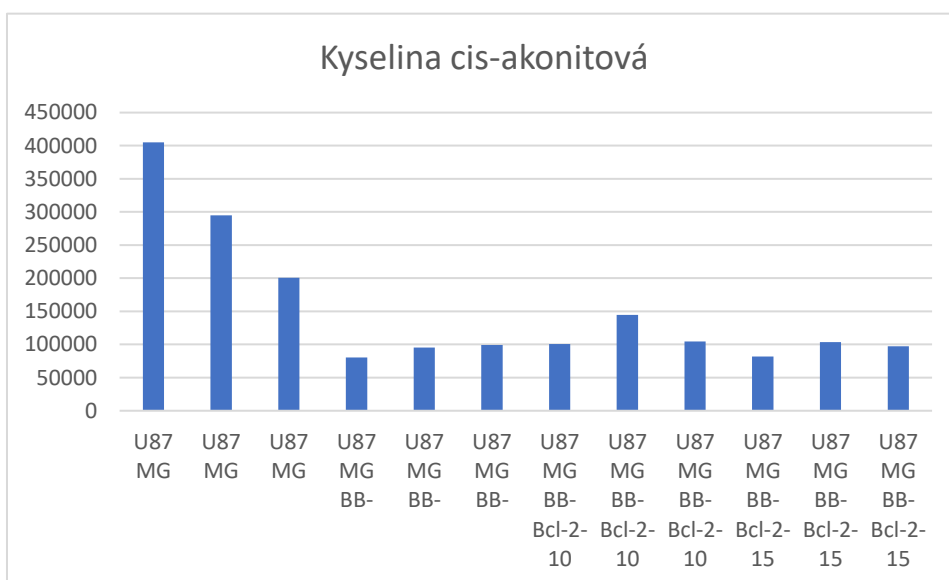
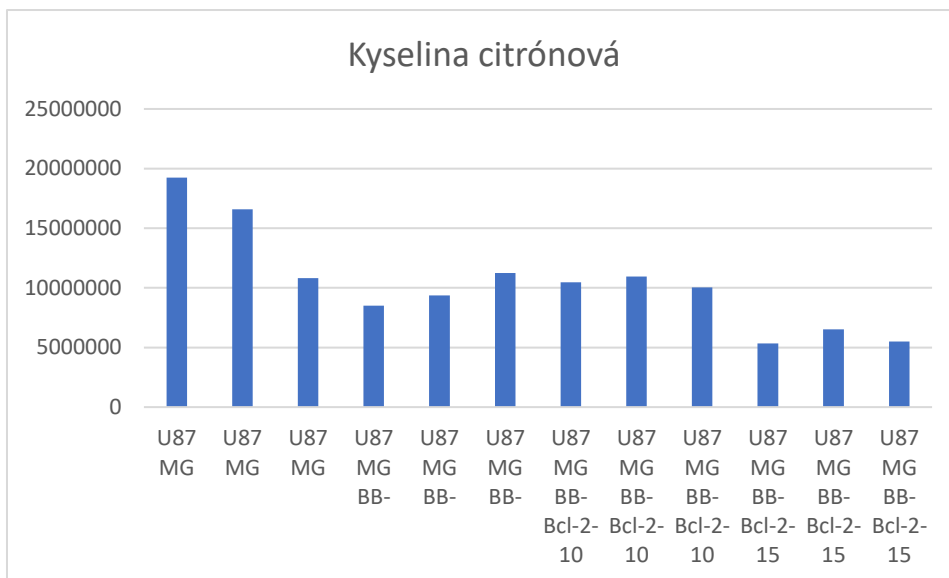
CCAC – spacer crRNAs cílí na vybrané exony či introny, AATT – repetitivní sekvence,
AAAA a AGAT – klonovací místa

8.3 Příloha 3

Níže uvádíme vybrané výsledky metabolomické analýzy vybraných buněčných linií, kterou pro nás provedla laboratoř OMICS a Proteomiky při ústavu BIOCEV pomocí kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie.







9 Seznam použité literatury

- *Banjara, S., Suraweera, C.D., Hinds, M.G. & Kvensakul, M. (2020). The Bcl-2 Family: Ancient Origins, Conserved Structures, and Divergent Mechanisms. *Biomolecules*, 10, 128.
- *D'Aguanno, S. & Del Bufalo, D. (2020). Inhibition of Anti-Apoptotic Bcl-2 Proteins in Preclinical and Clinical Studies: Current Overview in Cancer. *Cells*, 9, 1287.
- *Juárez-Salcedo, L.M., Desai, V. & Dalia, S. (2019). Venetoclax: evidence to date and clinical potential. *Drugs in context*, 8, 212574.
- *Kale, J., Osterlund, E.J. & Andrews, D.W. (2018). BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell death and differentiation*, 25, 65–80.
- *Kang, M.H. & Reynolds, C.P. (2009). Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 15, 1126–1132.
- *Kehr, S. & Vogler, M. (2021). It's time to die: BH3 mimetics in solid tumors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1868, 118987.
- *Lasica, M. & Anderson, M.A. (2021). Review of Venetoclax in CLL, AML and Multiple Myeloma. *Journal of personalized medicine*, 11, 463.
- *Molica, S. (2020). Venetoclax: a real game changer in treatment of chronic lymphocytic leukemia. *International journal of hematologic oncology*, 9, IJH31–IJH31.
- *Popgeorgiev, N., Jabbour, L. & Gillet, G. (2018). Subcellular Localization and Dynamics of the Bcl-2 Family of Proteins. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 6, 13.
- *Shamas-Din, A., Kale, J., Leber, B. & Andrews, D.W. (2013). Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5, a008714–a008714.

- *Vervliet, T., Clerix, E., Seitaj, B., Ivanova, H., Monaco, G. & Bultynck, G. (2017). Modulation of Ca(2+) Signaling by Anti-apoptotic B-Cell Lymphoma 2 Proteins at the Endoplasmic Reticulum-Mitochondrial Interface. *Frontiers in oncology*, 7, 75.
- *Yamaguchi, R., Lartigue, L. & Perkins, G. (2019). Targeting Mcl-1 and other Bcl-2 family member proteins in cancer therapy. *Pharmacology & Therapeutics*, 195, 13–20.
- Aharoni-Simon, M., Shumiatcher, R., Yeung, A., Shih, A.Z.L., Dolinsky, V.W., Doucette, C.A. & Luciani, D.S. (2016). Bcl-2 Regulates Reactive Oxygen Species Signaling and a Redox-Sensitive Mitochondrial Proton Leak in Mouse Pancreatic β -Cells. *Endocrinology*, 157, 2270–2281.
- Alavian, K.N., Li, H., Collis, L., Bonanni, L., Zeng, L., Sacchetti, S., Lazrove, E., Nabili, P., Flaherty, B., Graham, M., *et al.* (2011). Bcl-xL regulates metabolic efficiency of neurons through interaction with the mitochondrial F1FO ATP synthase. *Nature cell biology*, 13, 1224–1233.
- Belzacq, A.-S., Vieira, H.L.A., Verrier, F., Vandecasteele, G., Cohen, I., Prévost, M.-C., Larquet, E., Pariselli, F., Petit, P.X., Kahn, A., *et al.* (2003). Bcl-2 and Bax modulate adenine nucleotide translocase activity. *Cancer research*, 63, 541–546.
- Caria, S., Hinds, M.G. & Kvansakul, M. (2018). Structural insight into an evolutionarily ancient programmed cell death regulator – the crystal structure of marine sponge BHP2 bound to LB-Bak-2. *Cell Death & Disease*, 8, e2543–e2543.
- Carter, B.Z., Mak, P.Y., Tao, W., Warmoes, M., Lorenzi, P.L., Mak, D., Ruvolo, V., Tan, L., Cidado, J., Drew, L., *et al.* (2020). Targeting MCL-1 dysregulates cell metabolism and leukemia-stroma interactions and resensitizes acute myeloid leukemia to BCL-2 inhibition. *Haematologica*, Online ahe.
- Chen, R., Valencia, I., Zhong, F., McColl, K.S., Roderick, H.L., Bootman, M.D., Berridge, M.J., Conway, S.J., Holmes, A.B., Mignery, G.A., *et al.* (2004). Bcl-2 functionally interacts with inositol 1,4,5-trisphosphate receptors to regulate calcium release from the ER in response to inositol 1,4,5-trisphosphate. *The Journal of cell biology*, 166, 193–203.

- Chen, Y., Aon, M.A., Hsu, Y.-T., Soane, L., Teng, X., McCaffery, J.M., Cheng, W.-C., Qi, B., Li, H., Alavian, K.N., *et al.* (2011). Bcl-xL regulates mitochondrial energetics by stabilizing the inner membrane potential. *Journal of Cell Biology*, 195, 263–276.
- Chen, Z.X. & Pervaiz, S. (2007). Bcl-2 induces pro-oxidant state by engaging mitochondrial respiration in tumor cells. *Cell Death & Differentiation*, 14, 1617–1627.
- Chen, Z.X. & Pervaiz, S. (2010). Involvement of cytochrome c oxidase subunits Va and Vb in the regulation of cancer cell metabolism by Bcl-2. *Cell Death & Differentiation*, 17, 408–420.
- Du, X., Fu, X., Yao, K., Lan, Z., Xu, H., Cui, Q. & Yang, E. (2017). Bcl-2 delays cell cycle through mitochondrial ATP and ROS. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 16, 707–713.
- Escudero, S., Zaganjor, E., Lee, S., Mill, C.P., Morgan, A.M., Crawford, E.B., Chen, J., Wales, T.E., Mourtada, R., Luccarelli, J., *et al.* (2018). Dynamic Regulation of Long-Chain Fatty Acid Oxidation by a Noncanonical Interaction between the MCL-1 BH3 Helix and VLCAD. *Molecular Cell*, 69, 729-743.e7.
- Findley, H.W., Gu, L., Yeager, A.M. & Zhou, M. (1997). Expression and Regulation of Bcl-2, Bcl-xl, and Bax Correlate With p53 Status and Sensitivity to Apoptosis in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood*, 89, 2986–2993.
- Gotow, T., Shibata, M., Kanamori, S., Tokuno, O., Ohsawa, Y., Sato, N., Isahara, K., Yayoi, Y., Watanabe, T., Leterrier, J.F., *et al.* (2000). Selective localization of Bcl-2 to the inner mitochondrial and smooth endoplasmic reticulum membranes in mammalian cells. *Cell death and differentiation*, 7, 666–674.
- Vander Heiden, M.G., Chandel, N.S., Schumacker, P.T. & Thompson, C.B. (1999). Bcl-xL Prevents Cell Death following Growth Factor Withdrawal by Facilitating Mitochondrial ATP/ADP Exchange. *Molecular Cell*, 3, 159–167.

- Vander Heiden, M.G., Chandel, N.S., Williamson, E.K., Schumacker, P.T. & Thompson, C.B. (1997). Bcl-xL Regulates the Membrane Potential and Volume Homeostasis of Mitochondria. *Cell*, 91, 627–637.
- Vander Heiden, M.G., Li, X.X., Gottlieb, E., Hill, R.B., Thompson, C.B. & Colombini, M. (2001). Bcl-xl Promotes the Open Configuration of the Voltage-dependent Anion Channel and Metabolite Passage through the Outer Mitochondrial Membrane*. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 19414–19419.
- Hockenbery, D., Nuñez, G., Milliman, C., Schreiber, R.D. & Korsmeyer, S.J. (1990). Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature*, 348, 334–336.
- Imahashi, K., Schneider, M.D., Steenbergen, C. & Murphy, E. (2004). Transgenic Expression of Bcl-2 Modulates Energy Metabolism, Prevents Cytosolic Acidification During Ischemia, and Reduces Ischemia/Reperfusion Injury. *Circulation Research*, 95, 734–741.
- Jonas, E.A., Hoit, D., Hickman, J.A., Brandt, T.A., Polster, B.M., Fannjiang, Y., McCarthy, E., Montanez, M.K., Hardwick, J.M. & Kaczmarek, L.K. (2003). Modulation of synaptic transmission by the BCL-2 family protein BCL-xL. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 23, 8423–8431.
- Kaufmann, S.H., Karp, J.E., Svingen, P.A., Krajewski, S., Burke, P.J., Gore, S.D. & Reed, J.C. (1998). Elevated Expression of the Apoptotic Regulator Mcl-1 at the Time of Leukemic Relapse. *Blood*, 91, 991–1000.
- Kaufmann, T., Schlipf, S., Sanz, J., Neubert, K., Stein, R. & Borner, C. (2003). Characterization of the signal that directs Bcl-x(L), but not Bcl-2, to the mitochondrial outer membrane. *The Journal of cell biology*, 160, 53–64.
- Krajewski, S., Tanaka, S., Takayama, S., Schibler, M.J., Fenton, W. & Reed, J.C. (1993). Investigation of the Subcellular Distribution of the *bcl-2* Oncoprotein: Residence in the Nuclear Envelope, Endoplasmic Reticulum, and Outer Mitochondrial Membranes. *Cancer Research*, 53, 4701 LP – 4714.

- Lagadinou, E.D., Sach, A., Callahan, K., Rossi, R.M., Neering, S.J., Minhajuddin, M., Ashton, J.M., Pei, S., Grose, V., O'Dwyer, K.M., *et al.* (2013). BCL-2 inhibition targets oxidative phosphorylation and selectively eradicates quiescent human leukemia stem cells. *Cell stem cell*, 12, 329–341.
- Li, H., Alavian, K.N., Lazrove, E., Mehta, N., Jones, A., Zhang, P., Licznarski, P., Graham, M., Uo, T., Guo, J., *et al.* (2013). A Bcl-xL-Drp1 complex regulates synaptic vesicle membrane dynamics during endocytosis. *Nature cell biology*, 15, 773–785.
- Lu, W., Wang, L., Chen, L., Hui, S. & Rabinowitz, J.D. (2018). Extraction and Quantitation of Nicotinamide Adenine Dinucleotide Redox Cofactors. *Antioxidants & redox signaling*, 28, 167–179.
- Manfredi, G., Kwong, J.Q., Oca-Cossio, J.A., Woischnik, M., Gajewski, C.D., Martushova, K., D'Aurelio, M., Friedlich, A.L. & Moraes, C.T. (2003). BCL-2 improves oxidative phosphorylation and modulates adenine nucleotide translocation in mitochondria of cells harboring mutant mtDNA. *The Journal of biological chemistry*, 278, 5639–5645.
- Mann, J., Githaka, J.M., Buckland, T.W., Yang, N., Montpetit, R., Patel, N., Li, L., Baksh, S., Godbout, R., Lemieux, H., *et al.* (2019). Non-canonical BAD activity regulates breast cancer cell and tumor growth via 14-3-3 binding and mitochondrial metabolism. *Oncogene*, 38, 3325–3339.
- Morciano, G., Giorgi, C., Balestra, D., Marchi, S., Perrone, D., Pinotti, M. & Pinton, P. (2016). Mcl-1 involvement in mitochondrial dynamics is associated with apoptotic cell death. *Molecular biology of the cell*, 27, 20–34.
- Nakai, M., Takeda, A., Cleary, M.L. & Endo, T. (1993). The bcl-2 Protein Is Inserted into the Outer Membrane but Not into the Inner Membrane of Rat Liver Mitochondria in Vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 196, 233–239.

- Pegoraro, L., Palumbo, A., Erikson, J., Falda, M., Giovanazzo, B., Emanuel, B.S., Rovera, G., Nowell, P.C. & Croce, C.M. (1984). A 14;18 and an 8;14 chromosome translocation in a cell line derived from an acute B-cell leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81, 7166–7170.
- Perciavalle, R.M., Stewart, D.P., Koss, B., Lynch, J., Milasta, S., Bathina, M., Temirov, J., Cleland, M.M., Pelletier, S., Schuetz, J.D., *et al.* (2012). Anti-apoptotic MCL-1 localizes to the mitochondrial matrix and couples mitochondrial fusion to respiration. *Nature cell biology*, 14, 575–583.
- Plitzko, B., Kaweesa, E.N. & Loesgen, S. (2017). The natural product mensacarcin induces mitochondrial toxicity and apoptosis in melanoma cells. *The Journal of biological chemistry*, 292, 21102–21116.
- Plitzko, B. & Loesgen, S. (2018). Measurement of Oxygen Consumption Rate (OCR) and Extracellular Acidification Rate (ECAR) in Culture Cells for Assessment of the Energy Metabolism. *Bio-protocol*, 8, e2850.
- Rasmussen, M.L., Kline, L.A., Park, K.P., Ortolano, N.A., Romero-Morales, A.I., Anthony, C.C., Beckermann, K.E. & Gama, V. (2018). A Non-apoptotic Function of MCL-1 in Promoting Pluripotency and Modulating Mitochondrial Dynamics in Stem Cells. *Stem Cell Reports*, 10, 684–692.
- Rasmussen, M.L., Taneja, N., Neiningner, A.C., Wang, L., Robertson, G.L., Riffle, S.N., Shi, L., Knollmann, B.C., Burnette, D.T. & Gama, V. (2020). MCL-1 Inhibition by Selective BH3 Mimetics Disrupts Mitochondrial Dynamics Causing Loss of Viability and Functionality of Human Cardiomyocytes. *iScience*, 23, 101015.
- Shimizu, S., Narita, M., Tsujimoto, Y. & Tsujimoto, Y. (1999). Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature*, 399, 483–487.

- Veas-Pérez de Tudela, M., Delgado-Esteban, M., Maestre, C., Bobo-Jiménez, V., Jiménez-Blasco, D., Vecino, R., Bolaños, J.P. & Almeida, A. (2015). Regulation of Bcl-xL-ATP Synthase Interaction by Mitochondrial Cyclin B1-Cyclin-Dependent Kinase-1 Determines Neuronal Survival. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 35, 9287–9301.
- Velaithan, R., Kang, J., Hirpara, J.L., Loh, T., Goh, B.C., Le Bras, M., Brenner, C., Clement, M.-V. & Pervaiz, S. (2011). The small GTPase Rac1 is a novel binding partner of Bcl-2 and stabilizes its antiapoptotic activity. *Blood*, 117, 6214–6226.
- Wang, X., Bathina, M., Lynch, J., Koss, B., Calabrese, C., Frase, S., Schuetz, J.D., Rehg, J.E. & Opferman, J.T. (2013). Deletion of MCL-1 causes lethal cardiac failure and mitochondrial dysfunction. *Genes & development*, 27, 1351–1364.
- Wilkins, H.M., Marquardt, K., Lash, L.H. & Linseman, D.A. (2012). Bcl-2 is a novel interacting partner for the 2-oxoglutarate carrier and a key regulator of mitochondrial glutathione. *Free radical biology & medicine*, 52, 410–419.
- Xiong, L., Tang, Y., Liu, Z., Dai, J. & Wang, X. (2016). BCL-2 inhibition impairs mitochondrial function and targets oral tongue squamous cell carcinoma. *SpringerPlus*, 5, 1626.
- Yang, T., Kozopas, K.M. & Craig, R.W. (1995). The intracellular distribution and pattern of expression of Mcl-1 overlap with, but are not identical to, those of Bcl-2. *Journal of Cell Biology*, 128, 1173–1184.
- Yi, C.H., Pan, H., Seebacher, J., Jang, I.-H., Hyberts, S.G., Heffron, G.J., Heiden, M.G. Vander, Yang, R., Li, F., Locasale, J.W., *et al.* (2011). Metabolic Regulation of Protein N-Alpha-Acetylation by Bcl-xL Promotes Cell Survival. *Cell*, 146, 607–620.
- Zimmermann, A.K., Loucks, F.A., Schroeder, E.K., Bouchard, R.J., Tyler, K.L. & Linseman, D.A. (2007). Glutathione Binding to the Bcl-2 Homology-3 Domain Groove: A MOLECULAR BASIS FOR BCL-2 ANTIOXIDANT FUNCTION AT MITOCHONDRIA*. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 29296–29304.