

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Biochemie



Bc. Jan Blecha

Vliv proliferace endoteliálních buněk na jejich citlivost k mitochondriálně řízené apoptóze
a oxidačnímu stresu

The effect of endothelial cell proliferation on susceptibility to mitochondrially controlled
apoptosis and oxidative stress

Diplomová práce

Vedoucí práce/Školitel:

Mgr. Jakub Rohlena, Ph.D.

RNDr. Petr Novák, Ph.D.

Praha, 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci zpracoval samostatně pod vedením Mgr. Jakuba Rohleny Ph.D. 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, dne 20.04.2014

Podpis:

Úvodem bych rád poděkoval svému školiteli Mgr. Jakobovi Rohlenovi, Ph.D. za odborné metodické vedení, velkou podporu, pomoc a výjimečnou trpělivost v průběhu vyhotovení mé diplomové práce a také vedoucímu mé práce RNDr. Petru Novákovi, Ph.D. za ochotu a velmi vstřícný přístup. Můj velký dík patří také celému kolektivu Laboratoře molekulární terapie na BTÚ AV ČR za cenné rady a připomínky v experimentální části práce a za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

V neposlední řadě děkuji také své rodině a blízkým za velkou morální i finanční podporu při studiu.

ABSTRAKT

Mitochondrie jsou multifunkční organely hrající rozhodující roli v energetickém metabolismu buněk a v indukci buněčné smrti. Mitochondrie, a zvláště pak jejich respirační řetězec, jsou též hlavními producenty reaktivních forem kyslíku (ROS) v buňkách. Metabolismus buňky může být ovlivněn jejím proliferačním stavem. Zároveň určité látky zvyšující oxidační stres vykazují antiangiogenní účinky spojené se selektivní eliminací proliferujících endoteliálních buněk (EB). Z těchto důvodů jsme v této práci zjišťovali, zda by mitochondrie mohly být zodpovědné za rozdílnou citlivost proliferujících a konfluentních (buněk v klidové fázi) EB k buněčné smrti. Zvláštní důraz byl kladen na systémy regulující hladinu ROS nebo apoptózy: respirační řetězec (produkce ROS), antioxidační ochrana (detoxifikace ROS) a proteiny rodiny Bcl-2 (regulace apoptózy). Nejdříve jsme vystavili EB s normálně fungujícím a defektním respiračním řetězcem působení rozličných látek vyvolávajících oxidační stres a apoptózu a stanovili produkci ROS a citlivost k apoptóze v proliferujícím a klidovém stavu. Tyto experimenty ukázaly, že funkční respirační řetězec do značné míry zvyšuje citlivost proliferujících EB k indukci tvorby ROS a apoptóze, zatímco v buňkách v klidovém stavu funkční řetězec naopak proti buněčné smrti chrání. Vzhledem k tomuto pozorování jsme porovnali aktivitu respiračního řetězce v proliferujících a konfluentních EB. Proliferující EB mají vyšší spotřebu kyslíku, což se projevuje především při respiraci na substrátech pro respirační komplex I. Stanovení exprese proteinových podjednotek respiračních komplexů toto pozorování nevysvětlilo. Nativní elektroforéza ovšem ukázala, že vyšší molekulární organizace komplexů respiračního řetězce do tzv. superkomplexů se liší v mitochondriích proliferujících a konfluentních buněk s největšími rozdíly pozorovanými pro komplex III. Tyto výsledky byly potvrzeny stanovením enzymové aktivity respiračních superkomplexů v nativním gelu. Zkoumali jsme též roli důležitých antioxidačních systémů jako superoxid dismutasy a redukovaného glutathionu v proliferujících a konfluentních buňkách s funkčním a defektním respiračním řetězcem. Výsledky naznačují, že zkoumané systémy nehrají v sensitivitě k oxidačnímu stresu rozhodující roli. Stanovení hladiny proteinů rodiny Bcl-2 pak ukázalo, že tyto proteiny jsou exprimovány obdobně v proliferujících a konfluentních buňkách bez ohledu na funkčnost respiračního řetězce a pravděpodobně též nehrají významnou roli v detekovaných rozdílech v citlivosti k buněčné smrti. Lze tedy vyvodit, že zvýšená citlivost proliferujících EB k oxidačnímu stresu a k apoptóze je do značné míry určena stavem jejich respiračního řetězce, a mitochondrie tak hrají rozhodující roli v tomto fenoménu.

Klíčová slova: mitochondrie, oxidační stres, apoptóza, buněčná respirace, respirační řetězec, proliferace

ABSTRACT

Mitochondria are multifunctional organelles playing a key role in energy metabolism and cell death induction. Mitochondria, and specifically their respiratory chain, are also the main producers of reactive oxygen species (ROS) in cells. Metabolism can be affected by the state of cellular proliferation and certain ROS-inducing agents have an antiangiogenic effect based on the preferential elimination of proliferating endothelial cells (EC). Therefore, in this work we investigated, whether mitochondria could be responsible for different sensitivity of proliferation and confluent EC to cell death. We mainly focused on systems that regulate ROS level and apoptosis: respiratory chain (ROS production), antioxidant defense (ROS detoxification) and Bcl-2 family of proteins (apoptosis regulation). First, we treated EC with functional and nonfunctional respiratory chain with various oxidative stress- and apoptosis-inducing agents and determined ROS production and susceptibility to apoptosis in proliferating and confluent cells. Our results show that functional respiratory chain greatly increases the susceptibility of proliferating cells to ROS induction and apoptosis, whereas in quiescent cells it protects against cell death. Given these findings, we assessed the activity of respiratory chain in proliferating and quiescent EC and we found that proliferating cells consume more oxygen especially when respiring on complex I substrates. Expression of protein subunits of respiratory chain did not explain this observation. On the other hand, blue native electrophoresis showed that the supramolecular organisation of respiratory complexes to the so called supercomplexes is different in proliferating and confluent EC with the greatest differences for complex III. These results were confirmed by in-gel activity assay of respiratory supercomplexes. We also focused on the role of main antioxidant systems like superoxid dismutase and reduced glutathione in proliferating and confluent cells with functional and defective respiratory chain. However, obtained data suggest that these systems do not decisively regulate ROS levels and apoptosis in these settings. Determination of Bcl-2 family proteins showed that these proteins are expressed similarly in proliferating and quiescent cells irrespective of the respiratory chain functionality, so they are probably not responsible for differences in apoptosis susceptibility either. In conclusion, the increased susceptibility of proliferating EC to oxidative stress and apoptosis is to a large extent determined by the state of the respiratory chain state and thus, mitochondria play the decisive role in this phenomenon. (In Czech).

Key words: mitochondria, oxidative stress, apoptosis, cell respiration, respiratory chain, proliferation

Obsah

| | |
|--|----|
| ABSTRAKT | 1 |
| ABSTRACT | 3 |
| Obsah | 5 |
| Seznam použitých zkratek..... | 8 |
| 1. Úvod | 10 |
| 1.1. Mitochondrie a mitochondriální DNA..... | 13 |
| 1.1.1. Základní funkce mitochondrií..... | 13 |
| 1.1.2. Stavba mitochondrií | 14 |
| 1.2. Respirační řetězec | 15 |
| 1.2.1. Proteinové makromolekulární komplexy oxidační fosforylace..... | 16 |
| 1.2.1.1. <i>Komplex I</i> | 16 |
| 1.2.1.2. <i>Komplex II</i> | 17 |
| 1.2.1.3. <i>Komplex III</i> | 18 |
| 1.2.1.4. <i>Komplex IV</i> | 19 |
| 1.2.1.5. <i>ATP synthasa</i> | 20 |
| 1.2.2. Stechiometrie respiračních komplexů..... | 21 |
| 1.2.3. Dodatečné systémy respiračního řetězce | 21 |
| 1.3. pO buněčná linie | 21 |
| 1.4. Mitochondriální superkomplexy | 22 |
| 1.5. Tvorba reaktivních forem kyslíku | 24 |
| 1.5.1. Produkce superoxidu v dýchacím řetězci..... | 25 |
| 1.6. Antioxidační systémy | 27 |
| 1.6.1. Inaktivace superoxidu | 28 |
| 1.6.2. Inaktivace peroxidu vodíku | 28 |
| 1.7. Apoptóza | 31 |
| 1.7.1. Apoptóza iniciovaná oxidačním stresem..... | 31 |
| 1.7.2. PTP (pór přechodné permeabilizace mitochondriálních membrán)..... | 32 |
| 1.7.3. Mitokany – mediátory apoptózy cílené na mitochondrie a další apoptotická činidla .. | 34 |
| 1.8. Mitochondriální dynamika | 35 |
| 1.8.1. Splynutí (fúze) mitochondrií..... | 36 |
| 1.8.2. Fragmentace mitochondrií..... | 36 |
| 1.8.3. Dynamika mitochondrií během apoptózy..... | 37 |

| | | |
|---------|---|----|
| 1.9. | Warburgův efekt: Mitochondriální kontrola buněčné proliferace | 37 |
| 1.10. | Buněčný cyklus | 38 |
| 2. | Cíl práce | 40 |
| 3. | Materiál | 41 |
| 3.1. | Chemikálie | 41 |
| 3.2. | Protilátky | 43 |
| 3.2.1. | Primární protilátky | 43 |
| 3.2.2. | Sekundární protilátky | 43 |
| 3.3. | Média | 44 |
| 3.4. | Pufry | 45 |
| 3.5. | Gely | 47 |
| 4. | Metody | 48 |
| 4.1. | Kultivace buněk | 48 |
| 4.2. | Trypsinizace buněk | 48 |
| 4.3. | Počítání buněk | 48 |
| 4.4. | Příprava buněčné linie p0 | 48 |
| 4.5. | Příprava buněk na měření apoptózy, produkce ROS (...) | 49 |
| 4.6. | Detekce tvorby intracelulárních ROS | 49 |
| 4.7. | Detekce apoptózy | 51 |
| 4.8. | Měření respirace | 53 |
| 4.8.1. | Měření respirace na permeabilizovaných buňkách | 54 |
| 4.8.2. | Měření respirace na nepermeabilizovaných buňkách | 54 |
| 4.8.3. | Měření respirace čerstvě izolovaných mitochondrií | 54 |
| 4.9. | Detekce exprese proteinů | 56 |
| 4.9.1. | Příprava vzorků | 56 |
| 4.9.2. | SDS–Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (SDS–Page) | 57 |
| 4.9.3. | „Western–blot“ (Přenos proteinů na nitrocelulózovou membránu) | 57 |
| 4.9.4. | Inkubace a vyhodnocení membrány | 57 |
| 4.9.5. | Znovupoužití membrány | 58 |
| 4.10. | Modrá nativní elektroforéza (BNE) | 58 |
| 4.10.1. | Příprava nativních vzorků | 58 |
| 4.10.2. | Elektroforéza | 59 |
| 4.10.3. | „Western–blot“ | 59 |

| | | |
|---------|---|----|
| 4.11. | Stanovení aktivity mitochondriálních respiračních komplexů (hr-CNE)..... | 60 |
| 4.11.1. | Elektroforéza | 60 |
| 4.11.2. | Katalytická aktivita v gelu..... | 60 |
| 4.12. | Stanovení redukováného glutathionu..... | 61 |
| 4.13. | Stanovení fáze buněčného cyklu..... | 61 |
| 4.14. | Stanovení příjmu glukózy | 62 |
| 4.15. | Stanovení produkce laktátu | 63 |
| 4.16. | Studium morfologie mitochondrií..... | 64 |
| 5. | Výsledky | 65 |
| 5.1. | Experimentální model | 65 |
| 5.2. | Produkce ROS buňkami Ea.hy926 | 66 |
| 5.3. | Indukce apoptózy v buňkách Ea.hy926..... | 67 |
| 5.4. | Produkce ROS buňkami p0..... | 69 |
| 5.5. | Indukce apoptózy v buňkách p0..... | 70 |
| 5.6. | Respirace permeabilizovaných buněk..... | 72 |
| 5.7. | Respirace izolovaných mitochondrií | 73 |
| 5.8. | Expres proteinových podjednotek mitochondriálních respiračních komplexů | 74 |
| 5.9. | Skladba mitochondriálních superkomplexů..... | 74 |
| 5.10. | Nativní elektroforéza aktivity v gelu | 76 |
| 5.11. | Antioxidační systémy | 76 |
| 5.12. | Buněčný cyklus v buňkách s funkčním a defektním respiračním řetězcem..... | 77 |
| 5.13. | Aktivita buněčné glykolýzy..... | 78 |
| 5.14. | Morfologie mitochondrií..... | 79 |
| 5.15. | Kvantifikace exprese Bcl-2 proteinů..... | 81 |
| 6. | Diskuze | 82 |
| 7. | Závěr..... | 87 |
| | Reference | 88 |

Seznam použitých zkratek

| | |
|------------------------|--|
| 2-NBDG | 2-(N-(7-nitrobenz-2-oxo-1,3-diazol-4-yl)amino)-2-deoxyglukóza |
| ADP | adenosindifosfát |
| ATP | adenosintrifosfát |
| BH | Bcl-2 homologní doména |
| Bisacrylamide | N,N'-methylen-bis-akrylamid |
| Bistris | 2-bis(2-hydroxyethyl)amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol |
| BNE | modrá nativní elektroforéza (z angl. <i>Blue Native Electrophoresis</i>) |
| BSA | hovězí sérový albumin (z angl. <i>Bovine Serum Albumin</i>) |
| CI | komplex I (z angl. <i>Complex I</i>) |
| CII | komplex II (z angl. <i>Complex II</i>) |
| CIII | komplex III (z angl. <i>Complex III</i>) |
| CIV | komplex IV (z angl. <i>Complex IV</i>) |
| CoQ | koenzym Q (ubichinon) |
| CoQH2 | redukovaný koenzym Q (ubichinol) |
| cyt c | cytochrom c |
| DAB | tetrahydrochlorid-3,3'-diaminobenzidin |
| dH₂O | destilovaná voda |
| DCH2F-DA/DCF | dichlorodihydrofluorescein diacetát/dichlorodihydrofluorescein |
| DMEM | kultivační médium (z angl. <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>) |
| DMSO | dimethylsulfoxid |
| DR | receptor smrti (z angl. <i>death receptor</i>) |
| EB | endoteliální buňky |
| EC | endoteliální buňky (z angl. <i>Endothelial Cells</i>) |
| EDTA | kyselina ethylendiamintetraoctová (Chelaton 2) |
| EGTA | kyselina ethylenglykoltetraoctová |
| EtBr | ethidium bromid |
| ETC | elektrontransportní řetězec (z angl. <i>Electron Transport Chain</i>) |
| EtOH | ethanol |
| FAD/FADH2 | flavinadenindinukleotid |
| FBS | fetální hovězí sérum (z angl. <i>Fetal Bovine Serum</i>) |
| FCCP | 4-(trifluoromethoxy)karbonylkyanid fenylylhydrazon |
| FITC | fluoresceinizothiokyanát |
| FMN | flavinmononukleotid |
| GPx | glutathion peroxidasa |
| GSH | glutathion |
| GSSG | disulfid glutathionu |
| GTP | guanosintrifosfát |
| HAT | hypoxantin, aminopterin, thymidin |
| HEPES | 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonová kyselina |
| hr-CNE | čirá nativní elektroforéza s vysokým rozlišením (z angl. <i>High Resolution-Clear Native Electrophoresis</i>) |
| IBc | pufir pro izolaci mitochondrií (z angl. <i>Isolation Buffer</i>) |
| IMM | vnitřní mitochondriální membrána (z angl. <i>Inner Mitochondrial Membrane</i>) |
| IMS | mezimembránový prostor (z angl. <i>Intermembrane Space</i>) |
| MAPK | MAP kinasa (z angl. <i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>) |
| MCB | monochlorobiman |
| MeOH | methanol |

| | |
|-----------------------------|--|
| MFN | mitofuzin |
| MIR | respirační médium pro mitochondrie (z angl. <i>Mitochondrial Respiration Medium</i>) |
| MitoVES | mitochondriálně cílený vitamin E sukcinát |
| MOPS | 3-(N-morfolino)propansulfonová kyselina |
| mtDNA | mitochondriální DNA |
| NAD⁺/NADH | nikotinamidadenindinukleotid |
| NOS | NO synthasa |
| NTB | 2,2'-bis(4-nitrofenyl)-5,5'-difenyl-3,3'-(3,3'-dimethoxy-4,4'-difenylene)ditetrazolium chlorid (z angl. <i>Nitrotetrazolium Blue</i>) |
| OMM | vnější mitochondriální membrána (z angl. <i>Outer Mitochondrial Membrane</i>) |
| OXPHOS | oxidační fosforylace (z angl. <i>Oxidative Phosphorylation</i>) |
| PAGE | elektroforéza v polyakrylamidové gelu (z angl. <i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>) |
| PBS | pufrovaný fyziologický roztok (z angl. <i>Phosphate Buffered Saline</i>) |
| PE | extrakční pufr |
| PEITC | fenethylizothiokyanát (z angl. <i>Phenethyl Isothiocyanate</i>) |
| Pi | anorganický fosfát (z angl. <i>Inorganic Phosphate</i>) |
| PI | propidium jodid (z angl. <i>Propidium Iodide</i>) |
| PIC | směs proteasových inhibitorů (z angl. <i>Protease Inhibitor Cocktail</i>) |
| Prx | peroxiredoxin |
| PS | fosfatidylserin (z angl. <i>Phosphatidyl Serine</i>) |
| PTP | pór přechodné permeabilizace (z angl. <i>Permeability Transition Pore</i>) |
| RIPA | pufr pro radioimunoprecipitační test (z angl. <i>Radioimmunoprecipitation Assay Buffer</i>) |
| RNOS | reaktivní formy oxidu dusíku (z angl. <i>Reactive Nitrogen-Oxygen Species</i>) |
| ROS | reaktivní formy kyslíku (z angl. <i>Reactive Oxygen Species</i>) |
| SC | respirační superkomplex/y (z angl. <i>Super Complexes</i>) |
| SDS | dodecylsírán sodný (z angl. <i>Sodium Dodecyl Sulphate</i>) |
| SLB | vzorkový nanášecí pufr (z angl. <i>Sample Loading Buffer</i>) |
| SOD | superoxiddismutasa |
| STE | pufr na přípravu buněčných frakcí (z angl. <i>Sucrose-Tris-EDTA Buffer</i>) |
| TBS | tris(hydroxymethyl)aminomethanový pufr (z angl. <i>Tris Buffered Saline</i>) |
| TEMED | N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin |
| TMRM | tetramethylrhodamin methylester |
| Tris | 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol |
| TRX | thioredoxin |
| TRX-SH/TRX-SS | thioredoxin redukovaný/oxidovaný |
| Tween | polyoxyethylensorbitanmonolaurát |
| WB | metoda přenosu proteinu z gelu na nitrocelulóзовou membránu (z angl. <i>Western Blot</i>) |
| α-TOS | α-tokoferylsukcinát |

1. Úvod

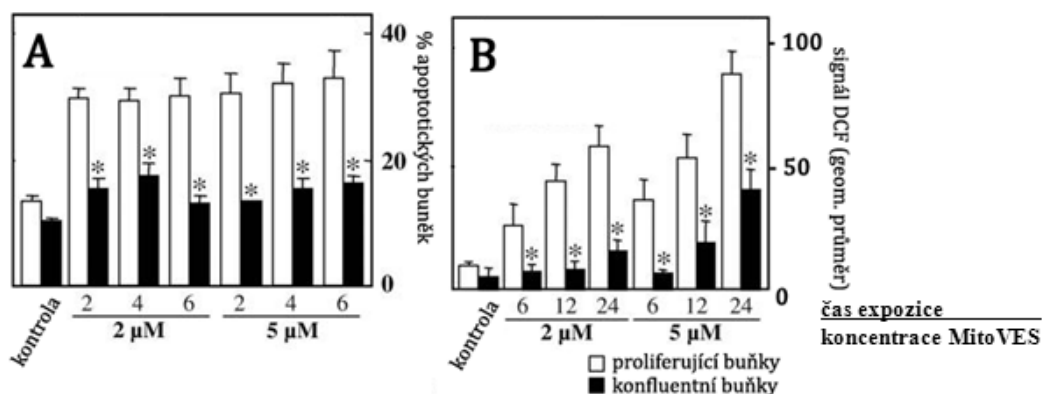
Většina buněk se v organismu nachází v diferenciovaném, klidovém stavu, ve kterém neproliferují a nedělí se. Menšina buněk, které se aktivně dělí a proliferují, je velmi důležitá v procesech obnovování (např. krevní buňky jako erytrocyty a leukocyty prochází relativně častou obnovou) a hojení, ale též v patologických procesech jako např. při vzniku rakoviny, kdy dochází k deregulaci buněčného růstu. Již relativně dlouho je známo, že nerakovinné proliferující buňky jsou více než buňky v klidovém stavu náchylné k indukci buněčné smrti, tzv. apoptózy. Překvapivě důvody této zvýšené citlivosti jsou z velké části nejasné. Apoptóza je programovaná buněčná smrt nepostradatelná pro správný vývoj mnohobuněčných organismů. Je přísně regulována na mnoha úrovních a poškození její kontroly vede k těžkým onemocněním a karcinogenezi. Na druhou stranu je apoptóza jedním z prostředků, jak může být nádorové bujení potlačeno. Mnohá klinicky využívaná protirakovinná léčiva ji selektivně v nádorových buňkách vyvolávají, a proto je důležité porozumět jejím molekulárním mechanismům a identifikovat faktory, které ovlivňují apoptotickou citlivost a regulaci. Obzvláště důležitou součástí tohoto mechanismu je vztah mezi buněčnou proliferací a apoptotickou senzitivitou, který není zcela objasněn, ačkoliv může být důležitý nejenom pro vývoj nových specifitějších protinádorových léčiv, ale i pro potlačení vedlejších účinků těchto léčiv na nerakovinné buňky.

Jedním z procesů, kdy proliferace buněk, v tomto případě endoteliálních buněk, hraje důležitou roli, je tvorba nových cév, tzv. angiogeneze. Angiogeneze bývá často „zneužitá“ rostoucím nádorem k zajištění dostatečného zásobování kyslíkem a živinami, hraje proto důležitou roli při vzniku rakoviny. V organismu jsou endoteliální buňky převážně v klidové fázi, kdy tvoří epitel na stěnách cév a jsou v kontaktní inhibici ve stavu tzv. konfluence. Vyvíjející se nádor vystavený nedostatku kyslíku tzv. hypoxii ovšem produkuje růstové faktory jako např. VEGF, které vybudí endoteliální buňky z jejich klidové fáze a nutí je k tvorbě nových cév, což zahrnuje jejich proliferaci a migraci [1]. V nádorovém endotelu se tak nachází vysoké procento mobilizovaných proliferujících endoteliálních buněk, zatímco v normálním endotelu jsou buňky převážně v klidovém, konfluentním stavu s mnoha mezibuněčnými spoji (v $G_{1/0}$ fázi buněčného cyklu, viz níže) [2; 3].

Inhibice nádorové angiogeneze je již dlouhou dobu považována za perspektivní způsob potlačení rakovinného bujení. V současnosti je hlavním přístupem neutralizace proangiogenních růstových faktorů použitím specifických protilátek proti VEGF, nebo nízkomolekulárních inhibitorů tyrozinových kinas cílových receptorů endoteliálních buněk.

Při této léčbě ovšem často dochází k postupnému snižování účinku léčby, které je pravděpodobně způsobeno přechodem na alternativní proangiogenní signalizaci [4]. Důležité nicméně je, že ve fázi, kdy inhibitory růstových faktorů jsou ještě efektivní, vyvolávají v angiogenních endoteliálních buňkách apoptózu [5]. Přímé vyvolání apoptózy alternativní cestou vyhýbající se problému vznikající rezistence v proliferujících endoteliálních buňkách tak skrývá velký potenciál pro vývoj protinádorových léčiv. Kromě toho jsou endoteliální buňky pro protinádorovou léčbu stabilní cíl, jelikož bývají tělu vlastní a nepozměněné.

Jelikož klíčovou organelou v iniciaci apoptózy jsou mitochondrie (popsané níže), velice perspektivní jsou tzv. mitokany neboli látky, které vyvolávají apoptózu (obzvláště rakovinných buněk) přímým cílením mitochondriálních reakcí a komponent. Mitokany iniciovaná apoptóza je často způsobena oxidačním stresem, který je důsledkem zvýšené hladiny reaktivních forem kyslíku (ROS) [6]. Mitochondrie jsou nejvýznamnějšími producenty ROS v buňce (viz dále) a tak jejich cílení představuje perspektivní směr dalšího vývoje látek s protirakovinným účinkem. Mitochondrie jsou zároveň nedílnou součástí buněčného metabolismu, který je značně ovlivněn stavem buněčné proliferace [7]. Jako pravděpodobné se tak jeví to, že se mitochondrie v proliferujících buňkách a v buňkách v klidovém stavu mohou lišit. Cílení mitochondrií by tak mohlo selektivně eliminovat buňky na základě jejich proliferačního stavu. Jedním ze slibných mitokanů pro klinickou aplikaci je derivát vitamínu E (α -tokoferyl sukcinát, α -TOS) a jeho účinnější analog MitoVES (derivát α -TOS s připojenou trifenylyfosfoniovou skupinou pro specifické cílení do vnitřní mitochondriální membrány). Předchozí práce ukázaly, že tato mitochondriálně cílená látka vykazuje výrazný antiangiogenní účinek *in vivo*, spojený se zvýšenou proapoptotickou aktivitou v proliferujících endoteliálních buňkách. Toto pravděpodobně souvisí se zvýšenou tvorbou ROS v proliferujícím stavu [2] (Obr. 1, str. 12). MitoVES též vykazuje přímý protinádorový efekt, který souvisí se selektivní indukcí oxidačního stresu v mitochondriích a je závislý na přítomnosti mitochondriálního respiračního komplexu II [8]. Podobné účinky na endoteliální buňky jako MitoVES má i 4-(N-(S-glutathiolylacetyl)amino)fenylarsenoxid [9], který taktéž způsobuje oxidační stres v proliferujících endoteliálních buňkách, což naznačuje, že proliferující endoteliální buňky by mohly mít odlišné mitochondrie od buněk neproliferujících. Odlišnosti mitochondrií by tak mohly způsobit jejich vyšší senzitivitu k činidlům, které vyvolávají oxidační stres.



Obr. 1 – Citlivost konfluentních a proliferujících (50 % konfluente) buněk Ea.hy926 k apoptóze (A) a produkci ROS (B) zprostředkované působením MitoVES. Pro detekci apoptózy byly buňky značeny Annexinem V a propidium jodidem (vyhodnoceno jako buňky pozitivní na Annexin V a/nebo propidium jodid) a pro určení míry produkce ROS 2,7–dihydrodichlorofluoresceindiacetátem (DCF), vyhodnoceno na geometrický průměr signálu DCF. * – statisticky signifikantní rozdíl mezi proliferujícími a konfluentními dle T–testu. $P < 0,05$. Upraveno dle [2]

Několik pravděpodobných důvodů by mohlo vést k rozdílu mezi mitochondriemi proliferujících a konfluentních buněk, a tudíž ke změnám v citlivosti k oxidačnímu stresu. V první řadě by mohlo jít o jiné uspořádání dýchacího řetězce (viz dále), které by vedlo k vyšší produkci ROS v proliferujících buňkách. Dalším důvodem by mohla být slabší antioxidační kapacita proliferujících buněk, třetím pak citlivější apoptotický aparát, kdy stejné množství ROS v proliferujících nebo konfluentních buňkách by vedlo k rozdílné indukci buněčné smrti. Kombinace několika těchto důvodů je též možná. Z toho důvodu jsme se rozhodli důkladně prozkoumat reakci proliferujících a konfluentních endoteliálních buněk na různá proapoptotická činidla, která vyvolávají oxidační stres, a taktéž popsat základní mitochondriální charakteristiky těchto proliferujících a konfluentních buněk.

1.1. Mitochondrie a mitochondriální DNA

Mitochondrie jsou multifunkční dvoumembránové organely, které se nachází ve všech eukaryotických buňkách. Mezi nejdůležitější z mnoha jejich funkcí patří produkce makroergního adenosintrifosfátu (ATP) pro zásobování buňky energií a regulace programované buněčné smrti, apoptózy.

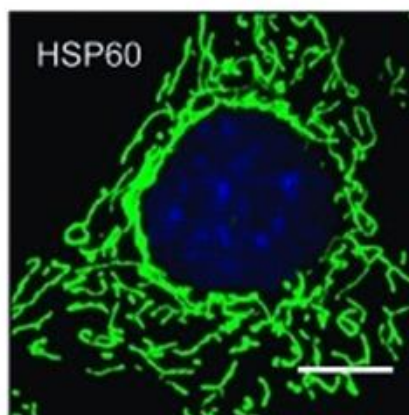
Mitochondrie, jak je dnes známe u savčích buněk, vznikly před více než 1,45 miliardy let pravděpodobně endocytózou fakultativně anaerobní bakterie bakterií anaerobní. Jako pozůstatek této události si mitochondrie jako jediné organely v savčích buňkách nesou část své genetické informace na vlastní mitochondriální DNA (mtDNA). Přestože většinu genetické informace postupem doby převzala jaderná DNA (jedná se o více než 1000 genů mitochondriálně lokalizovaných proteinů), 13 důležitých proteinů pro buněčnou respiraci spolu s geny pro transferové a ribozomální RNA zůstalo kódováno mitochondriální DNA [10].

Dnes jsou popsány čtyři druhy mitochondrií. Dva druhy tvoří netypické mitochondrie, které do energetického metabolismu buněk nezasahují – mitozomy, což jsou malé mitochondriální „pozůstatky“ nalezené u *mikrosporidií* [11; 12], a hydrogenozomy anaerobních eukaryot (protist) [13]. Zbylé dva druhy, anaerobní a aerobní mitochondrie, jsou významnými producenty ATP pro organismus. Anaerobní mitochondrie umožňují parazitickým hlístům (motolice jaterní, škrkavka) získávat ATP v anaerobním prostředí [14]. Aerobní mitochondrie, které jsou nejobvyklejším typem mitochondrií, lze nalézt u všech fakultativně anaerobně nebo aerobně žijících organismů včetně savců. Aerobní mitochondrie budou podrobněji rozebrány dále v textu.

1.1.1. Základní funkce mitochondrií

Jak je uvedeno výše, mitochondrie mají v eukaryotickém organismu nezastupitelnou funkci. Regulují a spouští programovanou buněčnou smrt [15; 16], jsou nejvýznamnějším producentem makroergního ATP [17] a reoxidovaných koenzymů pro buňku, stejně jako velmi významným účastníkem v nejdůležitějších metabolických procesech – syntéze, metabolismu a odbourávání mastných kyselin (β -oxidace), metabolismu steroidů, citrátovém cyklu, močovinovém cyklu či metabolismu aminokyselin. Mitochondrie se též podílí na regulaci zásob Ca^{2+} , jsou místem biosyntézy [Fe-S] proteinů, zasahují do signálních drah a jsou zdrojem signálních molekul (ROS) a metabolitů, jako je citrát a sukcinát. Mitochondrie jsou zapojeny též do regulace buněčné proliferace a buněčného cyklu [18]. Mitochondrie jakožto dynamické struktury plní významnou úlohu také v přizpůsobování organismu

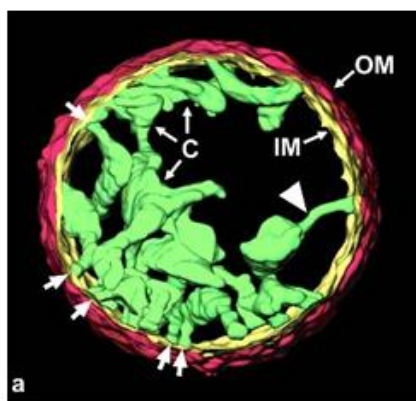
měnícím se vnějším podmínkám, jako např. dostupnosti živin. Mitochondriální dynamika, tedy změna členitosti, tvaru a délky mitochondrií (Obr. 2), je považována za mechanismus bioenergetické adaptace na měnící se metabolické požadavky buňky [19; 20].



Obr. 2 – Mitochondrie myších embryonálních fibroblastů značené protilátkou proti mitochondriálnímu proteinu HSP60 (zelená fluorescence), modře je značené buněčné jádro. Měřítko 10 μm . Převzato z [21].

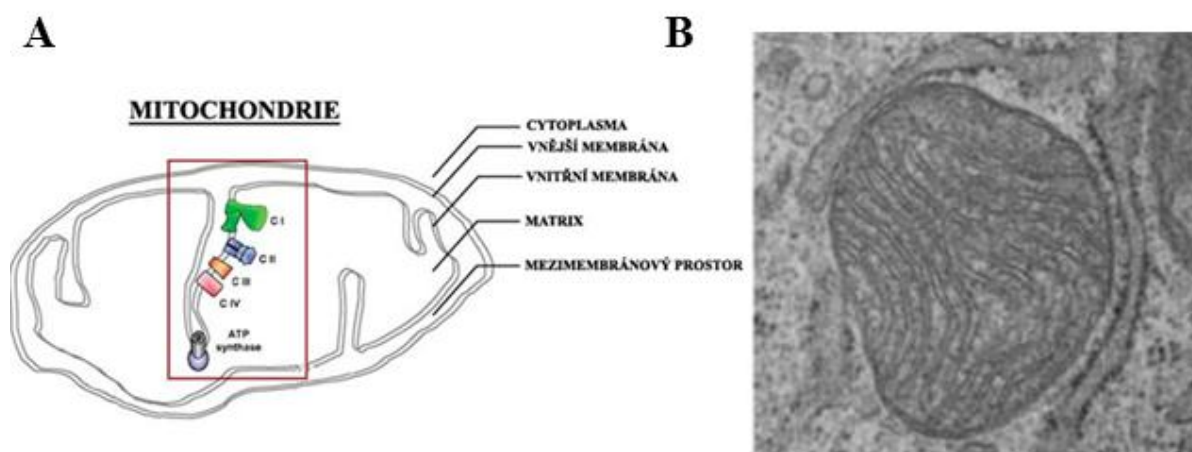
1.1.2. Stavba mitochondrií

Mitochondrie je ohraničena dvěma membránami, vnější (OMM) a vnitřní (IMM), které mezi sebou vytvářejí mezimembránový prostor (IMS), viz Obr. 3, 4, str. 15. Vnější mitochondriální membrána je značně pórovitá a složením velmi podobná membráně endoplazmatického retikula. Do této membrány jsou vnořeny proteinové přenašeče, které zprostředkovávají transport proteinů z cytoplazmy (TOM), regulační apoptotické proteiny superrodiny Bcl-2, oxidasy a napěťově řízené aniontové kanály (VDAC) [22]. Vnitřní membrána je specifická pro mitochondrie. Kromě přenašečových proteinů jsou v IMM lokalizované všechny enzymy buněčné respirace včetně fluidních přenašečů. IMM tvoří na mnoha místech takzvané kristy, vchlípeniny do vnitřního prostoru mitochondrie, které mnohonásobně zvětšují plochu této membrány, a umožňují tak umístění komplexů dýchacího řetězce a ATP synthas. Prostor uvnitř IMM je vyplněn mitochondriální „cytoplazmou“, označovanou jako matrix.



Obr. 3 – Řez mitochondrií vizualizovaný pomocí elektronové tomografie. OM – vnější mitochondriální membrána, IM – vnitřní mitochondriální membrána, C – kristy, bílé šípky bez popisek vyústění krist do mezimembránového prostoru. Převzato z [23].

V matrix se nachází enzymy oxidačního zpracování pyruvátu, většina enzymů citrátového cyklu a β -oxidace mastných kyselin. V matrix jsou také rozpuštěné malé molekuly (např. O_2 , CO_2 nebo Ca^{2+}), recyklovatelné meziprodukty metabolických drah a biomakromolekuly např. mitochondriální ribozomy a mtDNA.



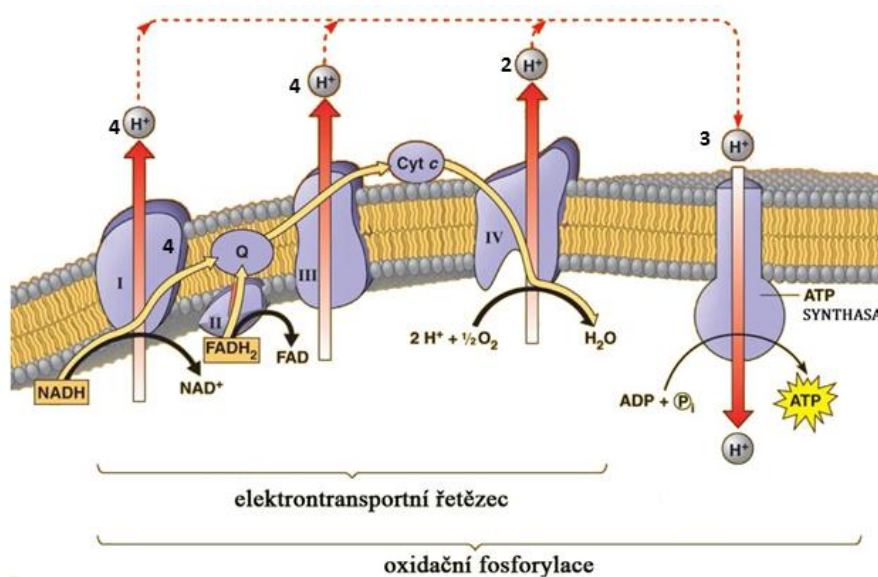
Obr. 4 – **A)** Ilustrační zobrazení struktury mitochondrie s umístěním komplexů OXPHOS (CI až CIV a ATP synthasa). Upraveno dle [24].

B) Snímek mitochondrie fixované lidské endoteliální buňky Ea.hy926 pořízený elektronovou transmisí mikroskopií. Převzato z [2].

1.2. Respirační řetězec

Pro produkci velkého množství ATP je vnitřní membrána mitochondrií vybavena komplexy elektrontransportního řetězce (ETC), též respiračního řetězce, které vytváří na IMM protonový gradient. Hnací silou tohoto systému je reoxidace redukováných kofaktorů flavinadenindinukleotidu ($FADH_2$) a nikotinamadenindinukleotidu (NADH), které vznikají při oxidačním zpracování mastných kyselin, sacharidů a aminokyselin v citrátovém cyklu. Dýchací řetězec se skládá ze 4 multiproteinových enzymových komplexů: komplex I

(NADH:ubichinon oxidoreduktasa), komplex II (sukcinát:ubichinon oxidoreduktasa), komplex III (ubichinon:cytochrom *c* oxidoreduktasa) a komplex IV (cytochrom *c* oxidasa). Transport elektronů skrze jednotlivá redoxní centra komplexů ve směru zvyšujícího se redoxního potenciálu poskytuje energii pro přenos protonů z mitochondriální matrix do mezimembránového prostoru. Pomocí komplexu I, III a IV je tak vytvářen protonový gradient na vnitřní mitochondriální membráně. Vzniklý elektrochemický membránový potenciál ($\Delta\psi_{H^+}$) o velikosti 200 až 250 mV následně pohání F_1F_0 ATP syntasou, která dokončuje oxidační fosforylaci (OXPHOS) fosforylací adenosindifosfátu (ADP) na ATP [25]. Oxidační fosforylaci zjednodušeně ukazuje Obr. 5.



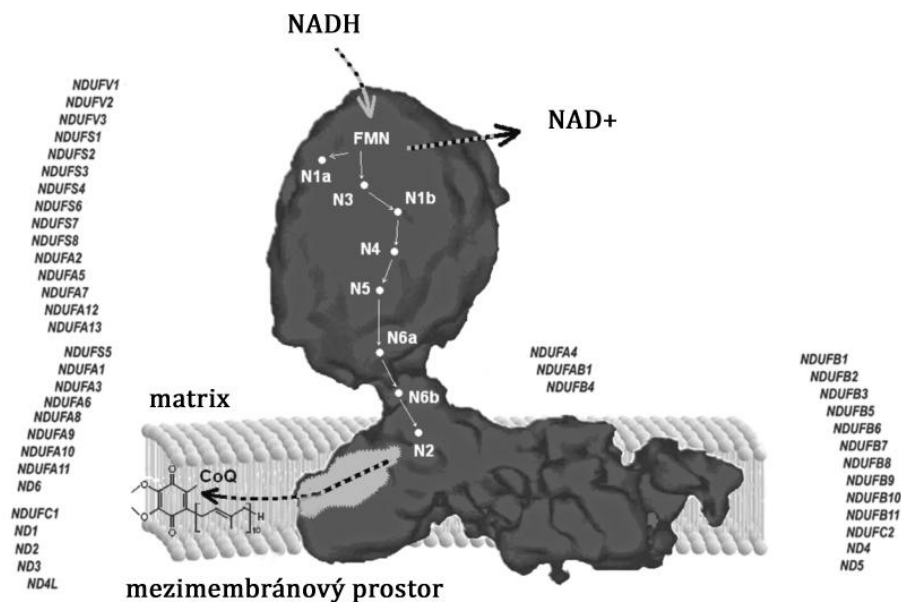
Obr. 5 – Komplexy oxidační fosforylace. Přenos elektronu je naznačen běžovými šipkami, přenos protonů červenými. I až IV – Komplex I až IV, Q – ubichinon, cyt *c* – cytochrom *c*. Upraveno dle [26].

1.2.1. Proteinové makromolekulární komplexy oxidační fosforylace

1.2.1.1. Komplex I

Komplex I (NADH:ubichinon oxidoreduktasa, EC 1.6.5.3, CI), Obr. 6, str. 17, je největším komplexem OXPHOS o přibližné velikosti 1 MDa. Obsahuje 39 až 44 proteinových podjednotek, přesné číslo je stále předmětem diskuze, z nichž 7 je kódovaných mtDNA [24; 27]. Mitochondriálně kódované podjednotky ND1 až ND6 a ND4L mají hydrofobní charakter a tvoří membránovou část komplexu. Kromě proteinových podjednotek obsahuje komplex I nekovalentně vázaný flavinmononukleotid (FMN) a 8 [Fe–S] redoxních center. Krystalická struktura ukázala, že komplex připomíná tvarem písmeno L jehož hydrofobní raménko kotví celý enzym v IMM a podílí se na přenosu protonů. Periferní raménko obsahující redoxní centra ční kvůli své hydrofilní povaze hluboko

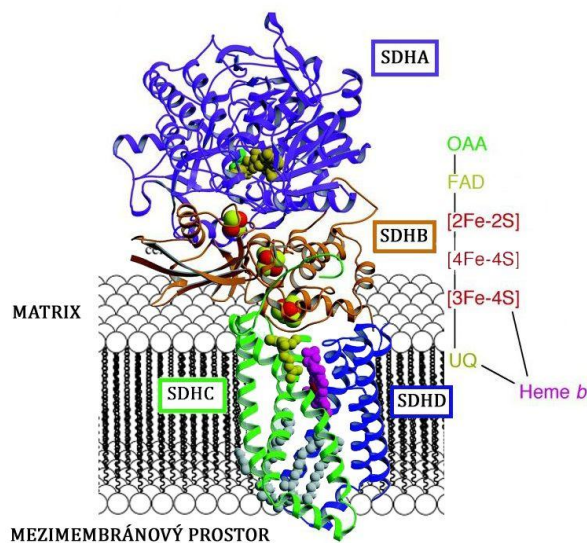
do matrix [28]. Zde přejímá 2 elektrony od redukovaného NADH prostřednictvím FMN. Sérií následujících sedmi [Fe–S] center jsou oba získané elektrony přeneseny do místa I_Q v IMM, kde jsou využity pro redukci v membráně rozpuštěného ubichinonu (koenzym Q, CoQ) [29]. Přenos elektronů poskytuje energii pro změnu konformace CI, což vede k transferu 4 H^+ do IMS, čímž CI přímo přispívá ke vzniku $\Delta\psi_{H^+}$.



Obr. 6 – Schematické znázornění struktury komplexu I se všemi podjednotkami a bíle vyznačenou přenosovou cestou pro elektron. Redoxní centra jsou značena bíle. CoQ – ubichinon. Upraveno dle [30].

1.2.1.2. Komplex II

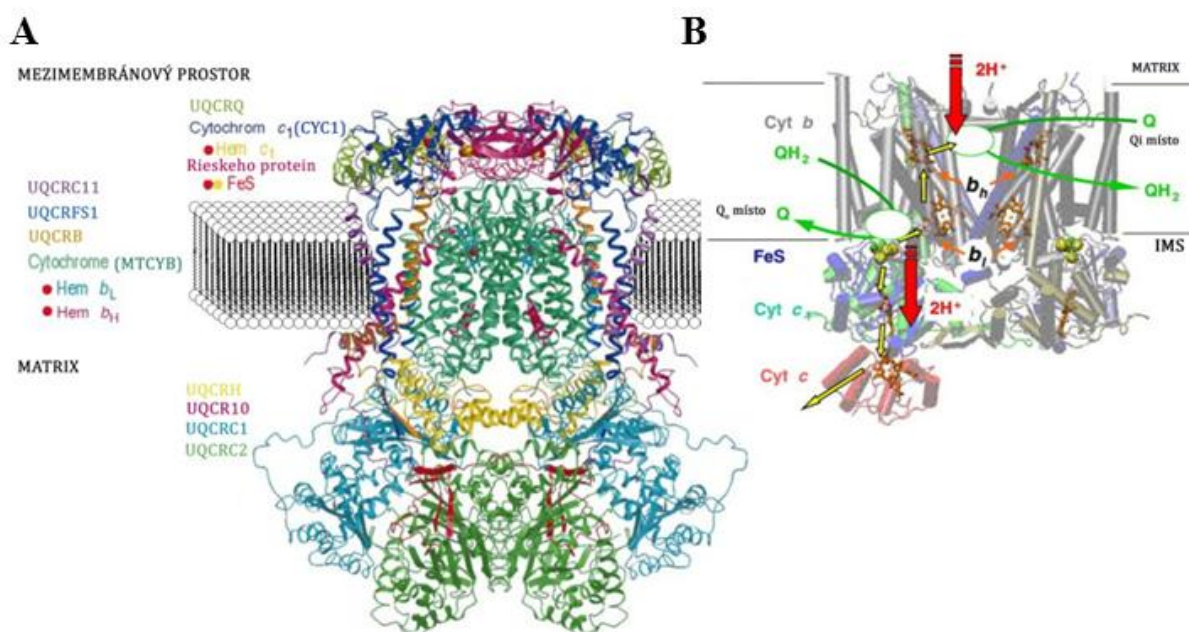
Komplex II (sukcinát:ubichinon oxidoreduktasa, sukcinát dehydrogenasa, EC 1.3.5.1, CII) je nejmenším, asi 140 kDa velkým, komplexem OXPHOS. Komplex II (Obr. 7. str. 18) obsahuje pouze 4 jaderně kódované podjednotky (SDHA, SDHB, SDHC a SDHD). SDHA kovalentně váže flavinadenindinukleotid (FAD) v aktivním místě, které katalyzuje přeměnu sukcinátu na fumarát v citrátovém cyklu. Při této oxidační přeměně jsou získávány 2 elektrony, které jsou prostřednictvím tří [Fe–S] center v SDHB předány na CoQ, což je zajištěno membránovými podjednotkami SDHC a SDHD, které též tvoří lipofilní kotvu enzymu v IMM. Na rozdíl od komplexu I však v tomto případě nedochází k přenosu protonů přes IMM [31-33].



Obr. 7 – Krystalová struktura komplexu II s vyznačenými podjednotkami SDHA, SDHB, SDHC a SDHD. Dodatečné schéma přenosu elektronu. OAA–oxalacetát (inhibitor), UQ – ubichinon. Upraveno dle [34].

1.2.1.3. Komplex III

Komplex III (ubichinol:cyt *c* oxidoreduktasa, komplex *bc₁*, EC 1.10.2.2, CIII), Obr. 8, str.19, je transmembránový enzym přibližné hmotnosti 300 kDa, který se skládá z 11 proteinových podjednotek, z nichž pouze cytochrom *b* (MTCYB) je kódován mtDNA [35]. Komplex je dále složen ze dvou proteinů tvořících jádro enzymu (UQCRC1 a UQCRC2) a 6 nízkomolekulárních proteinových neredoxních podjednotek, které mají strukturální funkci a mohou napomáhat tvorbě komplexů s dalšími dehydrogenasami a oxidasami [30]. Tento enzym získává elektrony při reoxidaci ubichinolu (CoQH₂), který je generován komplexy I a II a dalšími převážně minoritními mitochondriálními dehydrogenasami produkujícími hydroxychinony (ubichinoly). Získané elektrony pak přenáší na hydrofilní cytochrom *c* (cyt *c*). K tomuto přenosu využívá relativně komplikovaný proces nazývaný též „Q cyklus“ (Obr. 8B, str. 19), v rámci kterého jsou na místě Q_o komplexu III oxidovány celkem dvě molekuly CoQH₂, což vede k zisku 4 elektronů a transportu 4 H⁺ do IMS. Z každého CoQH₂ je jeden elektron předán přes [Fe–S] centrum a cytochrom *c₁* na cyt *c*. Druhý elektron je odebrán molekulou hemu *b_L* a následně je skrze hem *b_H* využit v místě Q_i pro redukci jiné molekuly CoQ nejprve na semichinon a pomocí elektronu z druhého oxidovaného CoQ pak na CoQH₂. Vzniklý CoQH₂ může být znovu oxidačně regenerován v místě Q_o [36].

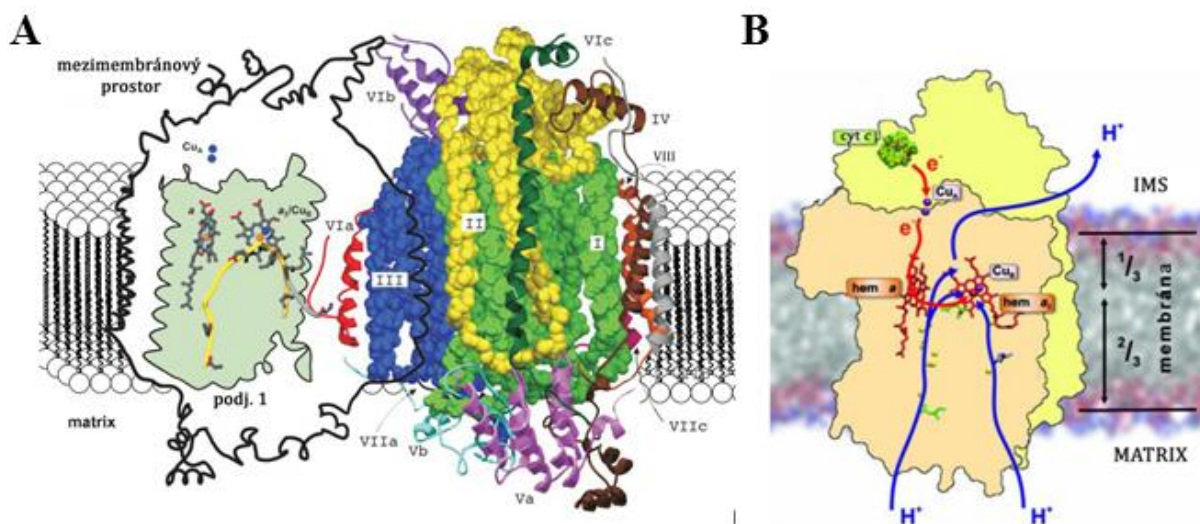


Obr. 8 – A) Krystalová struktura komplexu III s barevně označenými podjednotkami a redoxními centry. Převzato z [37], popisky upraveny dle databáze proteinů UniProt [38].

B) Obrázek nastiňující cestu přenosu elektronů (žluté šipky) skrz jednotlivá redoxní centra komplexu III. Červené šipky ukazují směr přenosu elektronů a zelené směr reakce ubichinonu (Q) na ubichinol (QH₂) a naopak. Označené bílým oválem jsou Q_i a Q_o místa. IMS – mezimembránový prostor. Upraveno dle [36].

1.2.1.4. Komplex IV

Komplex IV (cytochrom *c* oxidasa, EC 1.9.3.1., CIV), Obr. 9A, str. 20, je posledním enzymem ETC a ukončuje tak celý proces přenosu elektronu redukcí molekuly O₂ za vzniku H₂O a navýšením protonového gradientu. Savčí komplex IV má molekulovou hmotnost asi 200 kDa a tvoří ho 13 podjednotek, 10 kódovaných jadernou a 3 mtDNA (COXI, COXII, COXIII) [39]. CIV patří do rodiny reduktas s dvěma hemy *a* (*a* a *a*₃) a dvěma atomy Cu_A a Cu_B. Konzervovaným základem struktury je podjednotka COXI, která obsahuje hem *a* a bimetalické centrum (hem *a*₃/Cu_B), kde dochází k redukcí O₂. Druhý atom Cu_A je součástí COXII. Na rozdíl od mitochondriálně kódovaných podjednotek, podjednotky pocházející z jaderné DNA mají funkci strukturální a stabilizují dimery komplexu IV. Komplex IV je též cílem posttranslačních modifikací a alosterických interakcí, které regulují jeho aktivitu (fosforylace, glykosylace, vazba efektorů ATD/ADP) [40]. Komplex IV přenáší 4 elektrony ze 4 redukovaných molekul cyt *c* za vzniku 2 molekul H₂O a převedení 4 protonů (z toho 2 zdánlivě, protože jsou využity pro vznik molekuly H₂O) do IMS (Obr. 9B, str. 20). Transportní cesta elektronu zahrnuje dvě stěžejní podjednotky (COXI a COXII) a začíná na Cu_A, který odebírá elektron z příchozího cyt *c*. Elektron je dále přenesen na hem *a* a na bimetalické centrum hem *a*₃/Cu_B, kde dochází k redukcí O₂ [24; 41].

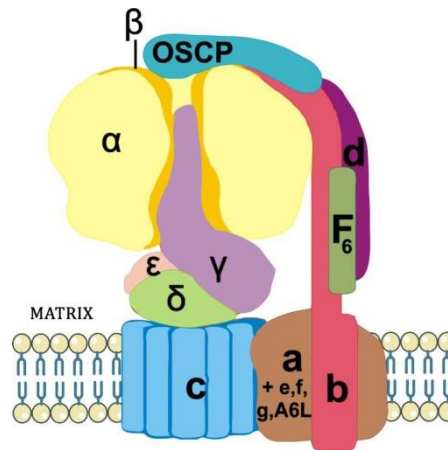


Obr. 9 – A) Krystalová struktura komplexu IV se schematickým naznačením dimeru. Na obrázku jsou znázorněna i hlavní redoxní centra účastníci se přenosu elektronu. Římskými číslicemi jsou označeny podjednotky COXI až COXVIII. Upraveno dle [39].

B) Schematická ilustrace komplexu IV, která zobrazuje cestu přenosu elektronu (červené šipky) s nejvýznamnějšími redoxními centry (hem *a*, hem *a*₃, Cu_A, Cu_B) a přenos protonu (modré šipky), IMS – mezimembránový prostor. Upraveno dle [41].

1.2.1.5. ATP synthasa

F₁F₀ ATP synthasa (zkráceně ATP synthasa, EC 3.6.3.14), Obr. 10, str. 21, je posledním asi 600 kDa velkým komplexem oxidační fosforylace. ATP synthasa často v IMM tvoří dimery. Skládá se z 16 podjednotek, z nichž 2 (α a β) jsou kódovány mtDNA [42]. ATP synthasa je složená z dvou molekulárních motorů (F₁ a F₀) a několika proteinů, které je spojují. Katalytickou jednotku tvoří hydrofilní F₁ motor složený z podjednotek α_3 , β_3 , γ , δ , ϵ , které za normálních okolností zajišťují syntézu ATP, v případě zpětného chodu pak jeho hydrolýzu. Krystalická struktura ATP synthasy [43] z hovězího srdečního svalu ukázala, že F₁ motor je hexamerní komplex složený střídavě z 3 α a 3 β podjednotek, které lemují jádro z γ proteinů. F₀ rotor zakotvený v IMM přenáší protony po jejich elektrochemickém gradientu. Savčí F₀ jednotka je tvořena proteiny a, b, c₈, d, e, f, g, (A6L), F₆. Oba rotory jsou spojeny dvěma proteinovými vlákny. Hlavní je tvořeno podjednotkami γ , δ , ϵ z komplexu F₁, a periferní vlákno pak z proteinu citlivého k oligomycinu (OSCP) a podjednotek b, d a F₆ komplexu F₀ [17; 44].



Obr. 10 – Schematické znázornění lidské ATP synthasy s vyznačením podjednotek. Jedna β podjednotka vpředu je pro přehlednost odstraněna. Převzato z [45].

Hlavní funkcí ATP synthasy je syntéza ATP, k čemuž využívá $\Delta\psi_{H^+}$ na IMM generovaného komplexu I, III a IV [42]. Mechanismus syntézy ATP je založen na střídavé změně konformace katalytických míst F_1 v β podjednotkách (blízko rozhraní s α podjednotkou). Konformační změnu vynucuje nesymetrické γ jádro F_0 , které se otáčí po směru hodinových ručiček v důsledku rotace „ c_8 –kruhu“ membránové F_0 jednotky. Při jedné otočce o 360° dojde k přenosu 8 protonů (8 podjednotek c) a syntéze 3 ATP.[45] Rotační katalýza byla potvrzena řadou spektroskopických a biochemických technik [46; 47].

1.2.2. Stechiometrie respiračních komplexů

Komplexy OXPHOS se v mitochondriích izolovaných z hovězího srdce vyskytují v poměrech $1,1 \pm 0,2; 1,3 \pm 0,1; 3:6,7 \pm 0,8; 3,5 \pm 0,2$ (CI:CII:CIII:CIV:ATP synthasa) [48].

1.2.3. Dodatečné systémy respiračního řetězce

Kromě zmíněných respiračních komplexů a alternativních CI zejména u hub a rostlin může elektrony do elektrontransportního řetězce doplňovat několik dalších enzymů. Například glycerol–3–fosfát dehydrogenasa, flavoprotein:ubichinon oxidoreduktasa, cholin dehydrogenasa nebo dihydroorotát dehydrogenasa. Za normálních okolností je však příspěvek těchto proteinů v porovnání s komplexu I a II minoritní [30].

1.3. $\rho 0$ buněčná linie

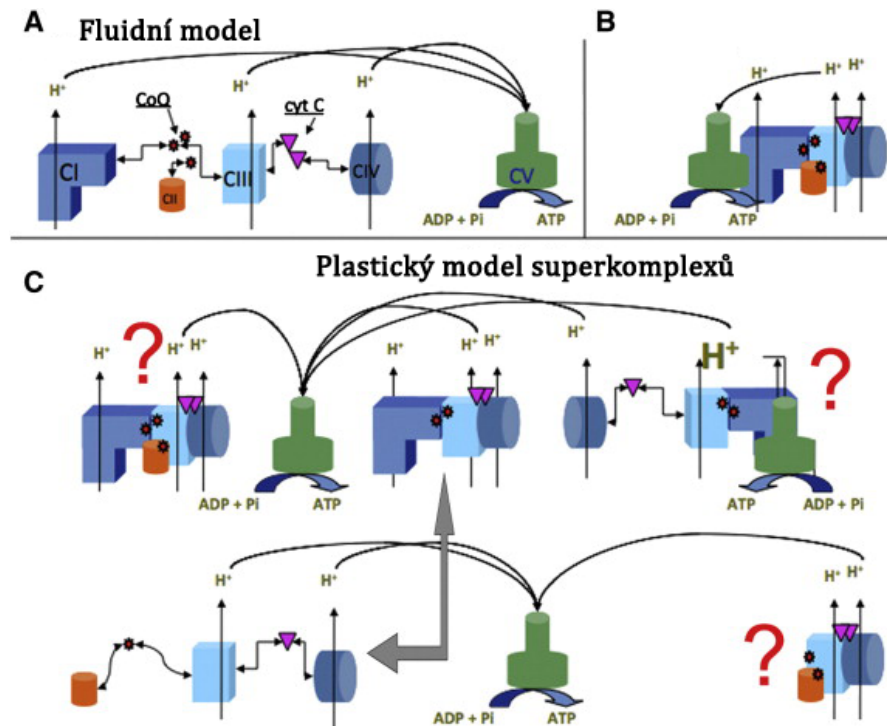
In vitro je možné připravit buněčné linie, u nichž oxidační fosforylace neprobíhá. Tyto buněčné kultury se nazývají $\rho 0$ a je možné je vytvořit dlouhodobou kultivací v přítomnosti nízké koncentrace ethidium bromidu (EtBr), který se interkaluje do šroubovice DNA mezi báze adenin a thymin, čímž znemožní její replikaci a transkripci. Protože mitochondriální DNA je více náchylná k poškození díky nepřítomnosti histonů a opravných mechanismů,

které chrání jadernou DNA, je více citlivá na vazbu EtBr a dochází k jejímu selektivnímu poškození. Mitochondrie tak po chronickém vystavení EtBr ztrácí mitochondriálně kódované podjednotky komplexů I, III, IV a ATP synthasy (7 podjednotek CI, 1 podjednotka CIII, 3 podjednotky CIV a 2 podjednotky F₁F₀ ATP synthasy). Jediný komplex II, který má všechny podjednotky kódovány jadernou DNA, by měl zůstat nepoškozen. Částečně funkční zůstává v těchto buněčných liniích i ATP synthasa, která hydrolyzou ATP udržuje protonový gradient na IMM [49; 50].

1.4. Mitochondriální superkomplexy

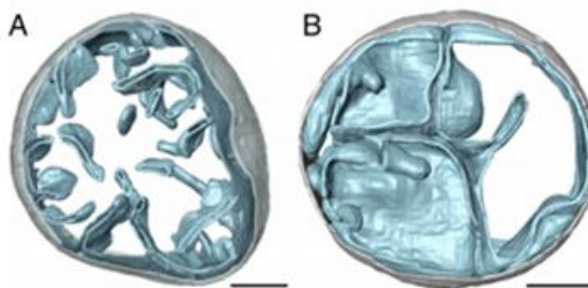
Nové poznatky naznačují, že mitochondrie mohou reagovat na okamžité metabolické potřeby buňky reorganizací dýchacího řetězce, kdy dochází k shlukování respiračních komplexů ve vnitřní mitochondriální membráně do tzv. superkomplexů (SC). Tyto supramolekulární struktury mají důležitý vliv na efektivitu přenosu elektronů v rámci řetězce a hrají též podstatnou roli při udržení stability jednotlivých komplexů a potlačení tvorby ROS [51].

Vyšší molekulární organizace dýchacího řetězce byla vždy poněkud spornou záležitostí, kdy konkurenční teorie předpokládaly, že jednotlivé komplexy buď operují jako samostatné entity, které si předávají elektrony nekontrolovaně difúzí (tzv. fluidní model), nebo naopak že respirační komplexy tvoří stabilní superstruktury s relativně pevnou vzájemnou vazbou [52] [53]. V tomto ohledu existovala značná kontroverze, experimentální data do určité míry podporovala obě interpretace, ale na druhou stranu pozorované vysokomolekulární struktury byly považovány za artefakty detekčních metod. Oba dva aspekty starších teorií jsou v současnosti sjednoceny takzvaným „plastickým“ modelem, který dobře vysvětluje většinu experimentálních dat (Obr. 11, str. 23) [51; 54]. Tento model předpokládá, že volný i vázaný stav jsou extrémní případy a že reálný stav asociace respiračních komplexů se nachází mezi oběma krajními případy, kdy dýchací komplexy mění svou vzájemnou vazbu podle aktuální metabolické potřeby buňky.



Obr. 11 – Modelové příklady asociace komplexů oxidační fosforylace (CI až CIV) a zeleně označená ATP synthasa. Panel **A** představuje „fluidní model“, kdy jsou všechny komplexy v membráně jako samostatné jednotky, mezi nimiž se pohybuje ubichinon/ubichinol (CoQ) a cytochrom c (cyt c). Na panelu **B** je zobrazen druhý krajní případ kdy jsou všechny komplexy asociovány v jeden superkomplex – respirazom. V oddílu **C** jsou zobrazeny reálné případy asociace (otazníkem označené nejsou typické). Nejběžnějším typem superkomplexů je asociace CI, CIII a CIV. Upraveno dle [51].

Konkrétní složení těchto struktur je v současné době možné detekovat pomocí nativní elektroforézy s použitím specifických detergentů, jako je např. digitonin. Tato technika ozřejmila, že zatímco CI se nachází v podstatě pouze v superkomplexech (buď pouze s CIII, nebo s CIII a CIV), tak CIII a CIV se nacházejí částečně samostatně a podíl těchto volných a vázaných frakcí určuje využití konkrétních energetických substrátů dýchacím řetězcem [55-57]. Oproti tomu asociace CII a ATP synthasy v makromolekulárních superkomplexech je pravděpodobně méně významná, i když do určité míry je v buňce přítomna [58]. Tvorba SC je závislá na přítomnosti intaktních komponent dýchacího řetězce a je ovlivněna konkrétním stavem buňky jako např. složením IMM a dostupností energetických substrátů. Dalším z faktorů, které ovlivňují strukturu superkomplexů, je organizace krist v IMM. Bylo ukázáno, že mitochondrie s více kristami obsahují též více superkomplexů [59], a že buňky, u kterých byla tvorba krist uměle potlačena, obsahují relativně nižší stupeň organizace dýchacího řetězce do SC. Zajímavostí je, že množství mitochondriálních krist může být naopak ovlivněno přítomností dimerů ATP synthasy (Obr. 12, str. 24) [60].



Obr. 12 – Snímky mitochondrie kvasinek, pořízené elektronovou tomografií, sledující změny tvaru mitochondriálních krist **A**) běžný typ **B**) mutant postrádající dimery ATP synthasy (měřítko 200 nm). Upraveno dle [61].

1.5. Tvorba reaktivních forem kyslíku

Reaktivní formy kyslíku (ROS) zahrnují veškeré sloučeniny vycházející z částečné redukce molekuly O_2 , tj. molekuly redukované méně než 4 elektrony. Jedná se o superoxidové anionty ($O_2^{\bullet-}$), hydroxylové (HO^{\bullet}), peroxylové (RO_2^{\bullet}), alkoxylové (RO^{\bullet}) radikály, ale i peroxid vodíku (H_2O_2), který není radikálové povahy [62]. V eukaryotických buňkách je tvorba ROS spojena s patologickými procesy, jako je stárnutí buněk, apoptóza, nebo poškození buněk při ischemii a reperfuzi [63]. Nejdůležitějšími producenty ROS v savčích buňkách jsou mitochondrie, kde kvůli vysokým elektronovým tokům skrz redoxní centra dýchacího řetězce nezbytným k udržení protonového gradientu na IMM, dochází k častým únikům elektronů a jejich vazbě na molekulu O_2 za vzniku $O_2^{\bullet-}$. Dalšími zdroji ROS v mitochondriích jsou např. fosfoglycerol dehydrogenasa, 2-oxoglutarát dehydrogenasa, pyruvát dehydrogenasa a dihydroorotát dehydrogenasa [64]. Kromě toho mohou být ROS generovány i dalšími enzymovými systémy vně mitochondrií, např. NADPH oxidasou a cytochrom P_{450} dependentní oxigenasou [65].

Primárně tvořeným kyslíkatým radikálem v mitochondriích je výše zmíněný superoxid, který je tvořen hlavně v dýchacím řetězci (viz dále). Vznikající $O_2^{\bullet-}$ se v mitochondriích spontánně a relativně pomalu přeměňuje na H_2O_2 [64], ale v přítomnosti antioxidačního enzymu superoxid dismutasy (SOD) je tato konverze výrazně urychlena (viz kapitola 1.6.1. níže). Peroxid pak může opouštět mitochondrii nebo se samovolně či enzymově rozkládat na vodu, nebo se za přítomnosti iontu přechodného kovu přeměňovat Fentonovou reakcí na nejsilnější přírodní oxidant – hydroxidový aniont ($OH^{\bullet-}$). V neutrofilech se myeloperoxidasou přeměňuje na velmi reaktivní kyselinu $HClO$ [65].

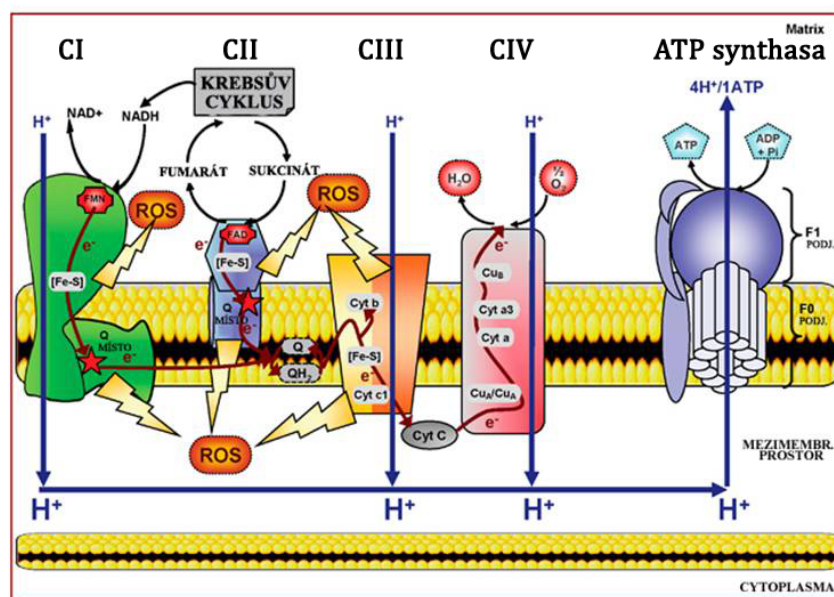
Na oxidační hrozbě buněk se podílí také reaktivní dusíkaté radikály (RNOS) a radikál oxidu dusného ($\bullet NO$). RNOS vznikají reakcí $\bullet NO$ a $O_2^{\bullet-}$ a mají velký význam ve

fyziologických i patofyziologických mechanismech. •NO vzniká enzymově jednou ze tří izoform NO-synthasy (nNOS neuronová, iNOS inducibilní a eNOS endoteliálních buněk) z L-argininu redukcí elektronem získaným z NADPH. •NO slouží v buňkách jako intracelulární i mezibuněčná signální molekula, ale při patofyziologických procesech způsobí „nitrační“ a oxidační stres převážně tvorbou N₂O₃ a peroxynitritu (O=NOO⁻) [66].

„Oxidační stres“ popisuje stav, kdy dojde k porušení rovnováhy mezi produkcí ROS, případně RNOS, a antioxidační ochranou systému. Přebytek oxidačních radikálů spouští řetězové reakce oxidující proteiny, lipidy, sacharidy i nukleové kyseliny a dochází tak k nevratnému poškození buňky. Částečně nevyvážený poměr antioxidantů/oxidantů slouží v živých organizmech k redoxní signalizaci. Dlouhodobě zvýšená produkce ROS může vést ke karcinogenezi, ale akutní oxidační stres způsobený inhibicí či defekty ETC vyvolá programovanou buněčnou smrt. Proto komplexy ETC představují velice slibný cíl pro protinádorovou léčbu (viz dále) [67].

1.5.1. Produkce superoxidu v dýchacím řetězci

Hlavním producentem superoxidu v mitochondrii je dýchací řetězec [68], v rámci něhož je produkován obzvláště komplexy I, II a III (viz Obr. 13, str. 26). Důležitým faktorem pro produkci O₂^{•-} v dýchacím řetězci je míra „nasyčenosti“ řetězce elektrony. Čím více je řetězec v redukovaném stavu, tím snadněji elektrony unikají z redoxních center a předčasně reagují s kyslíkem za vzniku superoxidu. Tento stav může být vyvolán např. vysokým poměrem NADH/NAD⁺, vysokým Δψ_{H+}, což zhoršuje průchod elektronů řetězcem, či jinou zábranou volného toku elektronů. Příkladem může být jeho blokáce díky mutacím postihujícím jednotlivé složky komplexů důležité pro jejich aktivitu, nebo přítomnost inhibitorů, které tok elektronů zastaví. I při bezproblémovém chodu řetězce je odhadováno, že v izolovaných mitochondriích je při vysokém Δψ_{H+} a zároveň vysoké hladině CoQH₂ 1 až 2 % spotřebovaného O₂ využito k tvorbě O₂^{•-}. V intaktních buňkách a tkáních je tento poměr patrně výrazně nižší díky jiným podmínkám, ale přesná detekce produkce superoxidu *in situ* je stále problematické a tudíž kvantifikace obtížně proveditelná [68]. Nicméně i v intaktních buňkách a tkáních platí, že inhibice dýchacího řetězce produkci ROS zvyšuje.



Obr. 13 – Reprezentativní schéma komplexů respiračního řetězce a míst, kde dochází k produkci ROS. Mezi komplexy ETC je hnědou šipkou naznačen přenos elektronů s popsány redoxními centry, modře pak označen přenos H^+ . CI až CIV – komplexy respiračního řetězce I až IV, ROS – reaktivní formy kyslíku, FMN – flavinmononukleotid, cyt – cytochrom, Q – ubiquinon, QH₂ – ubiquinol. Upraveno dle [24].

Komplex I může produkovat ROS z flavinu (I_F) nebo ve vazném místě pro CoQ (I_Q). Za běžných podmínek produkuje CI větší množství ROS, pokud je v mitochondriích vysoký $\Delta\psi_{H^+}$ a je přítomen nadbytek redukováného NADH nebo CoQH₂ [69]. Inhibitory, které se vážou do vazného místa pro CoQ jako např. rotenon, ve většině situací produkci ROS zvyšují, ale za určitých specifických podmínek, jako je zpětný tok elektronů z CII v přítomnosti sukcinátu nebo při odbourávání mastných kyselin, ji mohou naopak snížit [68]. ROS mohou být produkovány i přímo komplexem II [70], a to v případě inhibice jeho vazného místa pro CoQ (II_Q) nebo pokud je inhibován CIII [32]. Komplex III je pak schopen tvořit ROS při inhibici místa Q_i inhibitory jako např. antimycinem A, což vedem ke vzniku částečně redukováného CoQ a následné tvorbě superoxidu [71]. Na druhou stranu inhibitory místa Q_o komplexu III, jako je např. myxothiazol či stigmatellin, částečně redukováný CoQ netvoří a nevedou k tvorbě ROS [72; 73]. Komplex IV, který ve dvou krocích oxiduje kyslík, producentem ROS nebývá, protože reaktivní kyslíkaté intermediáty účinně zadržuje [65]. Inhibicí některých článků respiračního řetězce dojde ke zvýšené tvorbě ROS dalšími komplexy. Například inhibice CIII vyvolá zvýšenou produkci ROS na CI a CII [63].

Cílením na komplexy dýchacího řetězce je možno dosáhnout eliminace rakovinných buněk, příkladem pro toto mohou být inhibitory cílené na vazné místo pro CoQ v komplexu II, jako je např. α -tokoferyl sukcinát (α -TOS) nebo jeho účinnější analog (MitoVES) [2; 74].

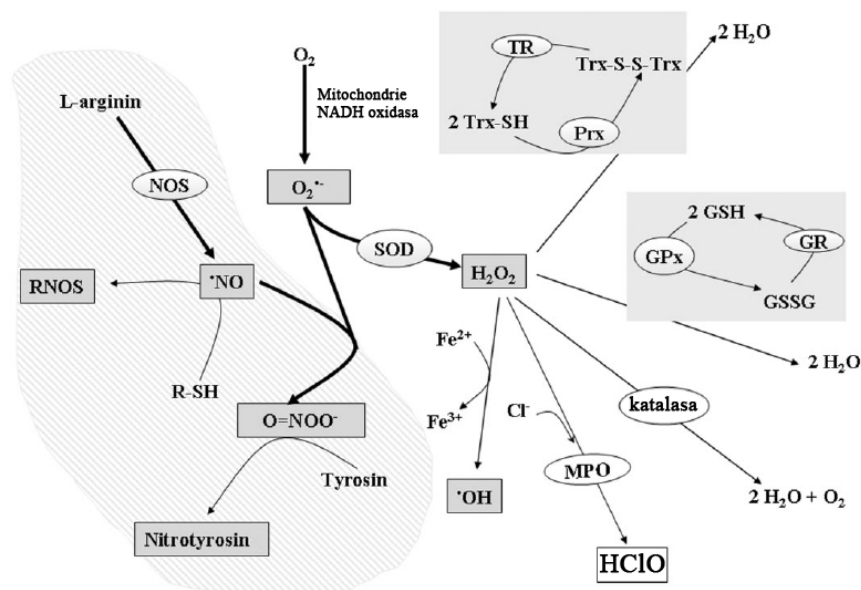
Inhibitory ATP synthasy ale neúčinkují jednoznačně. Inhibice F_0 domény ATP synthasy oligomycinem a jeho deriváty sice zvýší tvorbu ROS a vyvolá apoptózu, avšak nekonzistentně. Za určitých podmínek může naopak vstup do apoptózy inhibovat, možná díky přílišnému snížení hladiny buněčného ATP (apoptóza je na ATP závislá) [75; 76].

Míra produkce ROS jednotlivými místy komplexů ETC v izolovaných mitochondriích je závislá na substrátu, který je oxidován. Během oxidace sukcinátu většina superoxidových radikálů pochází z I_Q za malého příspěvku I_F a komplexu III (Q_O). Pokud je substrátem glutamát a malát, příspěvky míst formujících $O_2^{\cdot-}$ jsou opačné, navíc se značným příspěvkem 2-oxoglutarát dehydrogenasy. Tvorba $O_2^{\cdot-}$ komplexem II (II_F) se stává spolu s I_F a Q_O významnou, jestliže je oxidován palmitoylkarnitin. Nakonec stejnou měrou přispívají k formování ROS všechna zmíněná místa, pokud je oxidovaným substrátem glycerol-3-fosfát. Podobné změny jsou předpokládány v buňkách a *in vivo* [64].

Důležitý může být i topografický aspekt produkce ROS. Je rozdíl např. mezi komplexy I a III, kdy komplex I uvolňuje superoxid převážně do mitochondriálního matrix, zatímco komplex III do matrix i do mezimembránového prostoru [65; 77].

1.6. Antioxidační systémy

Jak již bylo zmíněno výše, vysoká hladina tvorby $O_2^{\cdot-}$ radikálu z dýchacího řetězce vyžaduje adekvátní obranné mechanismy, aby nedošlo k poškození důležitých buněčných komponent. Tato ochrana je zajištěna buněčnými antioxidačními systémy (Obr. 14, str. 28), které výrazně urychlují eliminaci kyslíkových radikálů a snižují tak jejich koncentraci a pravděpodobnost vzniku následných škod.



Obr. 14 – Hlavní antioxidační enzymy a antioxidanty ROS a RNOS. GPx – glutathion peroxidasa; GR – glutathion reduktasa; GSH – glutathion; GSSG – disulfid glutathionu; MPO – myeloperoxidasa; NOS – NO synthasa; Prx – peroxiredoxin; RNOS – reaktivní dusíkaté radikály; SOD – superoxid dismutasa; TR – thioredoxin reduktasa; Trx – thioredoxin; Trx-S-S-Trx – disulfid thioredoxinu. Převzato z [66].

1.6.1. Inaktivace superoxidu

Jednou z nejdůležitějších a hierarchicky první z komponent antioxidační ochrany je superoxid dismutasa, SOD. Tento enzym zajišťuje přeměnu superoxidu na peroxid vodíku, který je následně neutralizován dalšími systémy. V eukaryotech jsou popsány tři izoformy, mitochondriální MnSOD (SOD2), která se nachází v matrix mitochondrií, CuZnSOD v cytoplasmě, jádře a lysozomech (SOD1) a SOD produkovaná buňkami do extracelulárního prostoru (SOD3) [65]. Nejdůležitější roli z hlediska mitochondriálních ROS hraje SOD2, která se v mitochondrii nachází ve vysoké koncentraci a je zodpovědná za neutralizaci superoxidu pocházejícího z dýchacího řetězce. Významnou roli při regulaci tohoto enzymu hraje např. transkripční faktor FOXO3, což je jeden z významných regulátorů antistresových odpovědí [78].

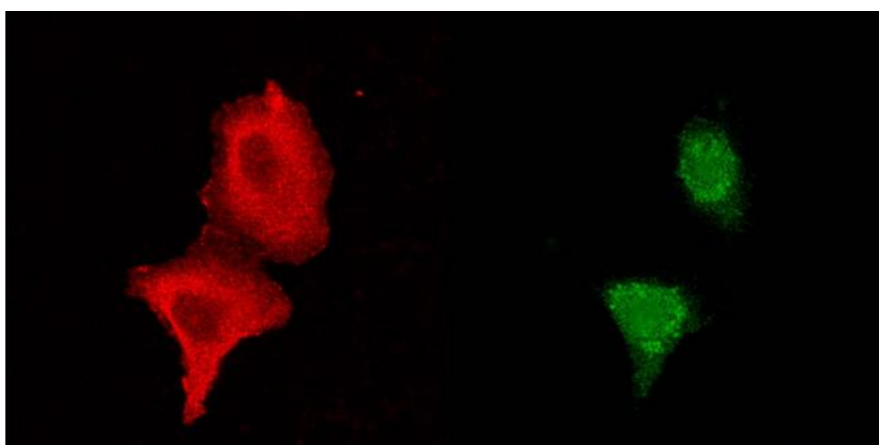
1.6.2. Inaktivace peroxidu vodíku

Přebytečný H_2O_2 je v organizmech detoxifikován glutathionovým systémem, thioredoxinovým systémem a katalasami. Katalasy, které se v savčích buňkách nachází zejména v peroxizomech, přeměňují H_2O_2 na H_2O a O_2 . Odstraňování H_2O_2 se v glutathionovém systému účastní také glutathionové peroxidasy (GPx) a v thioredoxinovém systému peroxiredoxiny (Prx).

1.6.2.1. Glutathion

Glutathionový (L- γ -glutamyl-L-cysteinyl-glycin, GSH) redoxní systém je jedním z nejvýznamnějších antioxidačních mechanismů buněk. V eukaryotických buňkách poskytuje všudypřítomný tripeptid glutathion svoji silně redukující volnou thiolovou skupinu pro udržení redoxní homeostázy. Pokud je oxidován, tvoří disulfidický můstek s dalším glutathionem za vzniku disulfidu glutathionu (GSSG). Právě poměr GSH/GSSG se využívá jako měřítko oxidačního stresu uvnitř buňky, která obvykle udržuje vysokou hladinu redukovaného GSH (asi 100:1), jež výrazně klesá při oxidačním stresu a apoptóze [79]. Částečně se na účinnosti a cílení redoxního zásahu GSH podílí jeho kompartmentace. Glutathionová zásoba je přítomna v mitochondriích, cytoplazmě, jádře i endoplazmatickém retikulu (viz Obr. 15) [80].

V cytoplazmě většiny buněk se koncentrace redukovaného glutathionu pohybuje v rozmezí 2 až 10 mM, v mitochondriích 5 až 11 mM a v jádře 5 až 15 mM GSH [81; 82]. Bylo zjištěno, že distribuce GSH v jádře a cytoplazmě koreluje s buněčným cyklem. Během buněčné proliferace je koncentrace GSH v cytoplazmě 4x větší, ale při vstupu buněk do konfluence se koncentrace v obou kompartmentech vyrovnávají [83]. Též mitochondriální GSH je velmi významný regulátor produkce ROS a pomáhá udržovat integritu mitochondriálních lipidů a proteinů. Hladina GSH v mitochondriích se liší dle typu buněk (až 30 % celkového GSH) a je udržována membránovými přenašeči GSH (GSH-dikarboxylát, GSH-2-oxoglutarát). Prostřednictvím interakce s proteinem Bcl-2 je GSH udržován v mezimembránovém prostoru mitochondrií [84].



Obr. 15 – Konfokální snímky buněk A549 (plicní epitel) značených protilátkou proti glutathionu (GSH) červeně a proti CIV zeleně ukazují, že GSH je v buňce všudypřítomný, nejvíce se ho nahcází v mitochondriích. Převzato z [80].

GSH využívají jako substrát glutathion peroxidasy (GPx), které jsou hlavními antioxidantními enzymy. GPx účastníci se velkou měrou na detoxifikaci H_2O_2 obsahují v aktivním centru selenocystein, proto se selen považuje za chemoprevenci některých typů rakoviny. Dnes je známo 7 izoform GPx, z nichž nejvýznamnější je cytoplazmatická a mitochondriální GPx 1, která se vyskytuje jako monomer, a tetramerní fosfolipidová hydroperoxid glutathion peroxidasa (GPx 4). GPx 1 je prevencí oxidačního poškození, redukuje volný H_2O_2 a některé organické hydroperoxydy, GPx 4 redukuje komplexně oxidované lipidy, zejména lipidy membrán. Antioxidační systém GPx často kompetuje o H_2O_2 s katalasami, které se antioxidační ochrany zapojují při vyšším oxidačním stresu než GPx. Katalasy však z pravidla nejsou lokalizované v mitochondriích [81].

1.6.2.2. Peroxiredoxiny, Thioredoxiny a NADPH

Glutathionový redoxní systém často v buňkách kooperuje s dalším antioxidačním systémem udržujícím rovnováhu GSH/GSSG – thioredoxinovým systémem redukováného a oxidovaného thioredoxinu (TRX–SH/TRX–SS). Thioredoxiny (TRX) jsou všudypřítomné malé proteiny, poskytující dvě redoxně aktivní cysteinová místa. Mechanismus jejich působení je založen na redukcí disulfidických vazeb (například v GSSG) svoji oxidací, samy jsou pak regenerovány NADH dependentními TRX reduktasami a peroxiredoxiny. Obdobně jako GSH i TRX je kompartmentován – TRX1 je lokalizován v cytoplazmě a během oxidačního stresu je přemísťován do jádra, TRX2 zajišťuje redoxní rovnováhu v mitochondriích. Stejně tak jako GSH systém, i TRX systém se může stát v savčích buňkách při lehkém vychýlení z rovnováhy důležitým členem redoxních signalizačních kaskád [85].

Thioredoxiny jsou nezbytné i pro údržbu dalších antioxidačních proteinových komponent. Nejdůležitějšími z těchto na thioredoxinu závislých článků jsou mitochondriálně lokalizované peroxiredoxiny (Prx) 3 a 5 [86]. Prx3 je jeden z prominentních mitochondriálních antioxidačních proteinů, které se významně podílí na přímé inaktivaci H_2O_2 . Prx5 se na druhou stranu považuje za důležitý prvek ochrany mitochondriálních membrán před oxidačním poškozením, jelikož je schopen eliminovat poškození lipidových a proteinových membránových složek způsobené peroxidy [87].

Pro obnovu redukováných forem GSH a TRX redoxním cyklováním jsou esenciální purinové nukleotidy (převážně NADPH). NADPH je produkován NADH–NADPH nukleotid transhydrogenasou v IMM a systémy redukujícími $NADP^+$ (například izocitrát dehydrogenasou) nebo glukóza–6–fosfát dehydrogenasou v pentózofosfátové dráze, postraní větvi glykolýzy [88].

1.7. Apoptóza

Zvýšená hladina stresu, např. oxidačního stresu, může vést k indukci programované buněčné smrti, tzv. apoptózy. Apoptóza může být iniciována dvěma cestami. Mitochondriální cestou zprostředkovanou mitochondriemi, která přímo souvisí s oxidačním poškozením buněčných mechanismů, nedostatkem růstových faktorů nebo poškozením jaderní či mitochondriální DNA, nebo extracelulární aktivací membránových „receptorů smrti“ pomocí „faktorů indukujících smrt“. Mezi nejznámější z takových cest patří Fas (FAS receptor/Fas ligand), TNF (TNF-1 receptor/TNF α) a TRAIL (TRAIL receptor DR4 nebo 5/TNF) cesty [89]. Dále v textu bude popisována apoptóza s vnitřní, tedy mitochondriální aktivací.

1.7.1. Apoptóza iniciovaná oxidačním stresem

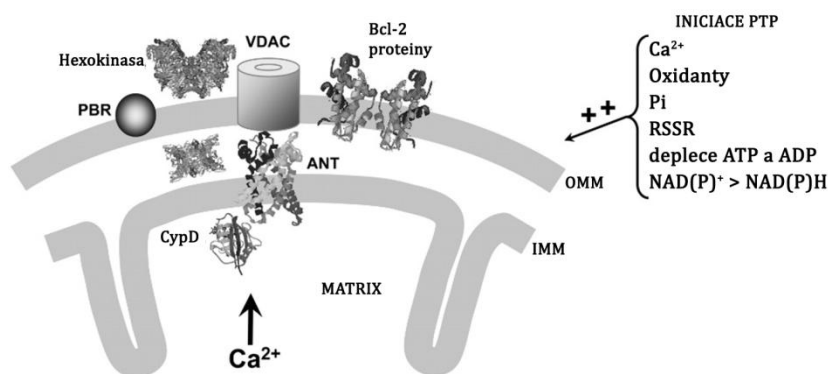
Oxidační stres iniciuje apoptózu aktivací kináz signalizačních drah MAPK (z anglického „mitogen-activated protein kinases“), JNK nebo p38-MAPK. Signalizační kinázové komplexy s navázaným redoxním činidlem (TRX1 nebo glutaredoxin) reagují na změnu redoxního stavu buňky (například posun GSH/GSSH rovnováhy), a tak slouží jako redoxní spínač, v jehož důsledku dojde ke zvýšení exprese apoptotických proteinů a/nebo vzniku přechodného permeabilního póru (PTP), což je rozhodujícím momentem mitochondriálně řízené apoptózy [82; 90; 91]. PTP následně zapříčiní destabilizaci mitochondrie a vylití proapoptotických proteinů včetně cyt *c* do cytoplazmy [92]. V cytoplazmě pak cyt *c* alostericky aktivuje 7 molekul proteinu Apaf-1, které za spotřeby ATP tvoří komplex apoptozom. Apoptozomem je následně vázáno a sestřihem aktivováno 7 iniciačních specifických cystein-aspartátových proteas kaspas-9, které dále aktivují exekuční kaspasy-3 a 7 zprostředkovávající finální štěpení proteinů [93]. Kromě cyt *c* je z mitochondrií uvolněna celá řada proteinů. Pro apoptózu jsou nevýznamnější proteiny, které blokují inhibitory kaspas Smac/DIABLO a Omi/HtrA2. Dále také endonukleasa EndoG a apoptózu indukující faktor (AIF), které vstupují do jádra, kde nezávisle na kaspasach fragmentují jadernou DNA a způsobují kondenzaci chromatinů [94].

Mitochondriální apoptóza může být v určitých případech spuštěna přes aktivaci receptorů na povrchu buňky, které zprostředkují aktivaci kaspas-8. Tyto kaspasy pak štěpí protein tBid, který se naváže do mitochondriální membrány, způsobí její permeabilizaci a vylití cyt *c*. Proces potom pokračuje tak, jak je popsáno výše [95].

Při apoptotické eliminaci prochází buňka mnoha morfologickými změnami. V první fázi se buňka stává oválnou, ztrácí buněčné spoje s okolními buňkami a pak se dále smršťuje. Později dochází k „bobtnání membrány“ a vzniku tzv. apoptotických tělísek, které obsahují fragmentovaný vnitrobuněčný obsah. Na svém povrchu mají tyto váčky fosfatidylserin (PS), který se za normálních podmínek nachází na vnitřní straně membrány. PS vystavený na povrchu je značkou pro makrofágy, které zajistí konečné odstranění buněčných zbytků, aniž by došlo k vyvolání zánětlivých procesů [96].

1.7.2. PTP (pór přechodné permeabilizace mitochondriálních membrán)

Jednou z příčin permeabilizace vnější mitochondriální membrány může být vytvoření velého póru, kdy dochází k současně permeabilizaci vnitřní i vnější membrány pro menší ionty a metabolity. Následkem toho dojde k bobtnání mitochondrií a protržení OMM. Důležitou roli v tomto procesu můžou hrát např. ionty Ca^{2+} . I když není stále přesně známo, které proteiny tvoří přechodný pór, ve shodě s doposud obecně uznávanou teorií se jedná zejména o proteiny Bcl-2 rodiny Bak a Bax (viz níže) a transportní protein VDAC vnější mitochondriální membrány. Důležitou komponentou pro tvorbu kanálu je cyklofylin D a roli můžou hrát též přenašeč ANT v IMM, hexokinasa, kreatinkinasa a periferní benzodiazepinový receptor (viz Obr. 16). Byla zjištěna též významná role dimerů F_1F_0 ATP synthasy [82; 97; 98]. Důležitost tohoto mechanismu při indukci apoptózy však zůstává stále poněkud nejasná.



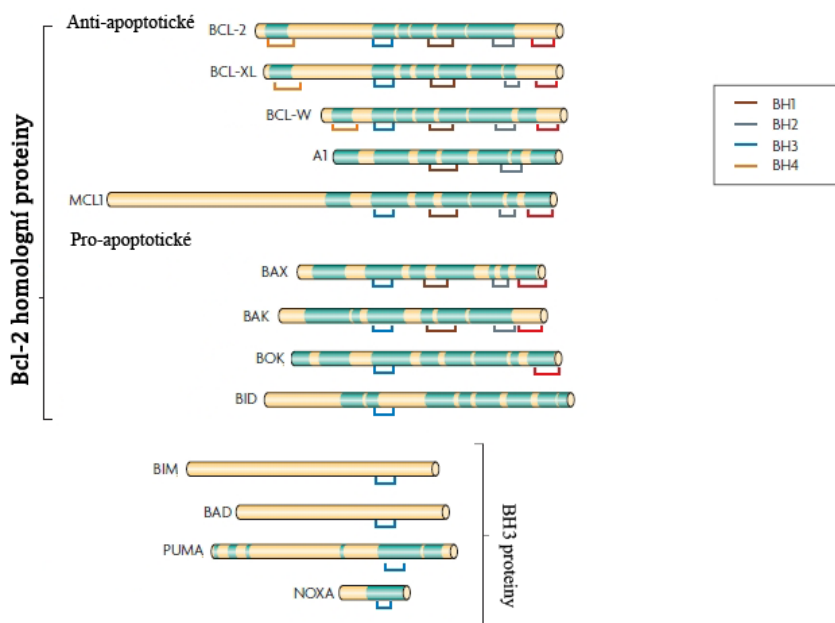
Obr. 16 – Domnělé složení póru přechodné permeabilizace mitochondrií (PTP), jehož vznik je iniciován oxidanty, oxidovanými thioly (RSSR), anorganickým fosfátem (Pi), ionty Ca^{2+} , deplecí ATP a ADP nebo vysokým poměrem oxidovaných nikotinamidadeninových nukleotidů oproti redukovaným. CypD – cyklofylin D, ANT – adenin nukleotid translokasa, PBR – periferní benzodiazepinový receptor, VDAC – napětově řízený aniontový kanál, RSSR – thiolový disulfid. Upraveno dle [97].

1.7.2.1. Role proteinů Bcl-2 v permeabilizaci vnější mitochondriální membrány

V současnosti se zdá, že hlavními regulátory permeabilizace OMM jsou proteiny superrodiny Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*). Poprvé byly popsány jako protoonkogeny lidského lymfomu, které na rozdíl od běžných onkogenů nespouští buněčnou proliferaci, ale zajišťují

přežití buněk za nepříznivých podmínek. Proteiny Bcl-2 zahrnují více než 30 homologních proteinů s anti- nebo proapoptotickou funkcí [99].

Antiapoptotické proteiny (Bcl-2, Mcl-1, Bcl-x_L, Bcl-w, A1) mají obvykle 4 Bcl-2 homologní (BH) domény, proapoptotické (Bak a Bax) pak 3 BH domény (BH1,2,3). Třetí, nejpočetnější skupina má jednu doménu BH3 (Puma, Noxa, Bid, Bad, Bim aj.), viz Obr. 17. Proteiny Bcl-2 jsou převážně globulární molekuly schopné integrace do membrán mitochondrií, jádra a endoplazmatického retikula. Hydrofobní domény proteinů Bak a Bax a antiapoptotických proteinů umožňují vazbu proteinů s jednou BH3 doménou. Vazba BH3 proteinu a proapoptotického je stimulem aktivujícím apoptózu a naopak vazba BH3 proteinu a antiapoptotického je procesem, který spouštění apoptózy inhibuje. Přímá vazba BH3 proteinů na proapoptotické Bak nebo Bax zatím byla popsána u Bid, Bim, Map-1 a Puma [100-102] a tyto proteiny jsou proto nazývány též přímé aktivátory. Ostatní BH3 proteiny vážou pouze antiapoptotické členy rodiny Bcl-2, čímž dojde jejich neutralizaci a zvýšení citlivosti vůči apoptóze [103].



Obr. 17 – Znárodnění některých antiapoptotických proteinů (Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, A1, Mcl-1) a proapoptotických (Bak, Bax, Bok, Bid) a proapoptotických BH3 proteinů (Bim, Bad, Puma, Noxa). U proteinů jsou hnědě označeny domény BH1, šedě BH2, modře BH3 a oranžově BH4 domény. Červeně je označen predikovaný transmembránový úsek. Upraveno dle [89]

Apoptóza je indukována, pakliže se rovnováha proteinové rodiny Bcl-2 vychýlí ve prospěch proapoptotických proteinů. V takové situaci dojde k aktivaci proteinů Bax a Bak, jejich oligomerizaci a vytvoření póru v OMM [95]. Hlavním rozdílem mezi Bax a Bak je to,

že Bax musí být do membrány rekrutován z cytoplasmy, zatímco Bak se již v membráně nachází a musí být pouze aktivován [104].

Rakovinné buňky mají často zvýšenou expresi antiapoptotických proteinů nebo naopak sníženou expresi proapoptotických proteinů rodiny Bcl-2. Toho využívají látky jako např. *ABT 737* a *ABT 263*. Ty byly navrženy jako takzvaná mimetika BH3 domény a principem jejich funkce je neutralizační vazba na Bcl-2 a Bcl-x_L a následná aktivace apoptózy [105]. Podobné mechanismy účinku byly překvapivě popsány i pro α -TOS [106] nebo pro inhibitor CIII antimycin A [107].

1.7.3. Mitokany – mediátory apoptózy cílené na mitochondrie a další apoptotická činidla

Takzvané mitokany (z anglických slov „*mitochondria*“ a „*cancer*“) jsou nedávno vyčleněnou skupinou nízkomolekulárních látek, které selektivně potlačují zhoubné buněčné bujení, a to destabilizací mitochondrií a mitochondriálních systémů. Jejich častým mechanismem působení je indukce tvorby ROS s následným vyvoláním apoptózy s určitou selektivitou pro rakovinné buňky. Dodnes byla popsána řada sloučenin, které se neformálně klasifikují dle místa účinku, např. inhibitory hexokinasy II, která „aktivuje“ glukózu pro vstup do glykolýzy, mimetika proteinů Bcl-2, které hrají esenciální roli ve spouštění a inhibici apoptózy, inhibitory redoxních thiolů, látky cílené do IMM nebo ovlivňující citrátový cyklus a procesy zahrnující mtDNA. Z hlediska této diplomové práce jsou nejzajímavější skupinou inhibitory komplexů respiračního řetězce.

Fenethylthiokyanát (PEITC) způsobuje vyčerpání glutathionu a inhibuje GSH peroxidasu, navíc specificky blokuje funkci CIII [108] vlivem čehož se ještě více zvýší produkce ROS. Nádorové buňky, které mají většinou slabší antioxidační kapacitu, tak vinou vzniklého oxidačního stresu selektivně vstupují do apoptózy [6]. Inhibici CIII také vyvolává apoptotické protinádorové činidlo antimycin A, které navíc působí i jako mimetikum BH3 proteinů [71; 107]. Výše zmiňovaný rotenon má kromě schopnosti inhibovat CI také schopnost destabilizovat mikrotubuly [109]. Doxorubicin je schopen interkalace do DNA, čímž znemožňuje replikaci DNA a transkripci RNA blokací správné funkce DNA a RNA polymerasy a inhibuje topoisomerasu [110; 111]. Také má protinádorový účinek vyvolaný přímou inhibicí aktivity CIV [112] a kardiotoxický efekt spojený s vyšší produkcí ROS jeho redoxním cyklováním [113]. Jedním z nejúčinnějších mitokanů je MitoVES, který primárně inhibuje CII a tím zvyšuje tvorbu ROS a iniciuje vstup buněk do apoptózy. MitoVES také

moduluje mtDNA a v subapoptotických dávkách snižuje její transkripci a inhibuje nádorové bujení [67].

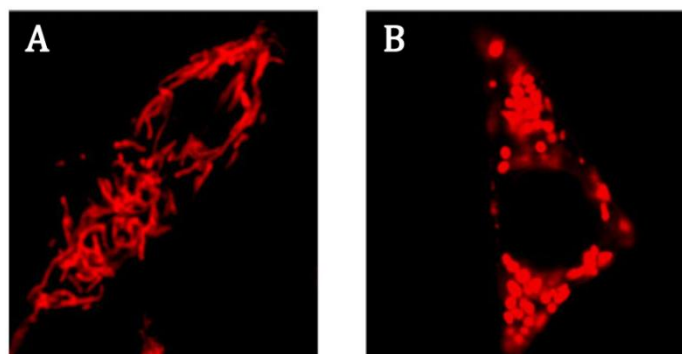
Menadion (syntetický vitamin K₃) inhibuje mitochondriální DNA polymerasu γ [114], nebo svým redoxním cyklováním spotřebovává NAD(P)H s průvodním zvýšením ROS [115] v důsledku čehož je v buňkách indukována apoptóza.

Kromě mitokanů byl další látkou s protirakovinným účinkem využitou v této práci paklitaxel (také taxol), standardní protirakovinné terapeutikum. Mechanismem účinku této látky je nefyziologická stabilizace cytoskeletálních mikrotubulů, která znemožní buňkám mitotické dělení, způsobující zastavení růstu v G₂/M fázi (viz níže) a je následováno vstupem buněk do apoptózy. Bylo ukázáno, že vlivem paklitaxelu též dochází k určité zvýšené tvorbě ROS a depleci GSH [116].

Staurosporin je proteinkinasový inhibitor využívaný jako standardní induktor apoptózy. Jeho mechanismus účinku je však složitý a doposud kontroverzní [117]. Staurosporin do určité míry a v některých systémech vyvolává oxidační stres [118], avšak tento efekt nemusí mít zásadní roli v iniciaci apoptózy [119].

1.8. Mitochondriální dynamika

Mitochondriální architektura je spjata s bioenergetickou adaptací buněk na dostupnost živin. Pokud buňky rostou v médiu bohatém na živiny (např. sacharidy, mastné kyseliny), jsou jejich mitochondrie převážně krátké a kulaté. Pokud buňky hladovějí, mitochondrie se spojují a tvoří dlouhá propojená vlákna, viz Obr. 18, str. 36 [120; 121]. K neustálým změnám tvaru mitochondrií dochází i v průběhu buněčného cyklu [122], což může být řízeno geny ovlivňujícími buněčnou proliferaci, jako je např. C-MYC [123]. Morfologie mitochondrií také vypovídá o viabilitě buněk, které separací a fúzí mitochondrií zajišťují reorganizaci mitochondriálních komponent a eliminují poškozený mitochondriální materiál. Tvar mitochondrií je významně ovlivněn i apoptotickými proteiny Bak, Bax a Bcl-x_L, a tak souvisí s citlivostí buněk k apoptóze [99].



Obr. 18 – Rozdílná morfologie mitochondrií buněk INS-1, které byly po dobu 4 hodin vystaveny různým koncentracím glukózy a vyšší mastné kyseliny (palmitát konjugovaný s BSA). **A**) 5 mM glukóza, **B**) 20 mM glukóza a 0,4 mM palmitát. Mitochondrie jsou fluorescenčně označeny DsRed cíleným na mitochondrie. V chudším médiu (**A**) mají mitochondrie delší „trubkovitý“ tvar, v bohatším médiu (**B**) pak spíše kulatý. Převzato z [19].

1.8.1. Splynutí (fúze) mitochondrií

Mitochondriální fúze je proces, při kterém se mitochondrie spojí dohromady. Mitochondrie spojují IMM a OMM v samostatných procesech čemuž nasvědčuje i lokalizace účastníků se proteinů. V OMM se nacházejí mitofuziny 1 a 2 (MFN 1 a 2), zatímco splynutí vnitřních membrán zajišťuje zejména protein OPA1 lokalizovaný v IMM [124] [125]. Mitofuziny (1 i 2) jsou transmembránové GTPasy zakotvené v OMM s cytoplazmatickými doménami, pomocí nichž oligomerizují a umožňují tak přiblížení membrán mitochondrií [126; 127]. Protein OPA1 má podobnou funkci jako mitofuziny s tím rozdílem, že zajišťuje přiblížení vnitřních mitochondriálních membrán, popřípadě uzavření krist [99; 124].

1.8.2. Fragmentace mitochondrií

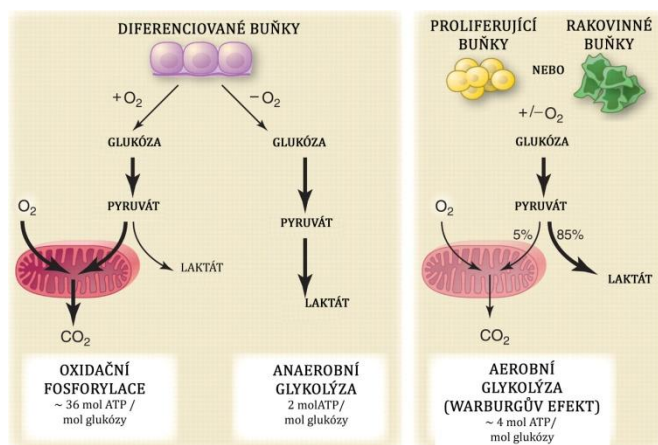
Při fragmentaci dochází k rozdělení mitochondrie na dvě či více samostatných organel. Fragmentace mitochondrií je reakcí organismu na snížené energetické požadavky, slouží k eliminaci špatně fungujících mitochondrií (např. při přílišné produkci ROS) [128] a je nutnou součástí apoptotického odstranění buněk. Rozdělení mitochondrií obstarávají GTPasové proteiny podobné dynaminům (Drp1), nacházející se převážně v cytoplazmě a na výběžcích mitochondrií. Při jejich aktivaci dochází k jejich translokaci do mitochondrie, kde vytváří „škrtící kroužek“ kolem mitochondrie, který pak za spolupráce s cytoskeletálními proteiny mitochondrii rozdělí [104].

1.8.3. Dynamika mitochondrií během apoptózy

Proteiny mitochondriální dynamiky mají významnou roli v regulaci apoptózy nebo při jejím průběhu. Protein Drp1 stimuluje tvorbu PTP v mitochondriální membráně a dále propaguje již probíhající programovanou buněčnou smrt fragmentací mitochondrií. Bývá často kolokalizován s proapoptotickými proteiny Bak a Bax [129], které sumoylací modifikují Drp1 pro jeho lepší začlenění do mitochondriální membrány [104]. Imunoprecipitací byla prokázána interakce Bak a Bax s mitofuziny, což naopak snižuje citlivost k apoptóze inhibicí tvorby PTP. Citlivost k apoptóze snižuje též OPA1, který zadržuje cyt *c* uzavřený v kristách a zabraňuje jeho spontánnímu vylití do cytoplazmy buněk [99].

1.9. Warburgův efekt: Mitochondriální kontrola buněčné proliferace

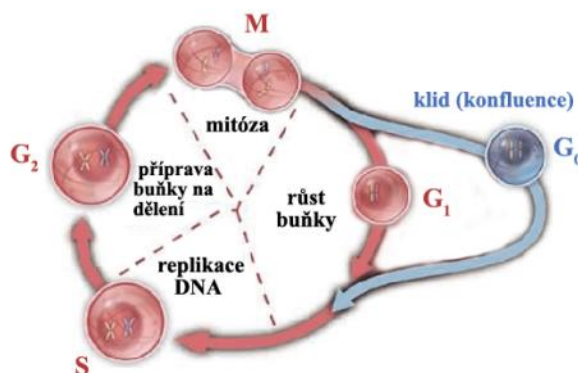
Otto H. Warburg roku 1924 zjistil, že nádorové buňky mají zvýšenou míru anaerobní glykolýzy a naopak sníženou míru oxidační fosforylace nezávisle na dostupnosti O₂. Buňky při tomto ději získávají většinu ATP odbouráváním glukózy na pyruvát a následně laktát, přestože energetický zisk z jedné molekuly glukózy je při anaerobní glykolýze pouze 2 molekuly ATP oproti 36 molekulám ATP, které by buňce poskytla oxidační fosforylace při kompletní oxidaci molekuly glukózy. Obdobně se chovají rychle proliferující buňky, které si tímto na první pohled nevýhodným posunem metabolismu zajišťují rychlý přísun ATP a intermediátů nutných pro biogenezi a rychlou proliferaci. Zhruba 10 % vzniklého pyruvátu je využito v biosyntetických reakcích a malá část je i nadále oxidačně odbourávána v citrátovém cyklu. Jedna molekula glukózy tak poskytuje buňce asi 4 molekuly ATP (ilustrativně na Obr. 19, str. 38) [7]. K Warburgovu efektu vede např. nadměrný rozpad mitochondrií a redukce mitochondriální biogeneze, změny exprese onkogenů a tumorových supresorů, někdy i mitochondriální defekty. Výhodnost Warburgova efektu vysvětluje snížení buněčné respirace a produkce ROS, což umožní stimulaci většiny proliferačních signálů (NF- κ B, p53, RAF, HIF-1 aj.) a maximální aktivitu proliferačních kináz (např. AKT, ERK 1 a 2) [85].



Obr. 19 – Warburgův efekt – Schematické zobrazení metabolických rozdílů mezi proliferujícími, resp. nádorovými, a diferenciovanými buňkami. Neproliferující buňky (diferenciované) za přítomnosti O_2 glykolyticky odbourávají glukózu na pyruvát, který je v mitochondriích kompletně oxidován na CO_2 , za zisku 36 molekul ATP. Při omezené dostupnosti O_2 je pyruvát přeměněn anaerobní glykolýzou na laktát a ten je vyloučen z buňky za zisku pouhých 2 molekul ATP. Warburgův efekt popisuje děj, při kterém proliferující nebo rakovinné buňky i za přítomnosti dostatečného množství O_2 přeměňují většinu glukózy anaerobní glykolýzou na laktát. Mitochondrie zůstávají však nadále funkční, a tak je malá část pyruvátu přeměněna oxidačně v oxidační fosforylaci za průměrného zisku asi 4 molekul ATP/1 mol glukózy. Zhruba 10 % vzniklého pyruvátu je využito v biosyntetických reakcích. Upraveno dle [7].

1.10. Buněčný cyklus

Všechny proliferující buňky prochází buněčným cyklem, který má 4 fáze (viz Obr. 20). Po dlouhé vegetační růstové fázi G_1 následuje fáze S, ve které dochází k replikaci DNA. Po úspěšné replikaci následuje krátká růstová fáze G_2 , ve které se buňka připravuje na samotné dělení a znásobuje svůj biologický materiál. Následující mitotické dělení se označuje jako fáze M. Po kontrole úspěšného rozdělení dceřiné buňky opět vstupují do fáze G_1 respektive G_0 a tím se celý cyklus uzavírá. Přechod mezi jednotlivými fázemi je řízen mnoha kontrolními mechanizmy, mezi nejvýznamnější patří cyklindependentní kinasy reagující na hladinu cyklinů měnící se v průběhu cyklu. Tento systém je konzervovaný u všech organismů od kvasinek po savce [130-132].



Obr. 20 – Cyklus buněčné proliferace zahrnuje fáze postupně označované jako G_1 , S, G_2 a M. Po M fázi může opět následovat fáze G_1 , nebo zastavení buněčného dělení vstupem do klidové fáze buněčného cyklu G_0 . Upraveno dle [131].

Většina lidský diferenciovaných buněk se dále aktivně nedělí a setrvávají v klidové fázi. Tato fáze je označována jako G_0 , a i když je často považována za pozměněnou fázi G_1 , bývá většinou z buněčného cyklu vyčleněna. Některé buňky setrvávají po své diferenciaci v buněčné fázi G_0 po celou dobu své existence [133], jiné jako jsou například lymfocyty, fibroblasty či endoteliální buňky, mohou být vhodným vnějším podnětem opět aktivovány. K tomu u lymfocytů dochází v případě nutné imunitní odpovědi, rozpoznáním antigenu na receptoru buněk [134] nebo v případě aktivace fibroblastů a endoteliálních buněk odpovídajícími růstovými faktory při obnově či tvorbě nové tkáně. Schopnost buněk vstupovat do klidového stavu a opět jej opouštět je velmi důležitá pro organismus při udržování buněčné homeostázy nebo v případě odolávání organismu poškození a jiným hrozbám [131].

2. Cíl práce

Cíle této práce je možné shrnout do několika bodů:

1. Stanovit citlivost k buněčné smrti a míru produkce reaktivních forem kyslíku v proliferujících a konfluentních endoteliálních buňkách s funkčním a defektním oxidačním řetězcem.
2. Charakterizovat dýchací řetězec a mitochondriální morfologii v proliferujících a konfluentních endoteliálních buňkách.
3. Charakterizovat antioxidační systémy proliferujících a konfluentních buněk.
4. Stanovit a porovnat hladinu exprese pro- a antiapoptotických proteinů v těchto buňkách.

3. Materiál

3.1. Chemikálie

2–merkptoethanol – Fluka

2–NBDG – Life Technologies

6–aminokapronová kyselina – Sigma Aldrich

ABT 737 – Santa Cruz

Annexin V konjugovaný s FITC – Becton, Dickinson and Company

Antimycin A – Sigma Aldrich

ATP – Sigma Aldrich

ATX Ponceau S – Fluka

Bisakrylamid – BioRad

Bistris – Serva

Brilliant Blue G – Sigma Aldrich

Bromfenolová modř – Sigma Aldrich

BSA pro BCA – Thermo Scientific

BSA pro WB – Sigma Aldrich

CaCl₂ - Fluka

Cytochrom *c* (oxidovaný) – Sigma Aldrich

DAB – Sigma Aldrich

Deoxycholát sodný (monohdrát) – Fluka

dH₂O – vlastní destilace

DCH2F–DA – Cell Signaling Technology

Digitonin – Sigma Aldrich

Doxorubicin hydrochlorid – Sigma Aldrich

EDTA – Fluka

EGTA – Fluka

EtOH (pro UV spektroskopii (99.8 %)) – Lach–Ner

FBS – Life Technologies

Fenazin methosulfát – Sigma Aldrich

Glutamin – Sigma Aldrich

Glycerol – Sigma Aldrich

Glycin – Serva

HAT Supplement – Life Technologies

HCl – Lachema
HEPES – Sigma Aldrich
Hoechstst 33342 – Sigma Aldrich
KH₂PO₄ – Lachema
KOH - Lachema
Kyselina octová – Penta
Malonát – Sigma Aldrich
MCB – Sigma Aldrich
Menadion – Sigma Aldrich
MeOH – Penta
MgCl₂ · 6H₂O – Fluka
MgSO₄ – Sigma Aldrich
MitoVES – syntetizován Janem Štursou (UOCHB, AV ČR)
Mléko – Sušené odtučněné mléko, Bohemilk, a.s.
MOPS – Sigma Aldrich
Na₂HPO₄ – Lachema
NaCl – Serva
NADH – Serva
NaH₂PO₄ – Lachema
n-Dodecyl β-D-maltosid – Sigma Aldrich
NP-40 – Sigma Aldrich
NTB – Serva
Paklitaxel – Sigma Aldrich
Pb(NO₃)₂ – Lachema
PBS – Active Motif
PEITC – Sigma Aldrich
Penicilin G (sodná sůl) – Sigma Aldrich
Peroxid vodíku – Sigma Aldrich
Peroxodisíran amonný – Amersham Biosciences
PI – Molecular Probes
PIC (P8340) – Sigma Aldrich
Pyronin y – Sigma Aldrich
Pyruvát sodný – Sigma Aldrich

Rotenon – Sigma Aldrich
Sacharóza – Sigma Aldrich
SDS – Sigma Aldrich
Staurosporin – LC Laboratories
Streptomycin (síran) – Sigma Aldrich
Taurin – Sigma Aldrich
TEMED – Fluka
Tricine – Serva
Tris báze (Trizma ® báze) – Sigma Aldrich
Tween 20 ® – Sigma ALdrich
Uridin – Sigma Aldrich

3.2. Protilátky

3.2.1. Primární protilátky

Aktin (I-19) – Santa Cruz
Bcl-x_L – Cell Signaling
COXIV – Abcam
Mcl-1 – Santa Cruz
MTCO1 – Abcam
MTCO2 – Abcam
NDUFB8 – Abcam
NDUFS1 – Abcam
NDUFS3 – Abcam
SDHA – Abcam
SOD2 – Acris
Total Oxphos Coctail – Abcam (SDHA, ATP5A, UQCRC2, NDUFA9, Cox IV)
UQCRC2 – Abcam
VDAC1 – Abcam
β-Aktin (HRP) – Cell Signaling

3.2.2. Sekundární protilátky

kozí anti-imunoglobulin G konjugovaná s křenovou peroxidasou – Sigma Aldrich
králičí anti-imunoglobulin G konjugovaná s křenovou peroxidasou – Sigma Aldrich
myší anti-imunoglobulin G konjugovaná s křenovou peroxidasou – Sigma Aldrich

3.3. Média

Médium 1

DMEM 12–604 (Dulbecco's Modified Eagle Medium) – Lonza

obohacení:

FBS (10 % w/v)

HAT Supplement (2 % w/v) – Life technologies

(hypoxantin (5 mM), aminopterin (20 μ M), thymidine (0,8 mM))

Penicilin G (sodná sůl) (100 U/ml)

Streptomycin (síran) (100 μ g/ml)

Médium 2

Médium 1

obohacení:

Pyruvát sodný (1 mg/ml)

Uridin (0,05 mg/ml)

HEPES (pH 7,2) (2mM)

Glutamin (0,03 % w/v)

Neesenciální aminokyseliny (1 % w/v) – Life Technologies

(Glycin (750 mg/ml), L–Alanin (890 mg/ml), L–Asparagin (1320 mg/ml),

L–Aspartát (1330 mg/ml), L–Glutamát (147 mg/ml), L–Prolin (1150 mg/ml),

L–Serin (1050 mg/ml))

MIR05 (Respirační médium pro mitochondrie)

Sacharóza (110 mM)

EGTA (0,5 mM)

MgCl₂ · 6H₂O (3 mM)

K–laktobionát (60 mM)

Taurin (20 mM)

KH₂PO₄ (10 mM)

HEPES (20 mM)

BSA (1 g/l)

pH upraveno na 7,1 (1 M KOH)

3.4. Pufry

10x Annexin V vázající pufr (komerčně od Dickinson and Company)

Hepes (0,1 M)

NaCl (1,4 M)

CaCl₂ (25 mM)

Anodový pufr

Bistris (50 mM)

pH upraveno na 7,0 (1 M KOH)

BNE katodový pufr

Bistris (15 mM)

Tricine (50 mM)

pH upraveno na 7,0 (1M KOH)

Brilliant Blue G (0,02 % w/w)

přefiltrováno

Extrakční pufr (EP)

6–aminokapronová kyselina

Bistris (50 mM)

EDTA (0,5 mM)

pH upraveno na 7,0 (1 M KOH)

hr–CNE–3 katodový pufr

Bistris (15 mM)

Tricine (50 mM)

pH upraveno na 7,0 (1 M KOH)

Monohydrát deoxycholátu sodného (0,05 % w/w)

n–Dodecyl β–D–maltosid (0,01 % w/w)

IBc pufr (dle [135])

Sacharóza (0,2 M)

EGTA (2 mM)

(1 ml 0,2 M EGTA do 100 ml pufru, pH upraveno Tris bází na 7,4)

Tris báze (10 mM)

(10 ml 0,1 M Tris báze do 100 ml pufru, pH upraveno MOPS na 7,4)

pH upraveno na 7,4 (1 M KOH)

Nanášecí pufr BNE

6–aminokapronová kyselina (0,75 M)

Bistris (50 mM)

EDTA (0,5 M) 0,1 % (w/w)

pH upraveno na 7 (1 M KOH)

Brilliant Blue G (5 % w/w)

Glycerol (12 % v/v)

Nanášecí pufr hr–CNE

Glycerol (50 % v/v)

ATX Ponceau S (0,1 % v/v)

Odmývací pufr

Glycin (0,2 M)
pH upraveno na 2,2 (1 M HCl)
SDS (0,1 % v/v)
Tween 20 (1 % v/v)

RIPA pufr

NP-40 (1% w/v)
SDS (0,1 % w/v)
NaCl (10 mM)
Deoxycholát sodný (0,5 % w/v)
EDTA (1 mM)
Tris-HCl pufr pH 7,4 (50 mM)

SDS-PAGE pufr

Tris báze (25 mM)
Glycin (192 mM)
SDS (5 % w/v)

Sodno fosfátový pufr (pH 7,2)

Na_2HPO_4 (0,28 M)
 NaH_2PO_4 (0,72 M)
pH upraveno na 7,2 (1 M NaOH)

STE pufr

Sacharóza (250 mM)
Tris báze (10 mM)
EDTA (1mM)

TBS pufr

Tris báze (10 mM)
NaCl (152 mM)
Tween 20 (0,05 % v/v)

Transferový pufr pro nativní elektroforézu

Tris báze (25 mM)
Glycin (25 mM)
MeOH (10 % v/v)
pH upraveno na 9,2 (1M KOH)

Tris-HCl pufr

Tris báze (dle požadavku)
titrováno 1M HCl na požadované pH

Vzorkový SDS–PAGE pufr (4x SLB)

SDS (8 % w/v)
Glycerol (40 % v/v)
2–merkaptoethanol (20 % v/v)
Bromfenolová modř (0,04 % w/v)
Tris–HCl pH 6,8 (0,25 M)

WB pufr

Tris báze (25 mM)
Glycin (192 mM)
MetOH (20 % v/v)

3.5. Gely**10 %/12 % separační gel**

Tris–HCl pufr (pH 8,8) (380 mM)
Bisakrylamid (10/12 % v/v)
SDS (0,01 % w/v)
Peroxisíran amonný (0,01 % w/v)
TEMED (0,13 % v/v)

Zaostřovací gel

Tris–HCl pufr (pH 6,8) (125 mM)
Bisakrylamid (4 % v/v)
SDS (0,1 % w/v)
Peroxisíran amonný (0,1 % w/v)
TEMED (0,01 % v/v)

4. Metody

4.1. Kultivace buněk

Immortalizovaná linie lidských endoteliálních buněk (Ea.hy926) od *American Type Culture Collection* byla kultivována v CO₂ inkubátoru *MCO-18AC* (*Sanyo*) při 37 °C a 5 % CO₂ v tkáňových lahvích s pěstebním povrchem 150 cm² v kultivačním médiu 1 (viz kap. 3.3.). Buněčné kultury byly každé 3 až 4 dny pasážovány trypsinizací (viz kap. 4.2.) tak, aby nedosáhly konfluence. Stejný postup byl dodržován i pro p0 buňky, které byly pěstovány v médiu 2 (viz kap. 3.3.). Buňky byly průběžně testovány na přítomnost mykoplazmy (bakterie třídy *Mollicutes*) komerčním detekčním kitem *MycoAlert*TM (*Lonza*) dle dodávaného návodu.

4.2. Trypsinizace buněk

Z kultivační nádoby bylo odsáto médium, buňky byly promyty 2 x PBS a poté inkubovány asi 5 min s přiměřeným objemem roztoku trypsinu v PBS (0,25 % w/v) v CO₂ inkubátoru (37 °C/5 % CO₂). Po inkubaci byl trypsin inaktivován asi pětinasobným množstvím kultivačního média. Vzniklá suspenze byla důsledně resuspendována a použita pro další účely.

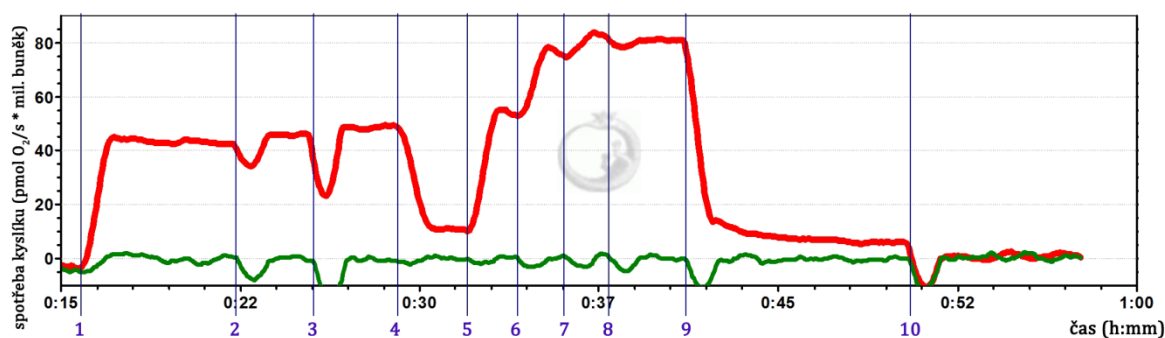
4.3. Počítání buněk

Počet živých buněk v buněčné suspenzi byl změřen pomocí čítače buněk *Innovatis CASY*[®] při 500 násobném zředění v PBS (20 µl buněčné suspenze po trypsinizaci v 10 ml PBS).

4.4. Příprava buněčné linie p0

Buněčná linie Ea.hy926 byla po dobu 2 měsíců pěstována v kultivačním médiu 2 (viz kap 3.3.) za přítomnosti ethidium bromidu (0,2 µg/ml). EtBr se interkaluje přednostně do šroubovice mitochondriální DNA a inhibuje tak možnost její replikace a translace. Nepřítomnost mitochondriální DNA, tedy i mitochondriálně kódovaných komplexů respiračního řetězce, byla potvrzena stanovením respirace na oxygrafu (viz kap 4.8.2.).

V průběhu kultivace bylo pravidelně kontrolováno, zda buňky p0 nezískaly zpět respirační aktivitu (viz Obr. 21, str. 49). Z trypsinizované buněčné suspenze byly odebrány 2 miliony buněk, centrifugovány při pokojové teplotě při 500 g/5 min a buněčná peleta poté resuspendována ve 2 ml média 2 (viz kap 3.3.). Kontrola respirace připravené buněčné suspenze byla provedena v oxygrafu *Oroboros Instruments Oxygraph-2k* dle protokolu pro nepermeabilizované buňky (viz kap. 4.8.2.).



Obr. 21 – Porovnání respirace buněk Ea.hy926 (**červeně**) a $\rho 0$ (**zeleně**) po dodání endogenních substrátů a inhibitorů respiračního řetězce využívaných jako kontrola ztráty mtDNA u $\rho 0$ buněk. **1)** počátek měření, **2)** sukcinát **3)** ADP **4)** Oligomycin **5–8)** FCCP **9)** Rotenon **10)** Antimycin A (reprezentativní experiment).

4.5. Příprava buněk na měření apoptózy, produkce ROS, příjmu glukózy a fáze buněčného cyklu

Buňky, které měly být pro experiment konfluentní, byly vysazeny vždy několik dní předem do 24 jamkové destičky (plocha jamky $1,8 \text{ cm}^2$) tak, aby v konfluentním stavu byly 4 až 5 dní před experimentem. Kultivační médium bylo pravidelně každé 2 až 3 dny vyměňováno (médium 1 pro Ea.hy926, médium 2 pro $\rho 0$ buňky, viz kap 3.3.). Nekonfluentní vzorky byly vysazovány do 6 jamkové destičky (plocha jamky 10 cm^2) 2 nebo 3 dny před experimentálním měřením v množství 200 tisíc, resp. 80 tisíc buněk na jamku. Den před experimentem bylo kultivační médium u vzorků vyměněno a upraveno na objem 1 ml.

4.6. Detekce tvorby intracelulárních ROS

Tvorba ROS byla stanovena pomocí fluorescenční průtokové cytometrie. Pro detekci byla využita fluorescenční sonda 2,7–dichlorodihydrofluoresceindiacetát (DCFH₂–DA), která snadno prostupuje buněčnými membránami. Po vstupu do buňky je DCFH₂–DA buněčnými esterasami deacetylován, čímž ztrácí schopnost procházet membránami zpět. Vzniklý 2,7–dichlorodihydrofluorescein je velmi citlivý k ROS a při kontaktu s nimi se okamžitě oxiduje na 2,7–dichlorofluorescein (DCF), který je fluorescenční v zeleném spektru. Míra fluorescence je tedy proporciální hladině intracelulárních ROS [136].

Mitochondriální membránový potenciál byl stanoven pomocí měření intenzity červené fluorescence tetramethylrhodaminmethylesteru (TMRM). Tato kationtová lipofilní sonda se koncentruje v mitochondriích úměrně velikosti $\Delta\psi_{H^+}$ a míra červené fluorescence tedy reprezentuje relativní hodnotu mitochondriálního membránového potenciálu [137].

Připravené buněčné vzorky (viz kap. 4.5.) byly po dobu 1 hodiny vystaveny apoptotickým a ROS generujícím činidlům uvedeným v Tab. 1, str. 50.

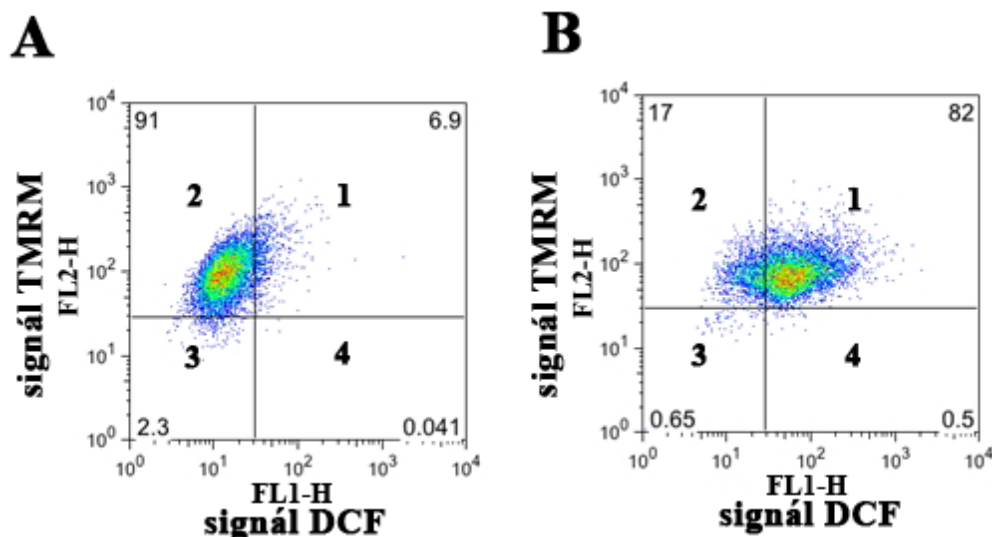
Tab. 1 – Apoptotická a oxidační činidla a jejich koncentrace použité při detekci produkce
Pokud byly pro buňky p0 použity jiné koncentrace činidla, je tak uvedeno v závorce.

| sloučenina | koncentrace (μM) |
|---|---|
| peroxid vodíku (H ₂ O ₂) v PBS | 0; 100; 200; 400; 800; 1200 |
| fenethyl izothiokyanát (PEITC) v EtOH | 0; 1; 2; 3; 5; 7,5 (0; 2,5; 5; 7,5; 10; 20) |
| rotenon v EtOH | 0; 0,5; 2; 5; 20; 40 |
| antimycin A v EtOH | 0; 0,5; 2; 5; 20; 40 |
| menadion v EtOH | 0; 2; 5; 10; 20; 40 |
| staurosporin v DMSO | 0; 0,1; 0,2; 0,5; 1; 1,5 |
| paklitaxel v EtOH | 0; 0,5; 1; 2; 5; 10 |
| doxorubicin v H ₂ O | 0; 0,5; 1; 2; 5; 10 |
| MitoVES v DMSO | 0; 2,5; 5; 7,5; 10; 15 |
| ABT 737 v DMSO | 0; 1; 2,5; 5; 10; 25 |

Přibližně 20 min před koncem inkubační doby byl do jamek přidán DCFH₂-DA do finální koncentrace 5 μM a TMRM do koncentrace 50 nM. Po skončení inkubace byly buňky trypsinizovány (viz kap. 4.2.) a přeneseny do zkumavek pro cytometrii. Vzorky byly následně centrifugovány za pokojové teploty při 400 g/4 min, peleta byla resuspendována ve 200 μl 50 nM TMRM v PBS. Vzorky byly následně inkubovány ve tmě při 4 °C cca 5 min. Tvorba ROS byla detekována pomocí průtokové cytometrie za využití průtokového cytometru *BD FACS Calibur*. K excitaci byl použit argonový laser 488 nm s detekcí oxidovaného DCF na kanálu FL1 („band-pass“ filtr BP530/30 nm) a TMRM na kanálu FL2 („band-pass“ filtr BP585/42 nm). Po změření signálu z 10000 buněk byla získaná data analyzována pomocí programu FlowJo 9.6.2.

Procentuální zastoupení buněk generujících ROS bylo vypočteno pomocí součtu jednotlivých kvadrantů představujících buňky tvořící a netvořící ROS (viz Obr. 22, str. 51). Membránový potenciál byl vyhodnocen jako geometrický průměr signálu na kanálu FL-2.

Pozice kvadrantů byly konstantní v rámci experimentu a u každého experimentu byly nastaveny tak, aby množství buněk v kvadrantech 1, 2, 3, 4 bylo pro kontrolní vzorek vždy přibližně stejné.



Obr. 22 – Grafické znázornění výpočtu procentuálního zastoupení buněk generujících ROS pomocí součtů v jednotlivých kvadrantech. **A)** kontrolní buňky neprodukující ROS **B)** část buněk sezvýšenou produkcí ROS. Kvadrant 1 a 4 – DCF pozitivní buňky – buňky produkující ROS

4.7. Detekce apoptózy

Zastoupení apoptotických a pozdně apoptotických buněk v buněčné populaci bylo detekováno pomocí průtokové cytometrie. Jako fluorescenční značka pro tuto metodu byl použit fluorescenčně značený protein Annexin V–FITC (fluorescein izothiokyanát). Annexin V je Ca^{2+} dependentní protein vykazující preferenční vazbu na fosfolipid fosfatidylserin (PS). Tento fosfolipid se v časných fázích apoptózy objevuje na vnějším povrchu buněčné membrány, kde se normálně nenachází, čímž umožňuje detekci časných apoptotických buněk pomocí Annexinu V. Buňky byly současně inkubovány s propidium jodidem (PI), který se interkaluje do DNA buněk s porušenou buněčnou membránou, což nastává v pozdních fázích apoptózy nebo při buněčné nekróze. Procento buněk pozitivních na Annexinu V–FITC a PI tak umožní určit míru buněčné smrti a její charakter [138].

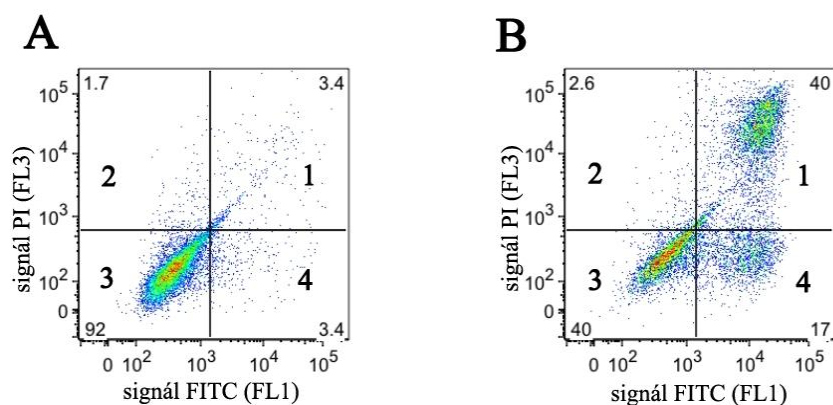
Přípravené buněčné vzorky (viz kap. 4.5.) byly po 22 hodin vystaveny apoptózu indukujícím činidlům v koncentracích, jak ukazuje tabulka (Tab. 2, str. 52).

Tab. 2 – Experimentální apoptotická a oxidační činidla a jejich koncentrace použité při měření apoptózy. Pokud byly pro buňky p0 použity jiné koncentrace činidla, je tak uvedeno v závorce.

| sloučenina | koncentrace (μM) |
|---|---|
| peroxid vodíku (H_2O_2) v PBS | 0; 100; 200; 400; 800; 1200 |
| fenethyl izothiokyanát (PEITC) v EtOH | 0; 2,5; 5; 7,5; 10; 20 |
| rotenon v EtOH | 0; 0,5; 2; 5; 20; 40 |
| antimycin A v EtOH | 0; 0,5; 2; 5; 20; 40 |
| menadion v EtOH | 0; 2; 5; 10; 20; 40 |
| staurosporin v DMSO | 0; 0,1; 0,2; 0,5; 1; 1,5 |
| paklitaxel v EtOH | 0; 0,5; 1; 2; 5; 10 |
| doxorubicin v H_2O | 0; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2 (0; 0,25; 0,5; 1; 2; 5) |
| MitoVES v DMSO | 0; 2,5; 5; 7,5; 10; 15 |
| ABT 737 v DMSO | 0; 1; 2,5; 5; 10; 25 |

Po předepsané době bylo kultivační médium z jamek převedeno do zkumavky určené pro průtokovou cytometrii, kam bylo následně přidáno 400 μl roztoku PBS použitého pro vypláchnutí jamky od zbytku média. Přisedlé buňky byly poté trypsinizovány (viz kap. 4.2.) a trypsinizační roztok inaktivován 500 μl suspenze z odpovídající zkumavky a spolu s buňkami přenesen zpět. Vzorky byly poté centrifugovány při 400 g/4 min za pokojové teploty, propláchnuty 500 μl PBS a opětovně stočeny za stejných podmínek. Buněčná peleta byla poté resuspendována ve 100 μl reakční směsi Annexinu V (1 μl Annexin V–FITC, 10 μl 10x Annexin V vázající pufr (*Becton, Dickinson*), 89 μl 1x PBS). Vzorky pak byly inkubovány ve tmě při 4 °C cca 15 min. Po následném přidání roztoku PI na finální koncentraci 1.5 μM byla buněčná smrt detekována pomocí průtokové cytometrie přístrojem *BD FACS Calibur* s excitací argonovým laserem (488 nm). Signál FITC fluorescence Annexinu V byl zaznamenáván na kanálu FL1 („band-pass“ filtr BP530/30 nm) a PI fluorescence na kanálu FL3 („long-pass“ filtr LP650 nm). Naměřená data z 10000 buněk byla analyzována pomocí programu FlowJo 9.6.2.

Procentuální zastoupení apoptotických buněk bylo po odfiltrování buněčných zbytků vypočteno pomocí součtů hodnot v jednotlivých kvadrantech představujících zastoupení PI pozitivních buněk, PI a FITC pozitivních buněk, FITC pozitivních buněk a negativních buněk (viz Obr. 23, str. 53). Pozice kvadrantů byly konstantní v rámci experimentu a byly nastaveny tak, aby v kvadrantech 1, 2, a 4 kontrolního vzorku každého experimentu bylo vždy přibližně stejné zastoupení buněk.



Obr. 23 – Výchozí graf pro výpočet apoptotických buněk pomocí součtů v jednotlivých kvadrantech. **A)** kontrolní neapoptický vzorek a **B)** vzorek s asi 60 % apoptotických buněk. Kvadrant 1 – PI a FITC pozitivní buňky a kvadrant 4 – FITC pozitivní buňky představují apoptotické buňky, kvadrant 2 – PI pozitivní buňky – pozdně apoptotické a kvadrant 3 – neapoptotické buňky. PI – propidium jodid, FITC – Annexin V–fluorescein izothiokyanát.

4.8. Měření respirace

Princip metody spočívá v měření změn spotřeby kyslíku v uzavřené komoře oxygrafu po přidání exogenních substrátů. Cytoplazmatická membrána buněk je však pro některé používané látky nepropustná, a tak se pomocí detergentu, např. digitoninu, zajišťuje její permeabilizace. Aktivita jednotlivých komplexů pak může být lehce sledována jako první derivace změny koncentrace kyslíku v komoře po přidání exogenních substrátů nebo specifických inhibitorů komplexů OXPHOS.

Jako substrát CI se používá glutamát a malát. Při přeměně malátu na oxalacetát vzniká v citrátovém cyklu NADH, oxalacetát s glutamátem jsou pak v plné míře využity pro transport dalších molekul malátu do mitochondrie. Komplex I se inhibuje rotenonem [139] a CII, jehož substrátem je sukcinát, je inhibován malonátem [140]. Aby probíhala celá oxidační fosforylace, dodává se do reakční směsi ADP jako substrát pro ATP syntas, Pi je již přítomný v médiu MIR05 (viz kap. 3.3.). Inhibice celého ETC lze dosáhnout použitím antimycinu A, který blokuje centrální uzel ETC, komplex III [141]. Maximální míru respirace lze zjistit po přidání činidla disipujícího protonový gradient na IMM, např. FCCP. Takové mitochondrie aktivují svůj respirační aparát na maximální míru, spotřebovávají tak i nejvíce kyslíku, aby rychle vyrovnali ztrátu membránového potenciálu. Pro kontrolu celistvosti mitochondrií se používá cyt *c*, který jako hydrofilní sloučenina nemá na intaktní mitochondrie vliv. Pokud je OMM poškozená dojde vlivem větší dostupnosti cyt *c* ke zvýšení mitochondriální respirace [142].

4.8.1. Měření respirace na permeabilizovaných buňkách

Z trypsinizované buněčné suspenze byly odebrány 2 miliony buněk. Buňky byly centrifugovány za pokojové teploty při 500 g/5 min a buněčná peleta poté resuspendována ve 2 ml média MIR05 (viz kap. 3.3.) a umístěna do komory oxygrafu *Oroboros Instruments Oxygraph-2k*. Komora byla uzavřena a po počátečním stanovení respirace intaktních buněk byl přidán digitonin (5 µg na milion buněk) pro selektivní permeabilizaci cytoplazmatické membrány. Následně byly postupně přidávány substráty a inhibitory komplexů dýchacího řetězce: glutamát a malát (7,5 + 3 mM), ADP (3 mM), cyt *c* (12,5 µM), sukcinát (10 mM), trifluorokarbonylkyanidfenylhydrazon (FCCP, postupně přidáváno v 0,5 µM krocích, max 2 µM), rotenon (0,5 µM), antimycin A (0,5 µM).

4.8.2. Měření respirace na nepermeabilizovaných buňkách

Respirace suspenze 2 milionů buněk byla změřena v příslušném kultivačním médiu v oxygrafu *Oroboros Instruments Oxygraph-2k* za postupného přidávání substrátů a inhibitorů komplexů dýchacího řetězce: oligomycin (2 µg/ml), FCCP (postupně přidáváno v 0,5 µM krocích, max 2 µM), rotenon (0,5 µM), malonát (5 mM), antimycin A (0,5 µM).

4.8.3. Měření respirace čerstvě izolovaných mitochondrií

4.8.3.1. Izolace mitochondrií

Buňky byly po odlití kultivačního média promyty PBS a následně sklizeny seškrábáním do 5 ml PBS. Následovalo stočení při 400 g/5 min/4 °C a promytí buněčné pelety IBC pufrem (viz kap. 3.4.). Po opětovné centrifugaci 500 g/6 min/4 °C byla peleta resuspendována ve 3 ml pufru IBC a 5 min homogenizována na ledu v Potterově homogenizátoru s teflonovým tloučkem (1600 rpm, hřídelové míchadlo *Ika® – Eurostar Power B*). Homogenát byl centrifugován 900 g/10 min/4 °C. Odebraný supernatant byl následně centrifugován 7000 g/10 min/4 °C a vzniklá peleta resuspendována v 1 ml IBC pufru. Opětovná centrifugace jako v předchozím kroku poskytla přečištěnou mitochondriální frakci, která byla dle množství resuspendována ve 100 µl až 250 µl IBC pufru. Takto připravené vzorky byly ponechány 1 hodinu na ledu, zatímco byla stanovena koncentrace proteinů ve vzorku pomocí metody BCA (viz níže).

4.8.3.2. Stanovení proteinu metodou BCA

Principem kolorimetrické detekce a stanovení koncentrace proteinu metodou BCA ve vzorku je reakce bicinchoninové kyseliny chelatující atom Cu^+ , který vzniká biuretovou reakcí z Cu^{2+} a bílkoviny v alkalickém prostředí. V přítomnosti proteinů, konkrétněji peptidových vazeb a aminokyselin cysteinu, tryptofanu a tyrosinu [143], a kyseliny bicinchoninové ve vzorku, vzniká fialově zabarvený komplex s absorpčním maximem při 562 nm. Intenzita zabarvení lineárně odpovídá koncentraci proteinu v rozmezí 0 až 30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ [144].

Byla připravena kalibrační řada hovězího sérového albuminu (BSA) odpovídající konečnému množství 0, 5, 10, 20 a 30 μg proteinu v 15 μl roztoku. Vzorky byly ředěny 3 až 10 x v dH_2O na výsledný objem 15 μl . Ke všem vzorkům a standardům bylo pipetováno 300 μl reakční směsi *BCA protein Assay kitu* (*Genetica Pierce*, Roztok A:Roztok B = 50:1) a tato reakční směs byla zahřáta v bločku (*Eppendorf Thermomixer Comfort*) 25 min na 37 °C. Následně byla reakční směs nanášena po 100 μl na 96 jamkovou destičku (3 x 100 μl od jednoho vzorku) a byla změřena absorbance při 570 nm (spektrofotometr *Tecan Sunrise*). Výsledná koncentrace byla vypočtena dle kalibrační křivky BSA.

4.8.3.3. Měření respirace izolovaných mitochondrií

Izolované mitochondrie o známé koncentraci byly Hamiltonovou stříkačkou aplikovány do předem připravených a kalibrovaných jamek oxygrafu *Oroboros Instruments Oxygraph-2k* naplněných médiem MIR05 [145], složení viz kap. 3.3, tak, aby aplikované množství mitochondrií (100 – 250 μg) bylo pro nekonfluentní a konfluentní vzorek stejné. Po ustálení respirace byly postupně přidávány substráty dle Tab. 3, str. 56. Výsledný graf byl vyhodnocen v programu OROBOROS DatLab 5.0.9.1113 a získané hodnoty dále zpracovány v programu GraphPrism 5.0.

Tab. 3 – Substráty a inhibitory respiračních komplexů a jejich koncentrace použité při měření respirace izolovaných mitochondrií.

| substrát | výsledná koncentrace (mM) |
|---|---|
| glutamát + malát (5:2) | 7,5 + 3,0 |
| adenosindifosfát (ADP) | 3,0 |
| cytochrom <i>c</i> | $1,25 \times 10^{-2}$ |
| sukcinát | 10,0 |
| trifluorokarbonylkyanidfenylhydrazon (FCCP) | 5.0×10^{-4} až 2×10^{-5} (po 0,5 μ M) |
| rotenon | 5×10^{-4} |
| malonát | 5,0 |
| antimycin A | $0,5 \times 10^{-3}$ |

4.9. Detekce exprese proteinů

4.9.1. Příprava vzorků

4.9.1.1. Příprava celobuněčného lyzátu

Do kultivační nádoby bylo po odstranění kultivačního média a promytí přisedlé buněčné kultury PBS pufrem aplikováno přiměřené množství pufru RIPA (viz kap. 3.4.) s 1 % směsí proteasových inhibitorů (PIC), tak aby s přebytkem pokryl celý pěstební povrch. Po 45 min inkubaci směsi na třepače na ledu byla suspenze přenesena do zkumavky a pro odstranění nelyzovaných buněk centrifugována při 500 g/5 min/4 °C. Proteinový obsah ve vzniklém supernatantu, který představoval celobuněčný lyzát, byl stanoven metodou BCA (viz kap. 4.8.3.2.).

4.9.1.2. Příprava buněčných frakcí

Buňky byly po odlití kultivačního média promyty PBS a následně sklizeny seškrábáním do 5 ml PBS. Následovalo stočení při 400 g/5 min/4 °C a promytí buněčné pelety pufrem STE s 1 % PIC (viz kap. 3.4.). Po odstranění supernatantu a opětovné centrifugaci při 400 g/5 min/4 °C byla buněčná peleta zmrazena v – 80 °C. Po rozmražení na ledu byly vzorky resuspendovány v 3 ml STE pufru s 1 % PIC a 15 min homogenizovány na ledu v Potterově homogenizátoru s teflonovým tloučkem (1600 rpm, hřídelové míchadlo *Ika*® – *Eurostar Power B*). Homogenát byl centrifugován 600 g/10 min/4 °C. Supernatant 1 byl uchován a peleta 1, kterou tvořila převážně jádra, byla přečištěna resuspendací a centrifugací za stejných podmínek jako v předchozím kroku a poté inkubována 30 min na ledu v pufru RIPA (viz kap. 3.4.) s 1 % PIC. Poté byla suspenze centrifugována při 16000 g/5 min/4 °C a vzniklý supernatant 2 byl uchován pro další použití jako jaderná frakce. Odebraný supernatant 1 byl centrifugován při 10000 g/20 min/4 °C a vzniklá peleta 2

resuspendována v STE pufru 1 % PIC. Opětovná centrifugace resuspendované pelety 2 jako v předchozím kroku poskytla přečištěnou mitochondriální frakci, která byla dle množství resuspendována ve 100 µl až 250 µl STE pufru. Supernatant 2, reprezentující cytosolickou frakci, byl znovu přečištěn centrifugací při 10000 g/20 min/4 °C. V takto připravených frakcích byla stanovena koncentrace proteinů pomocí metody (viz kap. 4.8.3.2.).

4.9.2. SDS–Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (SDS–Page)

Vzorky byly před nanesením na gel upraveny na stejný objem pomocí lyzačního pufru RIPA (viz kap. 3.4.), smíchány se vzorkovým nanášecím pufrům pro SDS–elektroforézu v poměru 3:1 (4 x SLB, viz kap. 3.4.) a zahřáty na 99 °C po dobu 5 min. Dle předpokládané velikosti stanovovaných proteinů byl 10 % nebo 12 % separační polyakrylamidový gel tloušťky 1,5 mm zalit 13 % zaostřovacím gelem (viz kap. 3.5.). Do jamek byly aplikovány připravené vzorky a 5 µl standardu (*Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standards – Bio–Rad*), upraveného na stejný objem příslušnými pufrů jako vzorky. Aparatura pro elektroforézu (*Bio–Rad*) byla naplněna SDS–PAGE pufrům (viz kap. 3.4.) a poté spuštěna při 100 V a 0,4 A po dobu cca 1,5 hod než čelo vzorků dosáhlo vzdálenosti asi 0,5 cm od konce gelu.

4.9.3. „Western–blot“ (Přenos proteinů na nitrocelulózovou membránu)

Gel vyjmutý z elektroforetické aparatury a zbavený zaostřovacího gelu byl spolu s nitrocelulózovou membránou (rozměr pórů 0,2 µm, *Whatman*) vložen do kazety pro transfer proteinů a umístěn do „blotovací“ aparatury (*Bio–Rad*) naplněné WB pufrům (viz kap. 3.4.). Transfer proteinů probíhal při 0,3 A (na 1 membránu) po dobu 90 min v 4 °C.

4.9.4. Inkubace a vyhodnocení membrány

Získaná nitrocelulózová membrána s přenesenými proteiny byla před použitím blokována v 5 % (w/v) roztoku odtučněného mléka v pufru TBS (dále jen 5 % mléko, viz kap. 3.4., a poté v 5 % mléce s primární protilátkou 1:500 až 1:10 000 (většinou dle doporučení výrobce, nebo dle osobních zkušeností, zředění je pro každou protilátku uvedeno u konkrétního snímku) přes noc ve 4 °C. Po odstranění roztoku s primární protilátkou a dvojnásobném promytí v pufru TBS byla membrána inkubována s příslušnou sekundární protilátkou (1:2000 v 5 % mléce) při pokojové teplotě po dobu 1 hodiny. Membrána byla promyta 3 x 5 min pufrům TBS a signál příslušného proteinu byl na membráně vyvolán použitím chemiluminiscenčního substrátu (*Super Signal West Femto maximum sensitivity substrate*), jehož obě složky byly smíchány v poměru 1:1 a použity v množství 300 µl na 1 membránu.

Signál byl detekován pomocí multifunkční CCD kamery *ImageQuant LAS 4000* (*GE Healthcare Life Sciences*) s továrním softwarem. Výsledný snímek byl zpracován v Adobe Photoshop CS3 a množství proteinu porovnávalo jako velikost a sytost zbarvení membrány v místě proteinu.

4.9.5. Znovupoužití membrány

Před případným dalším použitím byla membrána inkubována 1 hod na třepače v odmývacím pufru (viz kap. 3.4.) a poté promyta několikrát puftrem TBS. Nasledné inkubace s protilátkami probíhaly, jak je popsáno výše v kap. 4.9.4.

4.10. Modrá nativní elektroforéza (BNE)

4.10.1. Příprava nativních vzorků

4.10.1.1. Příprava buněk

Buňky vypěstované v Petriho miskách s kultivačním povrchem 150 cm² (3 x konfluentní, 14 x proliferující) byly po promytí PBS sklizeny seškrábáním do cca 5 ml PBS s 1 % PIC. Buněčná suspenze byla po sklizení 3 x centrifugována při 400 g/5 min/4 °C. Po první centrifugaci byla buněčná peleta promyta PBS s 1 % PIC, po druhé byl pouze odstraněn supernatant a po třetí centrifugaci odstraněn zbytkový PBS. Takto připravená buněčná peleta uchována minimálně 1 den v –80 °C.

4.10.1.2. Izolace mitochondrií

Buněčná peleta byla po rozmrazení na ledu resuspendována ve 3 ml pufru STE (viz kap. 3.4.) s 1 % PIC a převedena do Potterova homogenizátoru. Suspenze byla poté 15 min homogenizována na ledu teflonovým tloučkem při 1600 rpm (hřídelové míchadlo *Ika® Eurostar Power B*). Po homogenizaci byl preparát centrifugován při 600 g/15 min/4 °C a vzniklý supernatant centrifugován znovu při 10000 g/20 min/4 °C. Takto získaná mitochondriální peleta byla dále resuspendována v 1 ml STE pufru s 1 % PIC a znovu centrifugována za stejných podmínek. Výsledná peleta představující přečištěné mitochondrie byla důkladně resuspendována v přiměřeném množství pufru STE s 1 % PIC (100 až 250 µl) a obsah mitochondrií stanoven metodou BCA (viz kap. 4.8.3.2.). Získaný preparát byl uchován při –80 °C.

4.10.1.3. Solubilizace mitochondrií

Uchovaná mitochondriální suspenze byla před solubilizací rozmrazena na ledu a centrifugována při 10000 g/10 min/4 °C. Vzniklá peleta byla resuspendována v extrakčním pufru (PE) v množství 75 µl na 250 µg mitochondriálního proteinu, viz kap. 3.4., a poté k ní

byl přidán 20 % (w/v) roztok digitoninu tak, aby 1 g digitoninu připadal na 6 g mitochondriálního proteinu. Vzorek byl důsledně resuspendován, vortexován a ponechán na třepačce (90 rpm) na ledu asi 40 min, přičemž každých 10 min byly vzorky 5 s vortexovány. Po uplynutí stanovené doby byla tato směs centrifugována při 23000 g/45 min/4 °C a ve vzniklém supernatantu stanoven obsah solubilizovaných mitochondriálních proteinů pomocí metody BCA (viz kap. 4.8.3.2.). Vzorky se známou koncentrací proteinu byly v aliquotech po 100 µl uchovány v –80 °C.

4.10.2. Elektroforéza

Připravené vzorky byly naředěny pufrém PE (viz kap. 3.4.) na stejnou koncentraci proteinu a smíchány s nanášecím pufrém pro modrou nativní elektroforézu (viz kap. 3.4.) v poměru 10:1. Proteinový standard 15 µl (*Native Mark™ Protein Std – Invitrogen*) byl upraven pomocí PE na stejný objem jako vzorky a smíchán s nanášecím pufrém ve stejném poměru. Jamky *Invitrogen NativePAGE™ BisTris* gradientového gelu (4–16 % nebo 3–12 %) byly propláchnuty dH₂O a poté 2 až 3 x katodovým pufrém (hr–CNE–3), viz kap. 3.4.. Vnitřek komůrky byl naplněn pufrém BNE (viz kap. 3.4.) a po nanesení vzorků byl okolní prostor vyplněn anodovým pufrém (viz kap. 3.4.). Připravená elektroforéza byla spuštěna ve 4 °C při napětí 60 V. Po cca 2 hod, když vzorky vstoupily do gelu, byl pufr BNE vyměněn za čirý hr–CNE katodový pufr (viz kap. 3.4.) a napětí bylo sníženo na 25 V. Elektroforetická separace probíhala přes noc.

4.10.3. „Western–blot“

Pomocí *Trans–Blot® Turbo™ Transfer Systému* byly proteiny z gelu přeneseny (25 V, max 0,8 A, 30 min) na membránu (*Bio–Rad Immun–Blot PVDF*), která byla před použitím inkubována v koncentrovaném methanolu (MeOH) a poté v dH₂O. Přenos probíhal v transferovém pufru pro nativní elektroforézu (viz kap. 3.4.). Po přenosu proteinů byla membrána odbarvena postupně v koncentrovaném MeOH, dH₂O, 5 % kyselině octové a dH₂O. Pro označení markerů byla membrána inkubována několik min v 0,1 % ATX Ponceau S v dH₂O a poté odbarvena několikrát pufrém TBS (viz kap. 3.4.). Následně byla blokována 5 % mlékem v pufru TBS, inkubována s protilátkami OXHPOS komplexů a vyhodnocována dle kap. 4.9.4.

4.11. Stanovení aktivity mitochondriálních respiračních komplexů (hr–CNE)

Princip metody je založen na rozdělení solubilizovaných mitochondriálních komplexů elektroforézou dle jejich molekulové hmotnosti se snahou zachovat co nejvíce labilních protein–proteinových interakcí. Aktivita jednotlivých komplexů se poté vyhodnocuje jako velikost a sytost barevné sraženiny, která vznikla na gelu přeměnou substrátu konkrétním OXPHOS komplexem. Aktivita CI (NADH:NTB oxidoreduktasa) se zviditelňuje přeměnou NADH a NTB (nitrotetrazolium blue), CII (sukcinát:NTB oxidoreduktasa) přeměnou sukcinátu a NTB. Aktivitu CIII (DAB:cyt *c* oxidoreduktasa) zobrazuje 3,3'-diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB) a cyt *c* a komplex IV (cyt *c* oxidasa) cyt *c*. Hydrolyzou ATP a reakcí vzniklého fosfátu s $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ vzniká působením ATP synthasy na gelu bílá olovnatá sraženina. Toto histochemické stanovení aktivity je popsáno v [146] a upraveno pro lepší reprodukovatelnost [147; 148].

4.11.1. Elektroforéza

Elektroforéza včetně přípravy vzorků probíhala tak, jak je uvedeno v kap. 4.10. pouze s rozdílným nanášecím pufrům (viz kap. 3.4.). Celá elektroforetická separace probíhala s hr–CNE–3 pufrům uvnitř komůrky. Výsledný gel s proteiny byl rozdělen na proužky, aby na každém dílu byl vzorek z konfluentních a proliferujících buněk, a použit pro stanovení aktivity mitochondriálních komplexů.

4.11.2. Katalytická aktivita v gelu

4.11.2.1. Aktivita komplexu I (NADH:NTB reduktasa)

Proužek gelu byl 20 min inkubován v 15 ml reakční směsi (5mM Tris–HCl pufru, pH 7,4, 7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ NADH, 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ NTB). Reakce byla zastavena ve fixačním roztoku (50 % MeOH, 10 % kyselina octová, dH_2O) a po krátké inkubaci byl pruh gelu přenesen do 5 mM pufru Tris–HCl (pH 7,4) a naskenován pro vyhodnocení.

4.11.2.2. Aktivita komplexu II (sukcinát:NTB reduktasa)

Proužek gelu určený pro stanovení aktivity respiračního komplexu II byl 2 hod inkubován v 15 ml reakční směsi (5mM Tris–HCl pufru, pH 7,4, 10 mM sukcinát sodný, 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ NTB, 200 μM fenazinmethosulfát). Reakce byla zastavena fixačním roztokem (50 % MeOH, 10 % kyselina octová v dH_2O) a po krátké inkubaci byl pruh gelu přenesen do PBS a naskenován pro vyhodnocení.

4.11.2.3. Aktivita komplexu III (DAB oxidasa)

Proužek gelu byl přes noc inkubován v 15 ml reakční směsi (50 mM sodnofosfátový pufr (pH 7,2), 2,5 mg/ml DAB) cca 1 den. Po dostatečném vybarvení byl proužek přenesen do PBS a naskenován pro vyhodnocení.

4.11.2.4. Aktivita komplexu IV (DAB:cytochrom c reduktasa)

Proužek gelu byl přes noc inkubován v 15 ml reakční směsi (50 mM sodnofosfátový pufr, pH 7,2, 2,5 mg/ml DAB, 50 μ M cytochrom *c*). Po dostatečném vybarvení „bandu“ byl proužek přenesen do PBS a naskenován pro vyhodnocení.

4.11.2.5. Aktivita ATP synthasy (ATP hydrolasa)

Proužek gelu určený pro stanovení aktivity mitochondriální ATP synthasy byl přes noc inkubován v 15 ml reakční směsi (35mM Tris/270 mM glycinový pufr, pH 8,3, 0,2 % $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, 14mM MgSO_4 , 8mM ATP). Po dostatečném vybarvení bílé sraženiny na gelu byl proužek přenesen do PBS a naskenován pro vyhodnocení.

4.12. Stanovení redukováného glutathionu

Monochlorobiman (MCB) je v základním stavu nefluorescenčním biman. Bimany obecně reagují velmi snadno s nízkomolekulárními thioley, např. glutathionem, N-acetylcysteinem, merkaptopurinem, čímž nabývají fluorescenčních vlastností. MCB reaguje výhradně s GSH, protože je reakce katalyzována GSH-S-transferasou. Reakce MCB s transferasou se tak využívá pro fluorescenční stanovení intracelulárního GSH, protože glutathionový konjugát s MCB má absorpční maximum při 394 nm a emisní maximum při 490 nm [149; 150].

Buňky byly inkubovány při 37 °C a 5 % CO_2 v médiu 1 s 50 μ M MCB po dobu 30 min. Po uplynutí určené doby byly sklizeny stejně jako pro měření tvorby ROS (viz kap. 4.6.) a jejich fluorescence změřena na průtokovém cytometru *BD LSR II* (20000 buněk). Pro excitaci byl použit laser 405 nm a detekční filtry pro MCB na kanálu FL-1 („band pass“ 470BP15 nm). Signál MCB byl po odstranění buněčných zbytků a dubletních signálů metodou FSC-A/FSC-H vyhodnocen jako geometrický průměr signálu na kanálu FL-1.

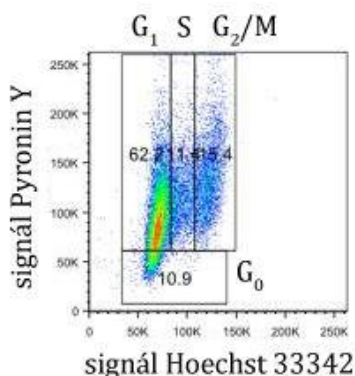
4.13. Stanovení fáze buněčného cyklu

Fáze buněčného cyklu lze detekovat pomocí kombinace fluorescenčních značek, které umožňují stanovit množství DNA a RNA. V průběhu cyklu se v buňce zvyšuje obsah DNA v řadě G_1 , S, G_2/M , naopak obsah RNA zůstává relativně konstantní, ale snižuje se, když buňka vstoupí do klidové fáze G_0 . Pro měření obsahu DNA bylo využito fluorescenční značky Hoechst 33342, který se lehce interkaluje do jaderné (dvouvláknové) DNA, pro značení RNA

byl použit pyronin Y, který se specificky váže na RNA v situaci, kdy je jeho vazba na DNA blokována Hoechst 33342. Buňky s nízkým barvením Hoechst 33342 i pyroninu Y pak reprezentují buněčnou populaci v klidové fázi G₀[151-153].

Buňky vypěstované na stanovení fáze buněčného cyklu dle kap. 4.5. byly 90 min před měřením sklizeny trypsinizací (viz kap. 4.2.) a po centrifugaci (při pokojové teplotě při 400g/5 min) resuspendovány v médiu 1 nebo 2 s Hoechst 33342 o koncentraci 10 µg/ml. Vzorky byly inkubovány ve tmě při 37 °C a 5 % CO₂ a po 45 min byl přidán pyronin Y (výsledná koncentrace 0,5 µg/ml).

Pro měření na průtokovém cytometru *BD LSRII* byly použity excitační lasery pro Hoechst 33342 405 nm (emituje při 450 nm) a pro pyronin Y 561 nm (emituje při 575 nm) a detekční filtr pro Hoechst 33342 „band pass“ 417BP50 a pro pyronin Y filtr „band pass“ 585BP20. Za využití metody FSC–A/FSC–H byly od výběru odstraněny signály zdvojených buněk a buněčných zbytků. Po naměření 20000 buněk při maximálním průtoku 400 buněk/s byly získané grafy vyhodnoceny pomocí programu FlowJo 9.6.2. Po vynesení intenzity fluorescence Hoechst 3342 (osa x) a pyroninu Y (osa y) byly detekovány buněčné populace v G₀, G₁, S, a G₂/M fázích, a to dle korelujícího obsahu DNA a RNA. (viz Obr. 24).



Obr. 24 - Vyhodnocení tečkového grafu z fluorescenční cytometrie. Buňky označené pyroninem Y a Hoechst 33342 lze dle intenzit fluorescenčních značek rozdělit do fází buněčného cyklu (G₀, G₁, S, G₂/M).

4.14. Stanovení příjmu glukózy

2-NBDG (2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Deoxyglukóza) je fluorescenční analog D-glukózy, který buňka nemůže dále přeměňovat v glykolýze a jeho vnitrobuněčná fluorescence je tedy přímo úměrná rychlosti příjmu glukózy buňkou. Excitační a emisní maxima 2-NBDG (465/540 nm) jsou velice podobná maximům fluoresceinu, a tak je její detekce jednoduchá a nepotřebuje žádné speciální filtry [154; 155].

Buňkám připraveným na experiment (viz kap. 4.5.) bylo 24 hodin před měřením vyměněno médium 1 nebo 2 za médium stejného složení se sníženým obsahem glukózy

(1 g/l, DMEM BE12–707F – Lonza). Následně bylo přidáno 50 mM 2–NBDG (v EtOH) na výslednou koncentraci 50 μ M a vzorky byly inkubovány 15 min při 37 °C a 5 % CO₂. Po promytí PBS byly buňky trypsinizovány (viz 4.2.) a převedeny do zkumavek určených pro průtokovou cytometrii. Po centrifugaci při 400 g/4 min při pokojové teplotě, byla peleta resuspendována v 200 μ l PBS a po přidání roztoku PI na výslednou koncentraci 1,5 μ M změřena fluorescence na průtokovém cytometru *BD FACS Calibur*. Pro excitaci byl použit argonový laser 488 nm a detekční filtry pro 2–NBDG na kanálu FL–1 („band pass“ 530BP30 nm) a PI na kanálu FL–3 („long pass“ LP650 nm). Naměřená data byla analyzována pomocí programu FlowJo 9.6.2.. Po odfiltrování mrtvých buněk a buněčných zbytků byl histogram intenzity fluorescence 2–NBDG využit pro analýzu příjmu glukózy buňkami.

4.15. Stanovení produkce laktátu

Základem stanovení množství laktátu je enzymová přeměna přítomného laktátu na pyruvát a H₂O₂ enzymem laktát oxidasou. Přítomnost vzniklého peroxidu vodíku umožňuje přítomné peroxidase chromogenní oxidační kondenzaci, čímž vzniká fialové zbarvení s absorpčním maximem 540 nm. Intenzita zbarvení je přímo úměrná koncentraci laktátu v měřeném vzorku [156; 157].

Buňkám vypěstovaným pro experiment (viz kap. 4.5.) bylo den předem vyměněno kultivační médium za čerstvé o objemu 1 ml. Po 19 hodinách byl z každé jamky přenesen 3 x 1 μ l média do 96 jamkové destičky. Do 2 jamek byl nanesen 1 μ l standardu (*Lactate standard 826–10, Trinity Biotech*) a do dalších 2 jamek stejný objem čerstvého média jako kontrola. Do každé jamky bylo poté přidáno 100 μ l reagens (*Lactate Reagent 735–10, Trinity Biotech*). Po 10min inkubace za pokojové teploty byla změřena absorbance vzorku při 540 nm (*Tecan Infinite® M 200 PRO*) a vypočteno množství laktátu dle vzorce $A_{540}(\text{vzorku})/A_{540}(\text{std}) * 40$.

K jamkám s buňkami, které byly promyty PBS bylo přidáno 500 μ l pufru RIPA (viz kap. 3.4.). Po 40 min inkubaci na ledu na třepačce (80 rpm) byla tato suspenze stočena při 500 g/10 min a v supernatantu změřen obsah proteinů pomocí metody BCA (viz 4.8.3.2.). Vypočtené množství laktátu bylo následně přepočteno na zjištěné množství proteinu.

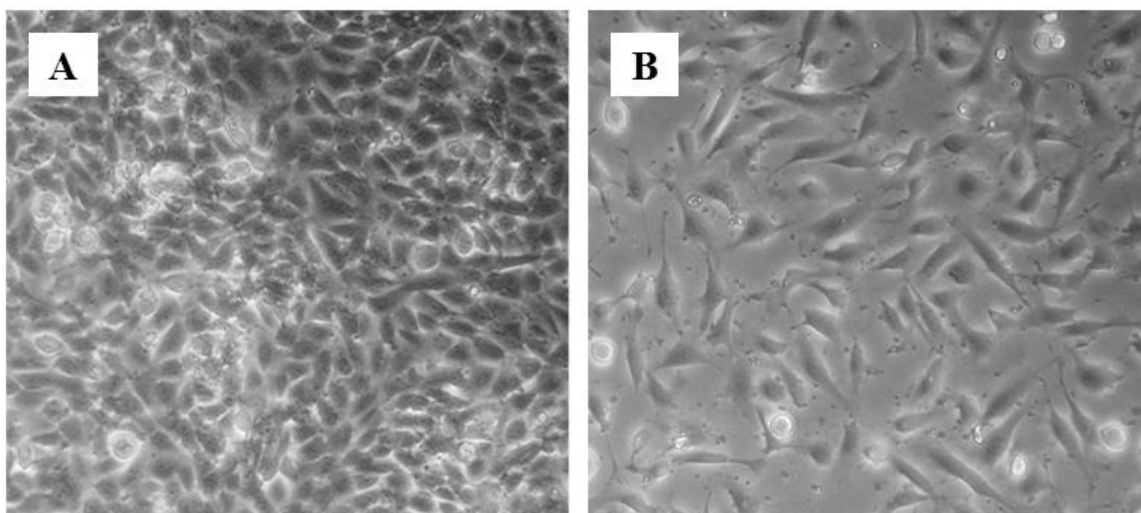
4.16. Studium morfologie mitochondrií

Buňky vypěstované na mikroskopické misce se skleněným dnem byly 1 hod před měřením inkubovány v kultivačním médiu s Hoechst 33342 (2,5 µg/ml) v CO₂ inkubátoru (37 °C/5 % CO₂). Několik minut před měřením bylo u vzorků vyměněno kultivační médium za médium s TMRM (10 nM). Buňky byly následně foceny na fluorescenčním mikroskopu *Leica DMI6000* s konfokálním nástavcem *Leica TCS SP5 AOBS TANDEM* za stále teploty a obsahu CO₂ (37 °C, 5 % CO₂). Parametry pořizování snímků byly následující: excitační laser pro Hoechst 33342 (405 nm) a pro TMRM (561 nm), imerzní objektiv 63x, zoom faktor 5, výška řezu 2 µm, počet řezů 17, velikost snímku 1024x1024 pixelu, velikost pixelu 48x48 nm. Pořízené snímky byly poté dekonvoluovány programem Huygens Professional a délka mitochondrií vyhodnocena v ImageJ 1.47i.

5. Výsledky

5.1. Experimentální model

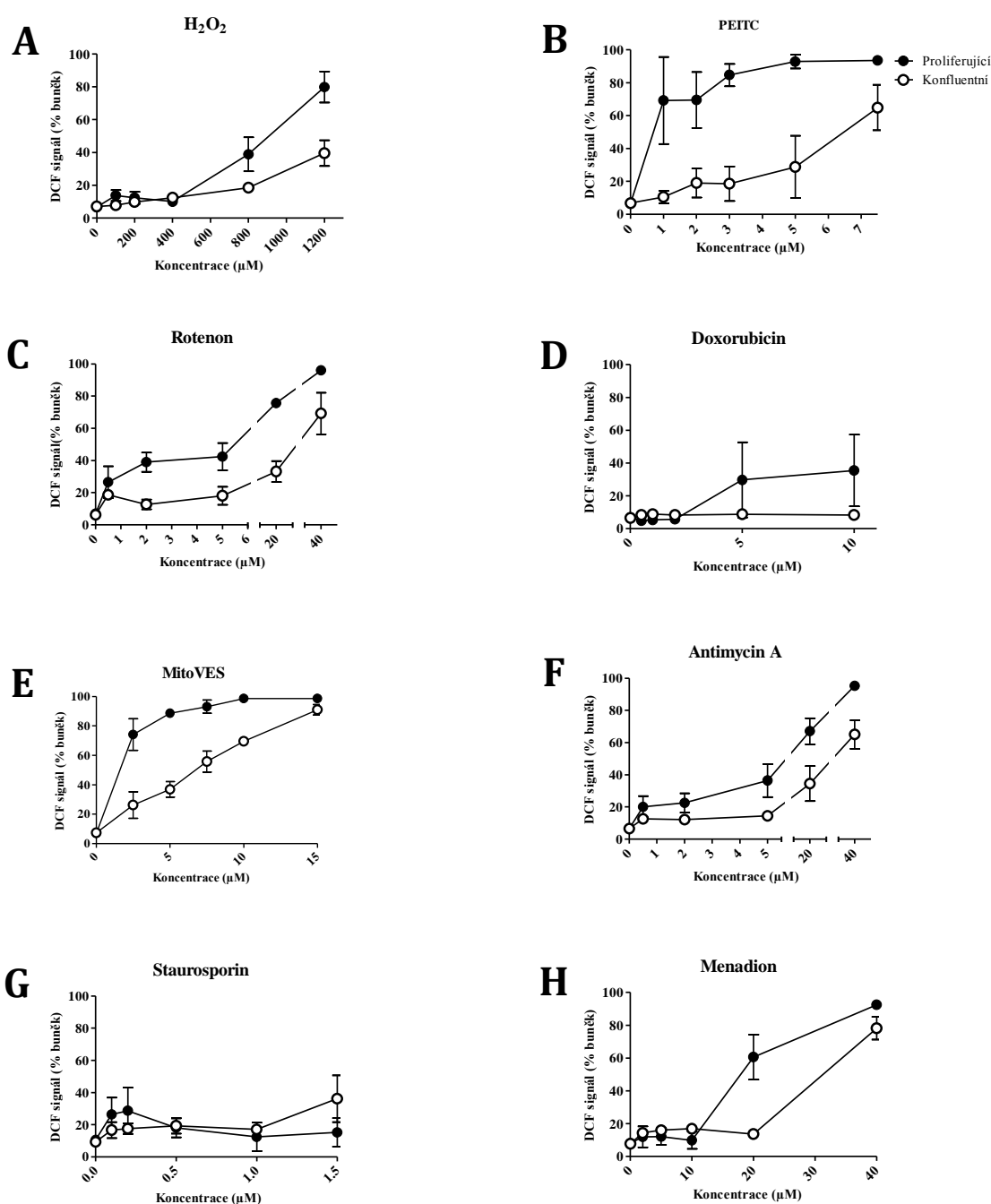
Experimenty byly prováděny na immortalizované linii lidských endoteliální buněk (Ea.hy926). Důležitým praktickým aspektem bylo zajistit, aby testované proliferující a konfluentní buňky byly vystaveny stejnému množství zkoumaného činidla v přepočtu na jednu buňku. Vzhledem k vyšší hustotě konfluentních buněk ve srovnání s buňkami proliferujícími, nekonfluentními, hrozilo reálné riziko, že v případě stejného rozměru kultivační nádoby a stejného objemu média by dávka na jednu buňku proliferující byla výrazně vyšší než u buňky konfluentní. Z toho důvodu byly testovány optimální experimentální podmínky a jako nejvhodnější byla vyhodnocena kultivace konfluentních buněk ve 24 jamkových destičkách s jamkami o ploše $1,8 \text{ cm}^2$ a proliferujících buněk v 6 jamkových destičkách s plochou 10 cm^2 na jamku (viz Obr. 25). V tomto experimentálním systému bylo množství buněk na jamku přibližně 640 tisíc konfluentních a asi 510 tisíc proliferujících (viz kap. 4.3.), což odpovídalo $960 \mu\text{g}$ respektive $1020 \mu\text{g}$ proteinu na jamku (stanovené z celobuněčného lyzátu metodou BCA, viz kap. 4.9.1.1. a 4.8.3.2.). Tímto bylo zajištěno, že při stejném objemu média byly konfluentní i proliferující buňky vystaveny stejnému množství testované látky.

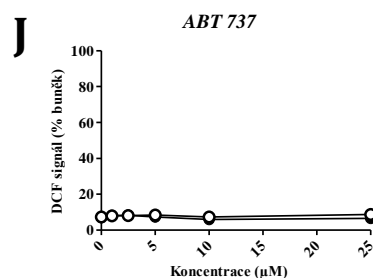
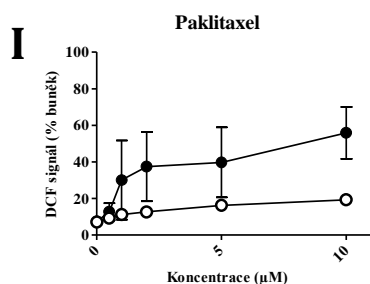


Obr. 25 – Snímky ze světelného mikroskopu zobrazují experimentální kulturu **A**) konfluentních a **B**) proliferujících buněk Ea.hy926. Zvětšeno 100x.

5.2. Produkce ROS buňkami Ea.hy926

Pro detekci míry tvorby reaktivních forem kyslíku byly proliferující a konfluentní buňky Ea.hy926 vystaveny po dobu 1 hod oxidačním činidlům a činidlům generujícím ROS (dle kap. 4.6.). Získaná data Obr. 26 ukazují, že ve všech případech, kdy docházelo k tvorbě ROS, byla tato vyšší u proliferujících buněk než u konfluentních. Největší rozdíly jsou patrné v případě H_2O_2 , PEITC, MitoVES a antimycinu A, zatímco *ABT 737* a staurosporin tvorbu ROS nestimulovaly. Měření mitochondriálního membránového potenciálu pomocí TMRM není ukázáno, neboť neposkytlo žádné významné výsledky.

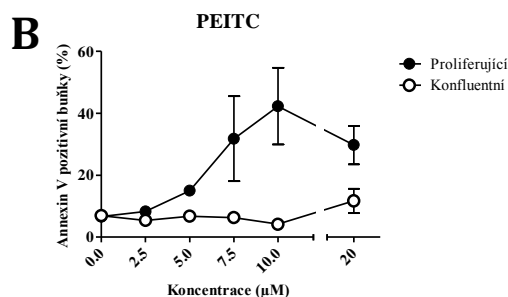
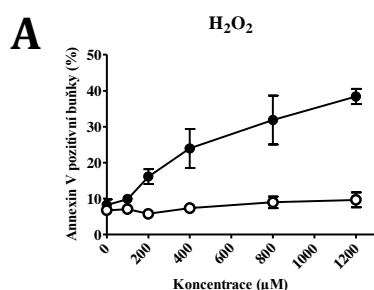


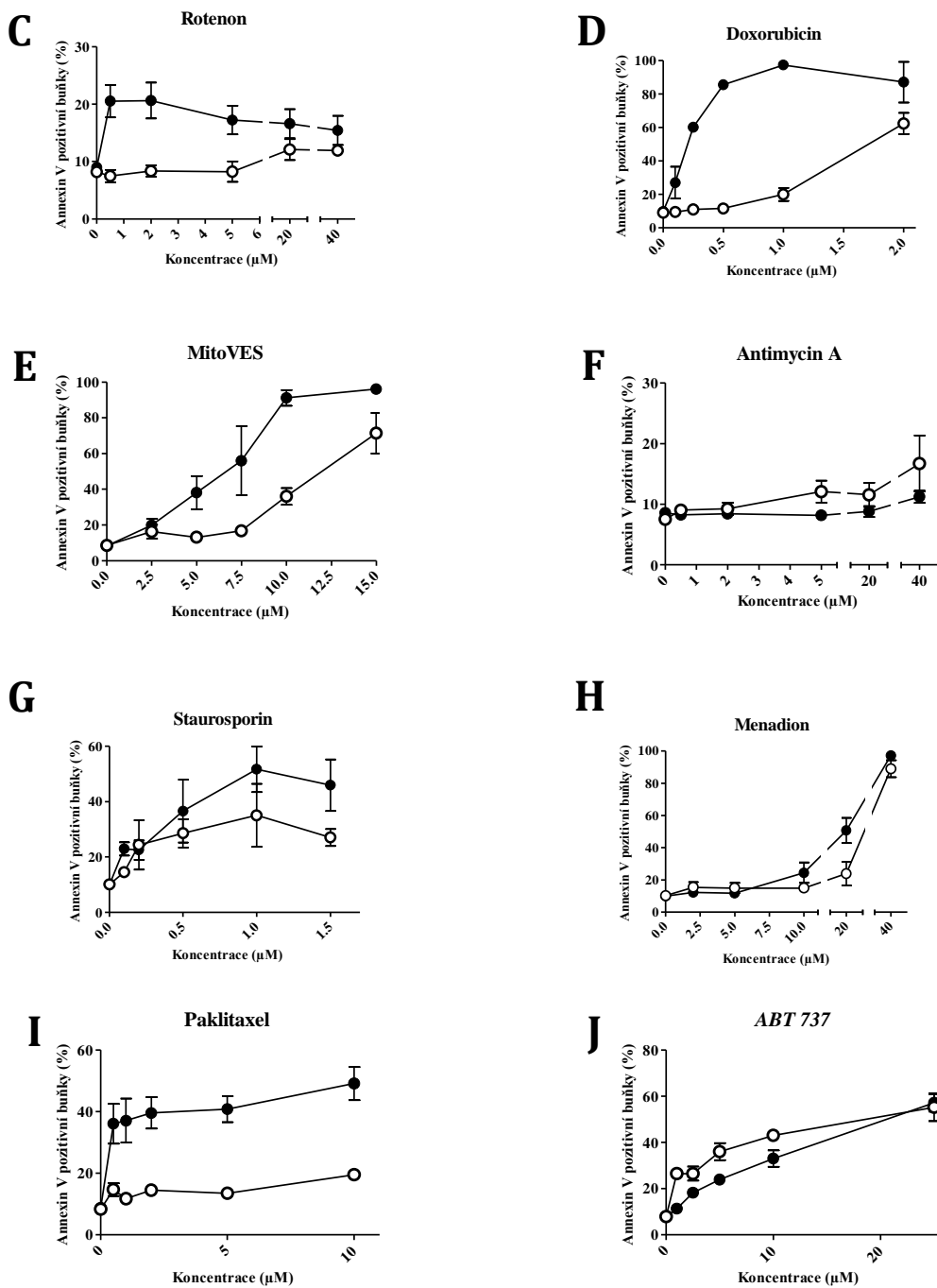


Obr. 26 – Produkce ROS buňkami Ea.hy926. Podíl proliferujících a konfluentních buněk, které vykazovaly vlivem použitých činidel zvýšenou tvorbu ROS. **A)** H₂O₂, **B)** PEITC, **C)** Rotenon, **D)** Doxorubicin, **E)** MitoVES, **F)** Antimycin A, **G)** Staurosporin, **H)** Menadion, **I)** Paklitaxel, **J)** ABT 737. Chybové úsečky: Střední chyba průměru. Počet měření > 3.

5.3. Indukce apoptózy v buňkách Ea.hy926

Zvýšená produkce ROS může v buňkách vyvolat apoptózu. Ke zjištění citlivosti k buněčné smrti byly proliferující a konfluentní buňky Ea.hy926 po dobu 22 hodin vystaveny různým koncentracím činidel indukujících apoptózu (viz kap. 4.7.). Jak zobrazuje Obr. 27, pro většinu testovaných proapoptotických činidel vykazovaly proliferující buňky vyšší citlivost k buněčné smrti, tj. apoptóza byla detekována při nižších koncentracích činidel než u buněk konfluentních. Výrazné rozdíly mezi proliferujícími a konfluentními buňkami byly pozorovány v případě H₂O₂, PEITC, doxorubicinu a paklitaxelu a o něco méně též u MitoVES, menadionu a staurosporinu. Citlivost proliferujících buněk vůči apoptóze nebyla pozorována při použití antimycinu A a ABT 737, u těchto látek byl trend spíše opačný. Zdá se tedy, že většina, proapoptotických činidel vyvolává programovanou buněčnou smrt v buňkách proliferujících při nižších koncentracích než v buňkách konfluentních a proliferující buňky se tedy jeví citlivější vůči buněčné smrti než buňky konfluentní.

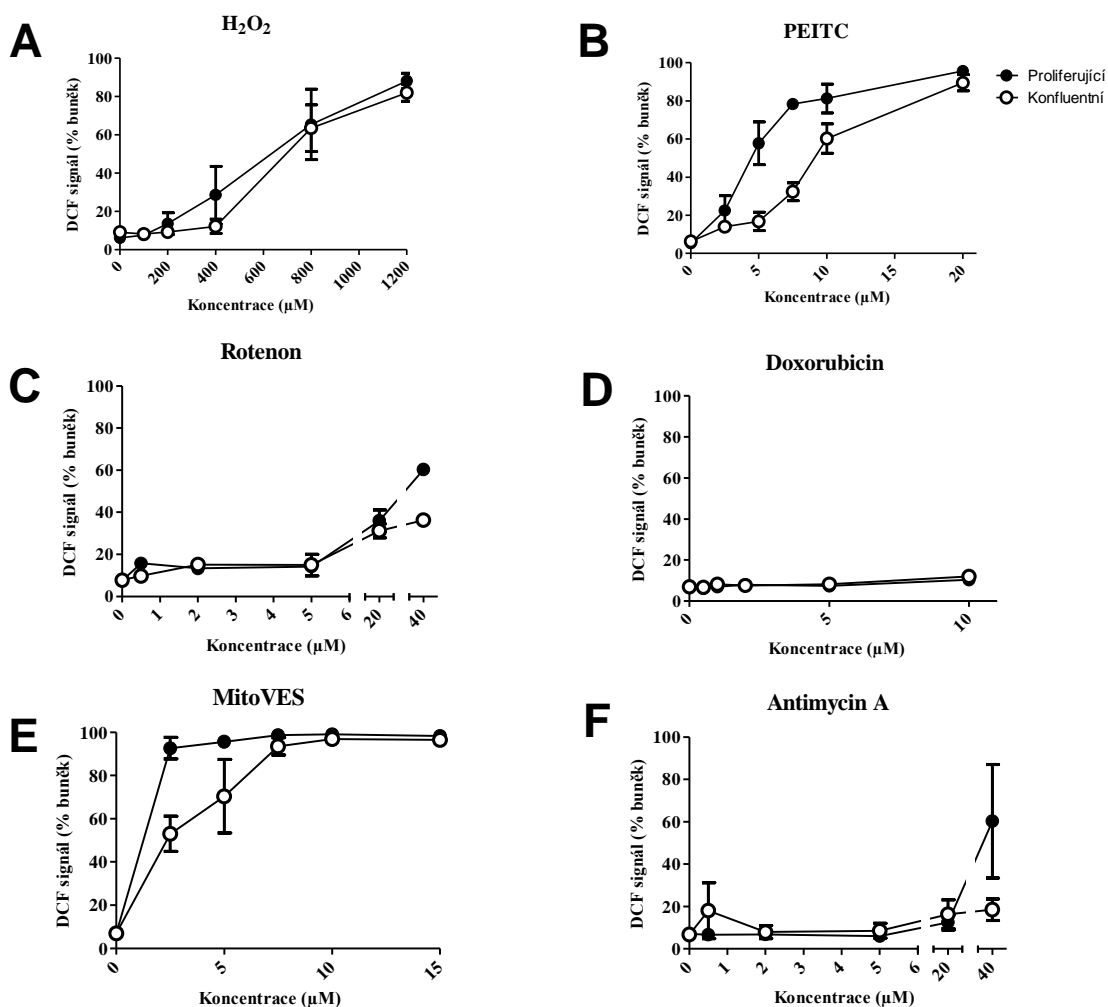


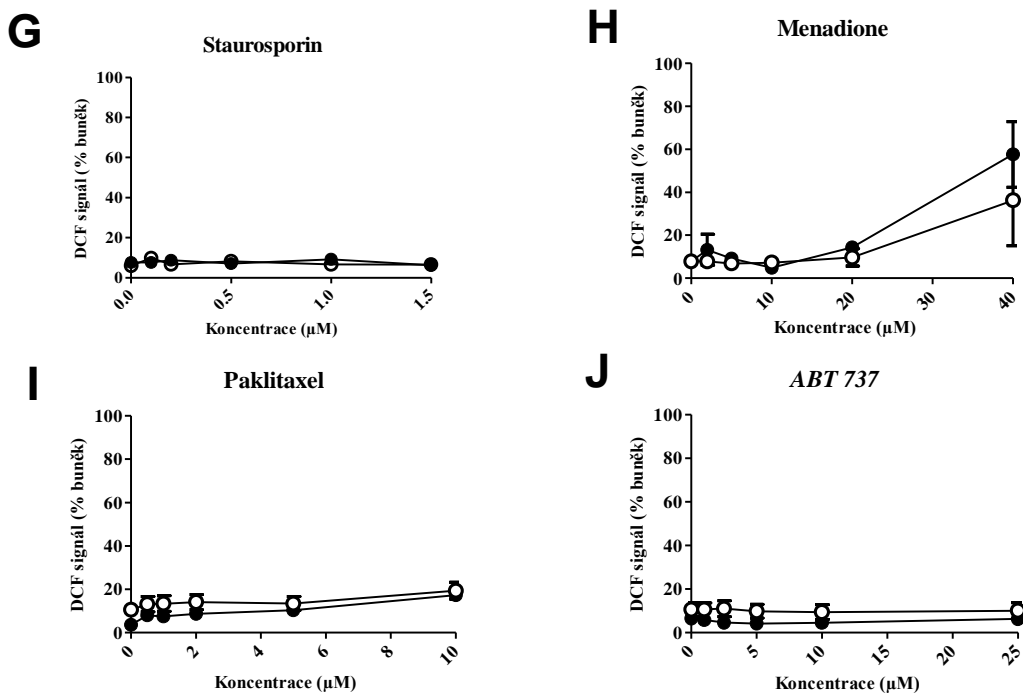


Obr. 27 – Rozdíly v citlivosti proliferujících a konfluentních buněk Ea.hy926 k programované buněčné smrti (apoptóze) vlivem apoptotických činidel o různých koncentracích. **A)** H₂O₂, **B)** PEITC, **C)** Rotenon, **D)** Doxorubicin, **E)** MitoVES, **F)** Antimycin A, **G)** Staurosporin, **H)** Menadion, **I)** Paklitaxel, **J)** ABT 737. Chybové úsečky: Střední chyba průměru. Počet měření > 3.

5.4. Produkce ROS buňkami $\rho 0$

Význam dýchacího řetězce pro tvorbu ROS byl ověřen na experimentech s buněčným typem $\rho 0$, který kromě CII a reverzně pracující ATP synthasy respirační komplexy postrádá. Na Obr. 28 v porovnání s Obr. 26, str. 66/67 je patrné, že vlivem chybějícího respiračního řetězce je tvorba ROS nižší a zanikají rozdíly mezi konfluentními a proliferujícími buňkami. Výrazně menší rozdíly mezi proliferujícími a konfluentními buňkami byly pozorovány pro MitoVES a PEITC, H_2O_2 pak vyvolává tvorbu ROS v obou případech stejnou měrou. Doxorubicin, paklitaxel, staurosporin, antimycin A a *ABT 737* zvýšenou tvorbu ROS nevyvolávají. Vlivem menadionu a rotenonu pak dochází k poměrně překvapivému otočení trendu, tzn. že konfluentní buňky jsou v produkci ROS více aktivní. Zdá se tedy, že funkční respirační řetězec hraje v regulaci produkce ROS zásadní roli.

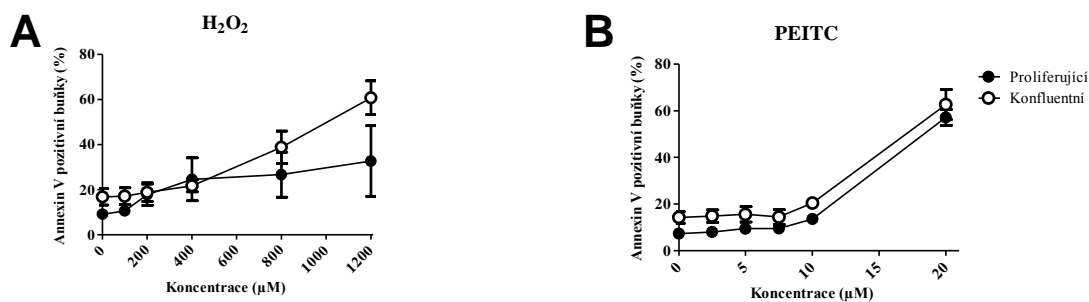


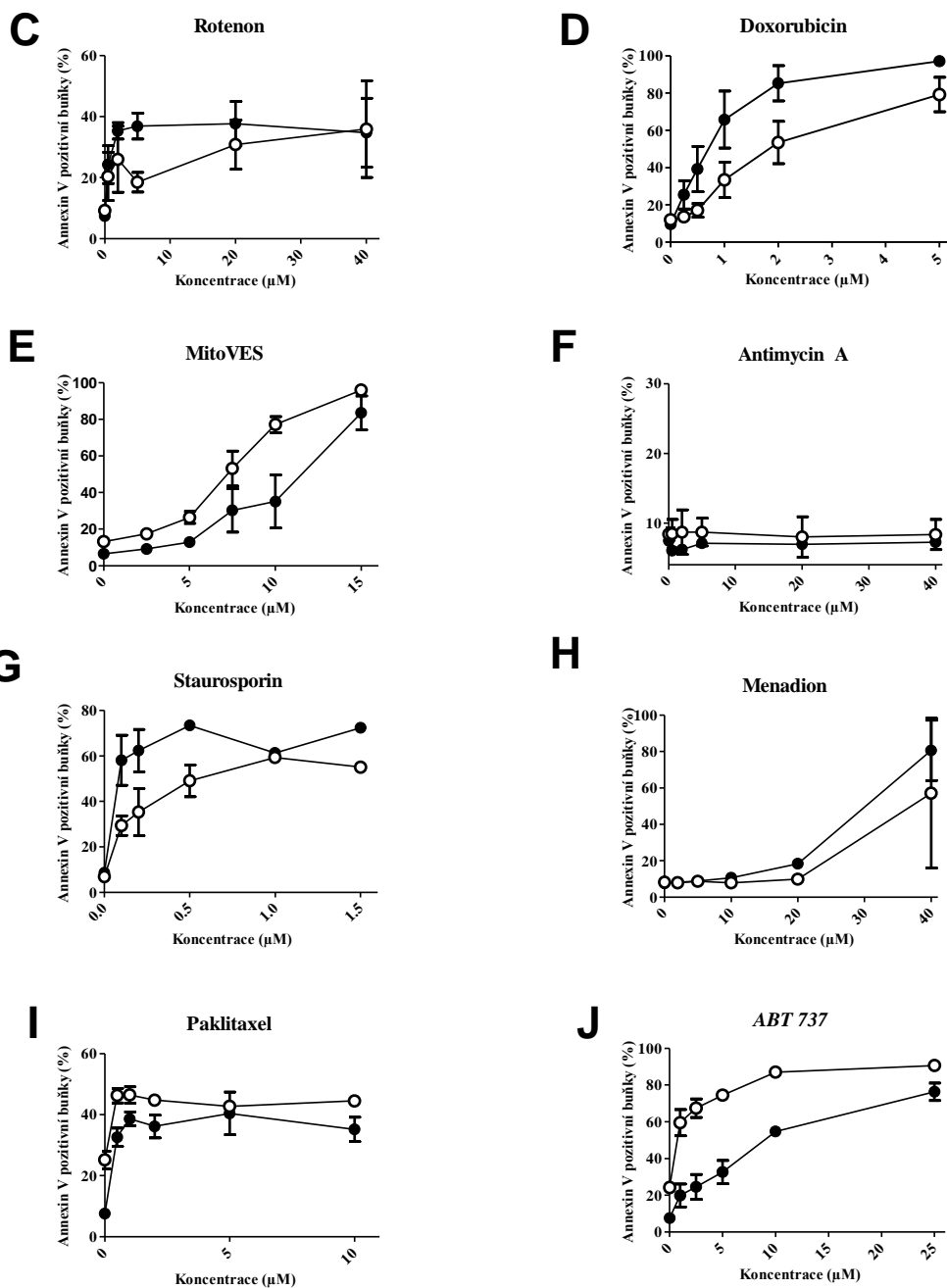


Obr. 28 – Produkce ROS buňkami $\rho 0$. Podíl proliferujících a konfluentních buněk, které vykazovaly vlivem použitých činidel zvýšenou tvorbu ROS. **A)** H_2O_2 , **B)** PEITC, **C)** Rotenon, **D)** Doxorubicin, **E)** MitoVES, **F)** Antimycin A, **G)** Staurosporin, **H)** Menadion, **I)** Paklitaxel, **J)** *ABT 737*. Chybové úsečky: Střední chyba průměru. Počet měření > 3.

5.5. Indukce apoptózy v buňkách $\rho 0$

Jelikož jsou tendence v produkci ROS u $\rho 0$ buněk jiné než u buněk parentálních, předpokládalo se, že i citlivost k apoptóze vyvolané oxidačním stresem by mohla být pozměněná. Z Obr. 29 lze vyčíst, že pouze v případě rotenonu a doxorubicinu vstupují proliferující buňky do apoptózy více než buňky konfluentní. Ve všech dalších případech (H_2O_2 , PEITC, MitoVES, paklitaxel) je tomu naopak, stejně jako v případě *ABT 737*, který vykazoval opačný průběh již při pokusech s *Ea.hy926*, a jenž nezasahuje do respiračního řetězce. Zdá se tedy, že rozdíly v citlivosti $\rho 0$ buněk k indukci apoptózy v proliferujícím a konfluentním stavu se nejenom stírají, ale dokonce že konfluentní $\rho 0$ buňky jsou k indukci apoptózy poněkud citlivější než $\rho 0$ buňky proliferující, což platí obzvláště pro některé látky vyvolávající tvorbu ROS.

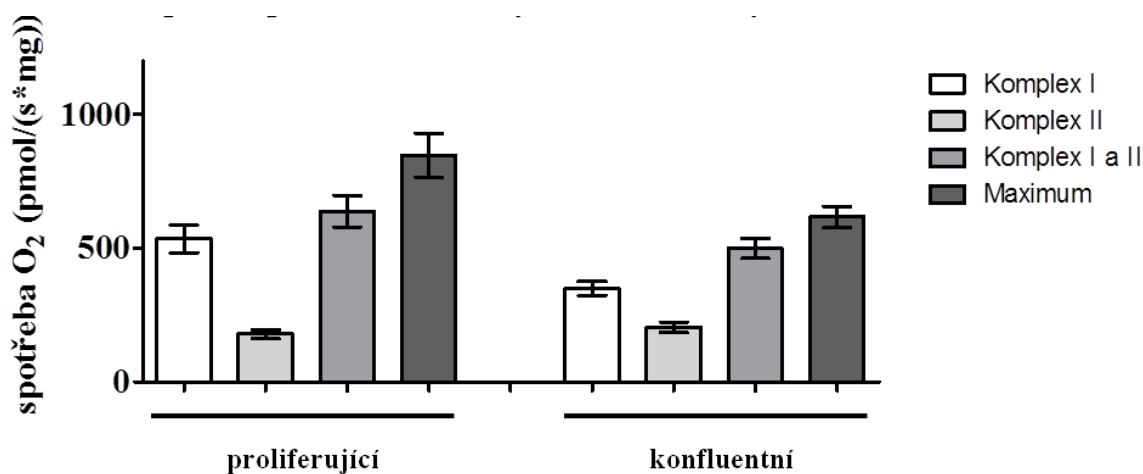




Obr. 29 – Rozdíly v citlivosti proliferujících a konfluentních buněk ρ0 k apoptóze vlivem apoptotických činidel různých koncentrací. **A)** H₂O₂, **B)** PEITC, **C)** Rotenon, **D)** Doxorubicin, **E)** MitoVES, **F)** Antimycin A, **G)** Staurosporin, **H)** Menadion, **I)** Paklitaxel, **J)** ABT 737. Chybové úsečky: Střední chyba průměru. Počet měření > 3.

5.6. Respirace permeabilizovaných buněk

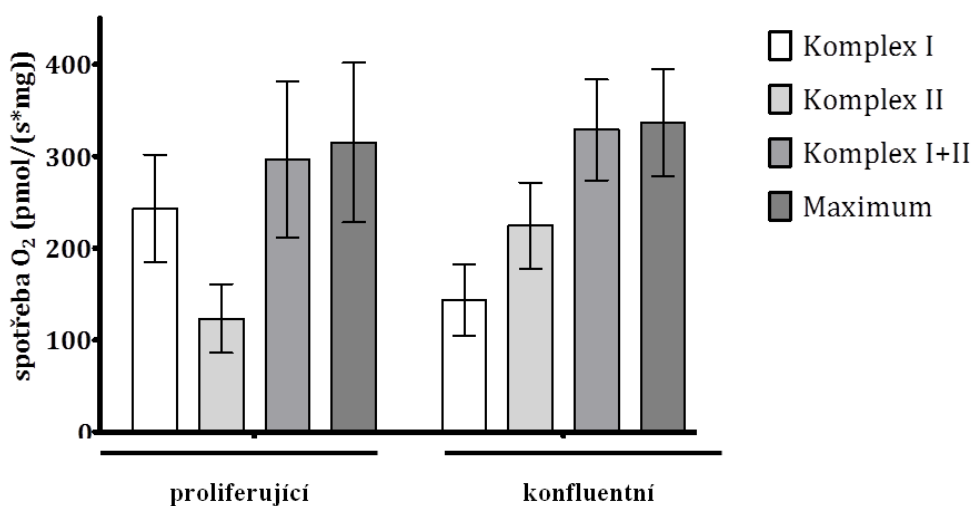
Množství produkovaných ROS může v buňkách souviset se spotřebou kyslíku a aktivitou mitochondriálního respiračního řetězce a jeho jednotlivých komplexů. Vzhledem k rozdílům v produkci ROS mezi proliferujícími a konfluentními buňkami jsme proto měřili spotřebu kyslíku na buňkách, jejichž buněčná membrána byla permeabilizována digitoninem. To umožňuje dodání exogenních substrátů pro mitochondriální respiraci, jelikož neporušená buněčná membrána je pro tyto substráty nepropustná. Z naměřených dat na Obr. 30 je patrné, že proliferující endoteliální buňky Ea.hy926 vykazují oproti buňkám konfluentním zvýšenou spotřebu kyslíku při dodání substrátů pro komplex I (glutamát, malát) a ADP pro ATP syntasu, i souhrnnou respiraci za využití substrátů pro komplexy I a II. V tomto případě byl ještě přidán sukcinát, substrát komplexu II. Stejně tak po přidání rozpřažovače FCCP k dosažení maximální míry respirace byla respirace proliferujících buněk vyšší. Na druhou stranu konfluentní buňky měly vyšší respiraci, i když ne statisticky významně, pokud byl v přítomnosti FCCP komplex I inhibován rotenonem (v grafu jako respirace přes komplex II). Tyto výsledky naznačují, že respirace proliferujících buněk je vyšší než buněk konfluentních a nejvyšší rozdíly jsou zaznamenány při použití substrátů pro komplex I.



Obr. 30 – Spotřeba kyslíku komplexem I a II a maximální respirace za použití disipačního činidla FCCP v permeabilizovaných proliferujících a konfluentních buňkách Ea.hy926. Spotřeba O₂ CI byla měřena před použitím FCCP, CII po použití FCCP a rotenonu. Maximum značí maximální spotřebu O₂ mitochondriemi po disipaci protonového gradientu pomocí FCCP. Chybové úsečky: Střední chyba průměru. Počet měření > 3.

5.7. Respirace izolovaných mitochondrií

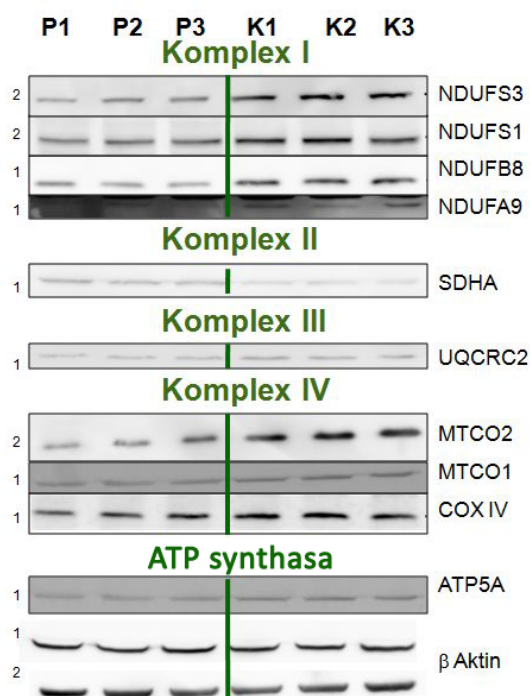
Spotřebu kyslíku lze měřit též přímo na izolovaných mitochondriích. Za tímto účelem byly mitochondrie izolovány z proliferujících a konfluentních buněk Ea.hy926 a byla měřena jejich respirace po přidání exogenních substrátů jak je avizováno v kap. 4.8.3. Výsledná data prezentovaná v Obr. 31 ukazují, že vyšší spotřeba kyslíku je patrná u mitochondrií z proliferujících buněk po přidání substrátů pro komplex I, tj. glutamátu, malátu a ADP. U mitochondrií konfluentních buněk je detekována vyšší míra respirace po přidání substrátu pro komplex II, sukcinátu. Maximální míra respirace po disipaci protonového gradientu a v přítomnosti substrátu pro komplexy I i II je však u obou vzorků srovnatelná, čímž se tyto výsledky poněkud liší od výsledků získaných na permeabilizovaných buňkách.



Obr. 31 – Respirační aktivita izolovaných mitochondrií buněk Ea.hy926. Spotřeba kyslíku komplexem I a II a maximální respirace izolovaných mitochondrií z proliferujících a konfluentních buněk byla měřena před použitím FCCP, CII po použití FCCP a rotenonu. Maximum značí maximální spotřebu O₂ mitochondriemi po disipaci protonového gradientu pomocí FCCP. Chybové úsečky: Střední chyba průměru. Počet nezávislých měření > 3.

5.8. Expresa proteinových podjednotek mitochondriálních respiračních komplexů

Vzhledem k rozdílům ve spotřebě kyslíku proliferujícími a konfluentními buňkami byla pomocí metody „Western blot“ stanovena míra exprese podjednotek mitochondriálních respiračních komplexů. Získané výsledky (Obr. 32), dokumentující expresi některých podjednotek komplexů oxidační fosforylace, ukazují, že detekované podjednotky komplexů I (NDUFS1 a 3, NDUFB8, NDUFA9), III (UQCRC2), IV (MTCO1 a 2, COXIV) a ATP synthasy (ATP5A) jsou ve větší míře exprimovány v konfluentních buňkách. Pouze podjednotka CII (SDHA) se ve vyšší koncentraci nachází v buňkách proliferujících. Lze tedy říci, že zatímco komplexy I, II, IV a ATP synthasy jsou více přítomny v konfluentních buňkách, u komplexu II je tomu naopak.

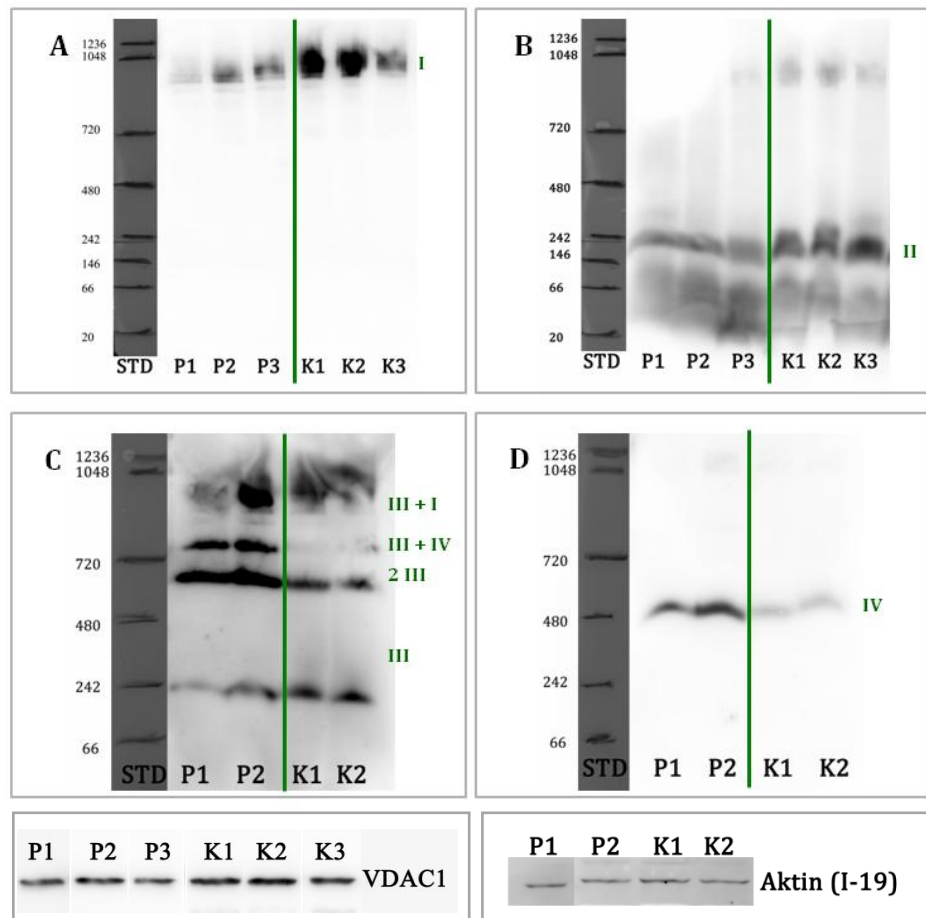


Obr. 32 – Expresa některých podjednotek mitochondriálních komplexů OXPHOS proliferujících (P) a konfluentních (K) buněk biologických replikátů (1–3). Nanáška na gel 50 µg celobuněčného lyzátu. Použitý substrát *Super Signal West Femto maximum sensitivity*, inkubace v 5 % mléce. Primární protilátka: NDUFS3 (1:10000, HR 10 s), NDUFS1 (1:10000, HR 60 s), NDUFB8 (1:10000, HS 10 s), MTCO2 (1:2500, HR 10 s), MTCO1 (1:2500, HR 70s), COX IV (1:10000, HR 30 s), kompletní OXPHOS mix protilátek (1:10000, NDUFA9 (HR 50 s), SDHA (HR 5 s), UQCRC2 (HR 5 s), ATP5A (HR 50 s)), β–aktin konjugovaný s křenovou peroxidasou (1:2000, HR 230 s), sekundární protilátka myši (1:2000), expozice: HR – vysoké rozlišení, HS – vysoká citlivost kamery. Zobrazen reprezentativní snímek z 3 nezávislých experimentů.

5.9. Skladba mitochondriálních superkomplexů

Aktivita respiračního řetězce nemusí odpovídat pouze expresi samotných podjednotek respiračních komplexů, ale může být též dána vyšší molekulární organizací řetězce na úrovni respiračních superkomplexů. Složení těchto superkomplexů bylo stanoveno pomocí modré

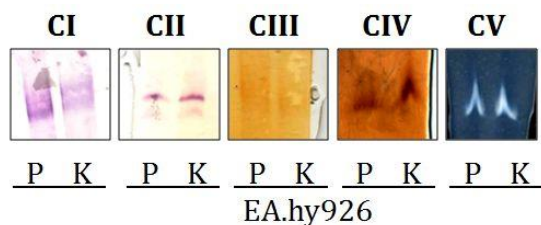
nativní elektroforézy. Výsledné snímky rozdělené mitochondriální frakce lze vidět na Obr. 33. Panel A ukazuje, že komplex I je v mitochondriích asociován do makromolekulárních respirazomů a jeho množství je celkově vyšší v konfluentních buňkách. CII se vyskytuje převážně jako samostatná entita také více v buňkách konfluentních. CIII tvoří v proliferujících buňkách významné struktury SC jako dimer. Komplex IV je více poskládaný v proliferujících buňkách. Tato data naznačují, že mezi proliferujícími a konfluentními buňkami existují významné rozdíly ve složení respiračních superkomplexů.



Obr. 33 – Organizace jednotlivých respiračních komplexů (I až IV) do nadmolekulárních struktur. Pro detekci bylo použito 40 μg mitochondrií solubilizovaných digitoninem proliferujících (P1 až P3) a konfluentních (K1 až K3) buněk. Panel **A**) vyobrazuje organizaci CI pomocí NDUFB8 (1:7000, HR 5 s) **B**) organizace CII pomocí protilátky na SDHA (1:7000, HR 3 s), **C**) CII pomocí UQCRC2 (1:7000, HR 110 s) a **D**) CIV pomocí MTCO2 (1:7000, HR 10 s). Sekundární protilátka myší 1:2500. Vše inkubováno v 5 % mléce. VDAC1 jako kontrola nanášky (1:2500). Použitý substrát: *Super Signal West Femto maximum sensitivity*, expozice: HR – vysoké rozlišení, VDAC1 – kontrola nanášky membrán A a B (1:2500, HR 10 s), Aktin (I-19) kontrola k membránám C a D (1:2500, HR 20 s), kozí sekundární protilátka 1:2500. Zobrazen reprezentativní snímek z 3 nezávislých experimentů.

5.10. Nativní elektroforéza aktivity v gelu

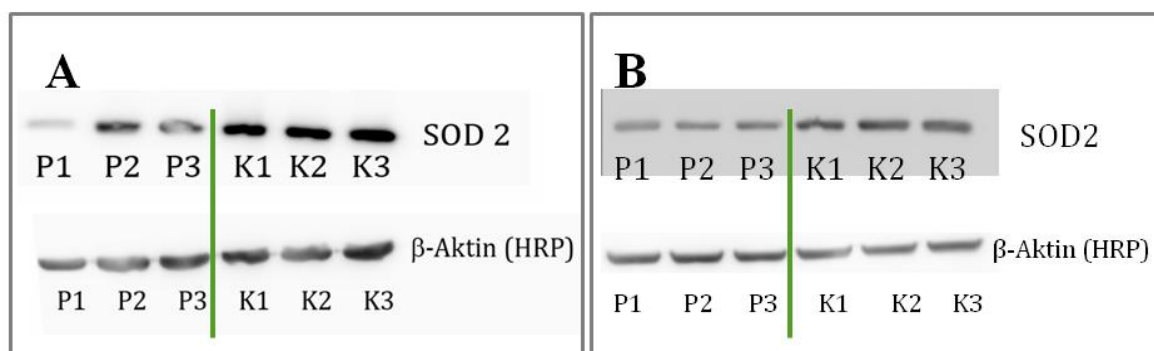
Aktivitu respiračních superkomplexů je možno stanovit přímo v nativním gelu za pomoci specifických substrátů pro jednotlivé komplexy, jak je popsáno v kap. 4.11.). Velikost a sytost zabarvené oblasti je přímo úměrná aktivitě enzymu (viz Obr. 34). Lze usuzovat, že CI a CIII je aktivnější v mitochondriích z proliferujících buněk zatímco CII, CIV a ATP synthasa má vyšší aktivitu v mitochondriích získaných z konfluentních buněk.



Obr. 34 – Barevné sraženiny vzniklé na gelu z nativní elektroforézy solubilizovaných mitochondrií představují aktivitu jednotlivých komplexů (CI až CIV, CV – ATP synthasa) oxidační fosforylace. P – mitochondriální frakce proliferujících buněk, K – mitochondriální frakce konfluentních buněk Ea.hy926. Zobrazen reprezentativní snímek z 3 nezávislých experimentů.

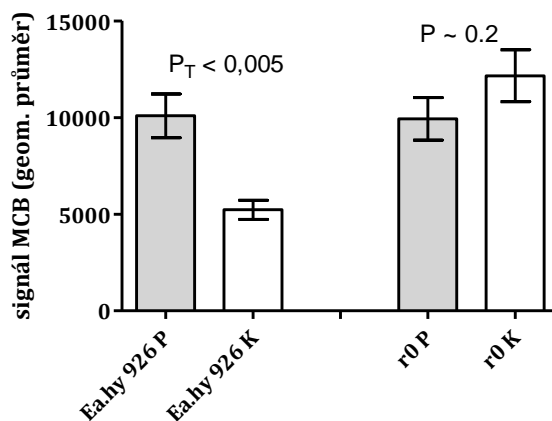
5.11. Antioxidační systémy

Antioxidační ochrana je důležitým činitelem v obraně buněk před oxidačním stresem a poškozením makromolekul. V respiračním řetězci je primárně tvořen $O_2^{\cdot-}$, jehož přeměnu na H_2O_2 zajišťuje SOD2. Množství tohoto enzymu bylo proto stanoveno metodou „Western blot“ v celobuněčném lyzátu dle kap. 4.9. (viz Obr. 35A a B). Lze pozorovat, že s konfluencí v buňkách Ea.hy926 tohoto enzymu přibývá (Obr. 28 A) a jeho exprese tak nepřímou koreluje s mírou produkce ROS v tomto buněčném typu. V konfluentních buňkách $\rho 0$ je SOD2 též více než v $\rho 0$ buňkách proliferujících (Obr. 35 B), přestože buňky $\rho 0$ byly citlivější k oxidačnímu stresu v konfluentním stavu.



Obr. 35 – Expresa SOD2 v Ea.hy926 (A) a $\rho 0$ (B) buňkách proliferujících (P) a konfluentních (K). Imunoprecipitační stanovení v celobuněčném lyzátu. Inkubováno v 5% BSA. Primární protilátka SOD2 (A) 1:10000, HR 20 s, (B) 1:4000, HR 1 s, sekundární králičí protilátka (1:2000). Použitý substrát: *Super Signal West Femto maximum sensitivity*, expozice: HR – vysoké rozlišení, kontrola nanášky β -aktin konjugovaný s křenovou peroxidasou (HRP, 1:2000, HR 20 s), nanáška na gel (A) 80 μ g proteinu celobuněčného lyzátu, (B) 50 μ g proteinu celobuněčného lyzátu. Reprezentativní snímek ze 3 nezávislých experimentů.

Jedním z hlavních buněčných antioxidantních systémů pro detoxifikaci H_2O_2 je glutathion, jehož aktivní podobou je redukovaná forma. Intenzita fluorescence MCB je úměrná koncentraci volného redukovaného GSH v buňce (viz Obr. 36). Jeho hladina je v proliferujících buňkách Ea.hy926 i $\rho 0$ srovnatelná. S konfluencí ale dochází u buněk Ea.hy926 k jejímu významnému poklesu, zatímco u buněk $\rho 0$ dochází k jejímu mírnému zvýšení. Zdá se tedy, že množství glutathionu se s proliferací mění rozdílně u buněk s funkčním a defektním respiračním řetězcem.

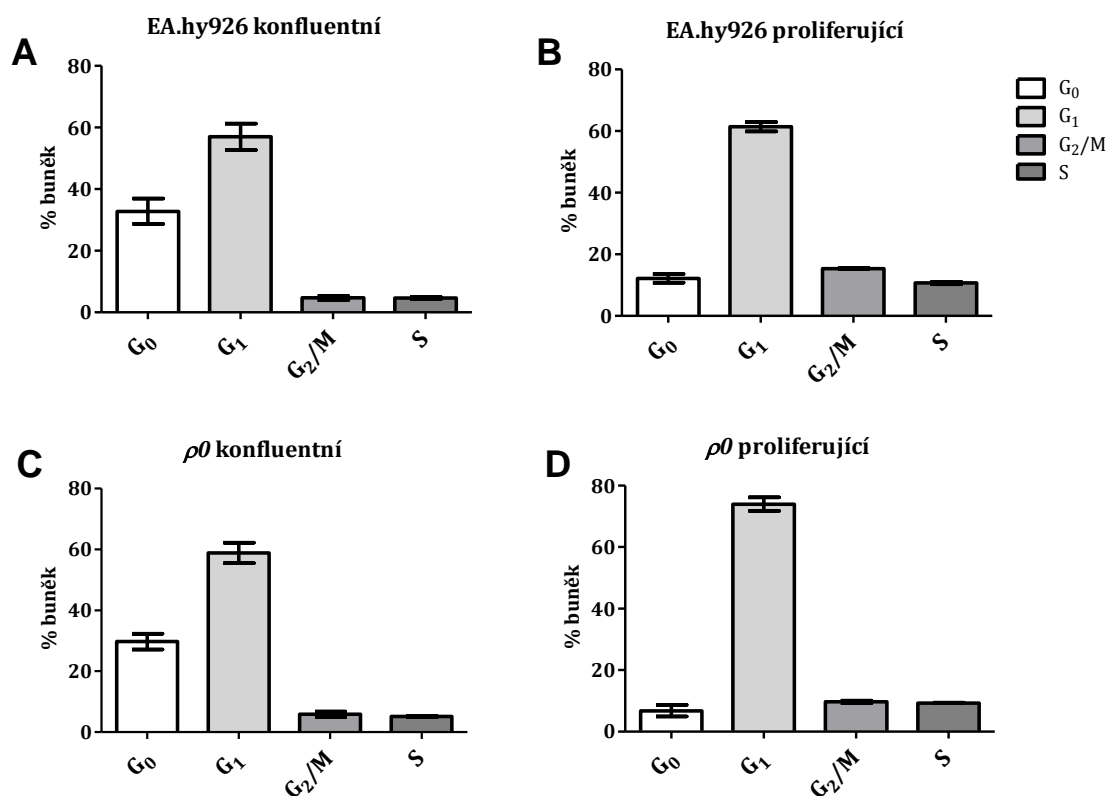


Obr. 36 – Intracelulární zásoba redukovaného glutathionu v buňkách Ea.hy926 a $\rho 0$. Množství glutathionu je úměrné geometrickému průměru signálu MCB buněk Ea.hy926 a $\rho 0$ proliferujících (P) a konfluentních (K). Chybové úsečky: Střední chyba průměru. P_T – parametr T-testu, hladina významnosti 0,05, Počet měření > 3.

5.12. Buněčný cyklus v buňkách s funkčním a defektním respiračním řetězcem

Aby bylo možné získaná data porovnávat, bylo nutné zjistit, zda buňky Ea.h926 i $\rho 0$ mají obdobnou distribuci v buněčném cyklu a vstupují ve stejné míře do fáze G_0 . Fluorescenčním značením DNA a RNA buněk (kap. 4.13.) bylo zjištěno rozdělení buněčné populace do jednotlivých fází buněčného cyklu. Dle vyhodnocení, které zobrazuje Obr. 37, str. 77, konfluentní buňky Ea.hy926 i $\rho 0$ se nacházejí z cca 30 % (Ea.hy926 32,8 %, $\rho 0$ 29,7 %) ve fázi G_0 , 57 % respektive 58,8 % v fázi G_1 a asi po 5 % ve fázi G_2/M a S (Ea.hy926 G_2/M – 4,7 %, S – 4,6 %, $\rho 0$ G_2/M – 5,9 %, S – 5,1 %). Proliferující buňky Ea.hy926 i $\rho 0$ jsou pouze z 12,2 % respektive 6,8 % ve fázi G_0 , 61,4 % resp. 74 % v G_1 , 15,4 %, 9,7 % v G_2/M fázích a 10,7 % resp. 9,3 % ve fázi v S buněčného cyklu. Lze tedy říci, že defektní respirační řetězec nemá významný vliv na distribuci buněk v buněčném cyklu a neovlivňuje jejich vstup do G_0

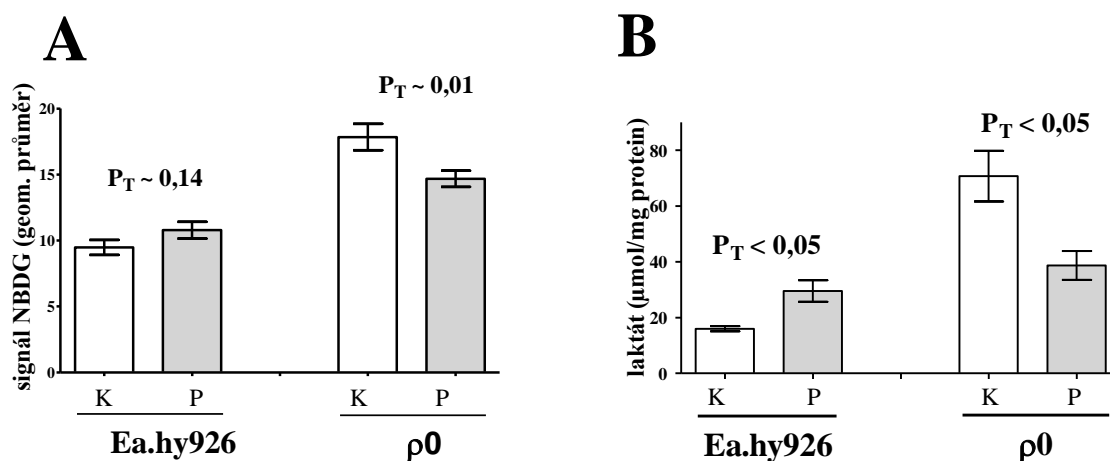
fáze po dosažení konfluence.



Obr. 37 – Distribuce buněčných populací v jednotlivých fázích buněčného cyklu. Distribuce Ea.hy926 konfluentních (**A**) a proliferujících (**B**) a $\rho 0$ konfluentních (**C**) a proliferujících (**D**) v jednotlivých fázích buněčného cyklu stanovena dle obsahu DNA a RNA. Chybové úsečky: Střední chyba průměru. Počet měření > 3.

5.13. Aktivita buněčné glykolýzy

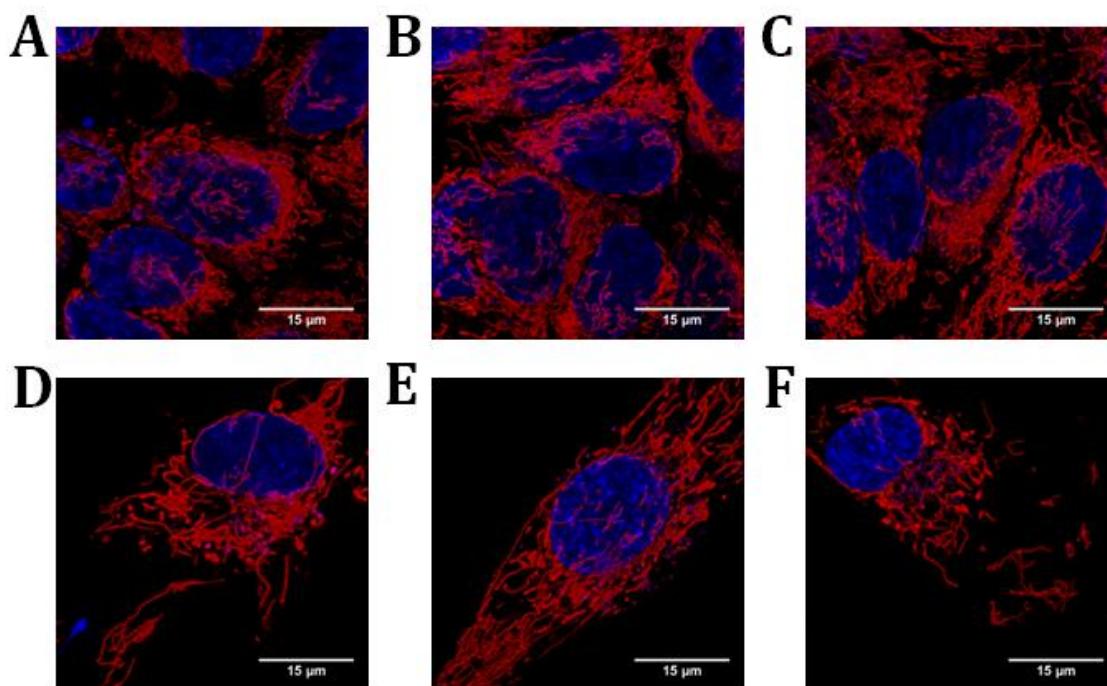
Aktivita mitochondriální respirace je do značné míry spojená s aktivitou glykolytické dráhy, která zpracovává glukózu na pyruvát. Pyruvát pak může být využit pro mitochondriální respiraci, nebo je konvertován na laktát. Dle příjmu glukózy (Obr. 38A, str. 79) a produkce laktátu (Obr. 38B, str. 79) tak lze stanovit aktivitu této dráhy. Naměřená data ukazují, že proliferující buňky Ea.hy926 přijímají více glukózy než konfluentní Ea.hy926. U $\rho 0$ buněk je příjem glukózy všeobecně vyšší než u buněk s funkčním respiračním řetězcem a s konfluencí se ještě zvyšuje (viz Obr. 38, str. 79). Produkce laktátu „kopíruje“ trend příjmu glukózy, u Ea.hy926 se snižuje se vstupem do konfluence. Buňky $\rho 0$ všeobecně tvoří laktátu více a jeho produkce se významně zvyšuje po vstupu těchto buněk do konfluence. Lze tedy vyvozovat, že aktivita glykolytické dráhy se významně liší u konfluentních a proliferujících buněk v závislosti na tom, jestli mají nebo nemají funkční respirační řetězec.



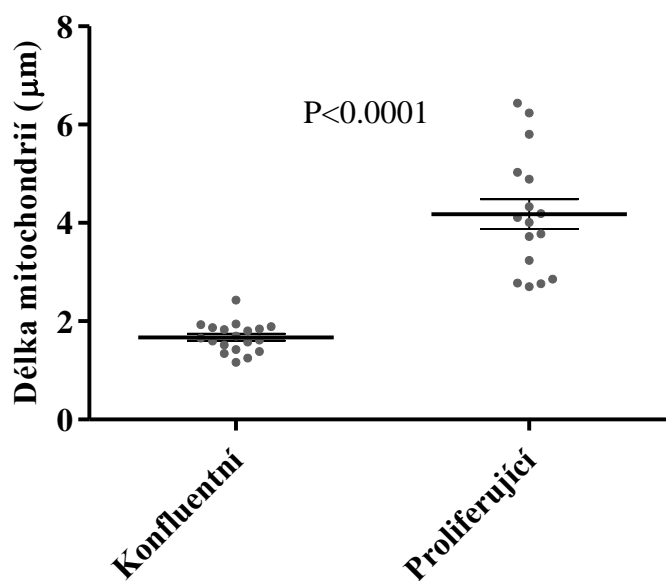
Obr. 38 – **A**) Příjem glukózy buňkami Ea.hy926 a ρ0. Geometrický průměr intenzity signálu 2-NBDG proliferujících (P) a konfluentních (K) buněk, kde velikost signálu je přímo úměrná příjmu glukózy buňkami a **B**) ukazuje látkové množství laktátu vyprodukované různými typy buněk vzhledem buněčnému proteinu. Chybové úsečky: Střední chyba průměru, P_T – parametr T-testu, hladina významnosti 0,05. Počet měření > 3.

5.14. Morfologie mitochondrií

Morfologie mitochondrií může odpovídat aktivitě respiračního řetězce. Z toho důvodu byla u proliferujících a konfluentních buněk Ea.hy926 pomocí konfokální mikroskopie stanovena délka mitochondrií, viz Obr. 39A až F, str. 80 a Obr. 40, str. 80. Z naměřených dat plyne, že mitochondrie konfluentních buněk jsou statisticky významně kratší a fragmentovanější než mitochondrie buněk proliferujících. Zdá se tedy, že morfologie mitochondrií se mění v závislosti na proliferačním stavu buňky.



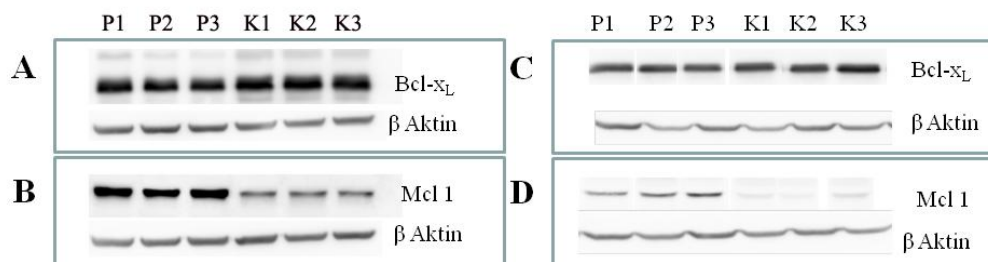
Obr. 39 – Typické příklady morfologie mitochondrií v proliferujících (panely **A–C**) a konfluentních (**D–F**) buňkách Ea.hy926. Mitochondrie jsou značně červeně pomocí TMRM, buněčná jádra jsou značena modře pomocí Hoechst 33342.



Obr. 40 – Průměrná délka mitochondrií proliferujících a konfluentních buněk Ea.hy926. Počet měřených mitochondrií pro každý bod >25. Chybové úsečky: Střední chyba průměru. P – parametr T-testu, hladina významnosti 0,05.

5.15. Kvantifikace exprese Bcl-2 proteinů

V regulaci citlivosti k apoptóze a v jejím spouštění mají zásadní význam proteiny rodiny Bcl-2. Rozdíly v jejich expresi by tak mohly napomoci při pochopení mechanismů způsobujících vyšší citlivost k apoptóze proliferujících buněk. Množství jednoho z hlavních antiapoptotických proteinů Bcl-x_L se v konfluentních buňkách snižuje, zatímco množství antiapoptotického Mcl-1 se naopak snižuje (viz Obr. 41).



Obr. 41 – Porovnání množství antiapoptotických proteinů Bcl-x_L a Mcl-1 buněk Ea.hy926 (A,B) a buněk ρ0 (C,D). Imunoprecipitační stanovení v celobuněčném lyzátu buněk proliferujících (P) a konfluentních (K). Inkubováno v 5 % BSA. Primární protilátka Bcl-x_L **A**) 1:2000, HR 40 s, **C**) 1:4000, HR 4 s, sekundární myší protilátka (1:2000), Mcl-1 **B**) 1:2000, HR 40 s, **D**) 1:8000, HR 50 s, sekundární králičí protilátka (1:2000). Použitý substrát: *Super Signal West Femto maximum sensitivity*, expozice: HR – vysoké rozlišení, STD – standardní, Kontrola nanášky β-aktin konjugovaný s křenovou peroxidasou (1:2000, HR 20 s), nanáška na gel Ea.hy926 50 μg proteinu celobuněčného lyzátu a ρ0 80 μg celobuněčného lyzátu. Reprezentativní snímek ze 3 nezávislých experimentů.

6. Diskuze

Mitochondrie a zejména komplexy respiračního řetězce jsou v savcích buňkách hlavními konstitutivními producenty reaktivních kyslíkatých radikálů [65], čemuž odpovídá účinná mitochondriální antioxidační ochrana. V důsledku inhibice respiračního řetězce se produkce ROS může radikálně zvýšit a množství vznikajících oxidačních intermediátů tak může převýšit detoxifikační kapacitu buněk, což vede k eliminaci buňky apoptózou [158]. V rámci předkládané diplomové práce jsme proto testovali hypotézu, že míra schopnosti produkovat a detoxifikovat ROS se může lišit u proliferujících a konfluentních buněk, a tak může významným způsobem ovlivňovat citlivost k apoptóze.

V tomto směru je logické, že proliferující buňky jsou citlivější k činidlům, která jsou cílena na procesy, které u buněk v klidové fázi neprobíhají. Příkladem těchto procesů je transkripce a replikace DNA, což je hlavní cíl protirakovinných léčiv z rodiny antracyklinů jako je např. doxorubicin [159], nebo reorganizace mikrotubulů během buněčného dělení, na které jsou zacílené taxany, např. paklitaxel [116]. Výsledky prezentované v této práci naše očekávání potvrdily a prokázaly vhodnost zvoleného experimentálního modelu. Ačkoliv zmiňovaná činidla vyvolávají určitou hladinu oxidačního stresu obzvláště v proliferujících buňkách, k indukci ROS docházelo nekonzistentně, viz velké odchylky pozorované v Obr. 26 D a I (str. 66, 67). Na druhou stranu k indukci apoptózy docházelo zcela konzistentně, viz Obr. 27 D a I (str. 67, 68), což naznačuje, že v testovaných buňkách indukce ROS nehraje esenciální roli ve vyvolání buněčné smrti těmito činidly.

Hlavním cílem práce ovšem bylo otestovat přímý vliv mitochondrií v produkci a detoxifikaci ROS a indukci apoptózy. Aktivita mitochondrií, jakožto zdroje makroenergetického fosfátu ve formě ATP, stejně tak jako metabolitů pro potřebu biosyntézy, je přizpůsobována aktuálním nárokům buněk. Tyto potřeby v rámci buněčného cyklu kolísají vzhledem k požadavku energie a metabolitů pro biosyntetické procesy spojené s tvorbou nutné biomasy pro buněčné dělení pouze v určitých fázích cyklu [160]. V G₀ fázi se buňky nedělí a jsou v klidovém stavu, a proto by mohly být jinak citlivé k činidlům vyvolávajícím tvorbu ROS, obzvláště pak mitochondriálních ROS, než buňky proliferující, nacházející se v rozdílných fázích buněčného cyklu. K prověření této hypotézy v endoteliálních buňkách byla využita činidla produkující ROS různými mechanismy, ať již mitochondriálními (rotenon [139], mitochondriálně cílený MitoVES [161] či antimycin A [162], inhibitory komplexů I až III), nebo jinými (H₂O₂, PEITC [108] či menadion [115]). S využitím fluorescenční sondy

DCFH2–DA, která je indikátorem oxidačního stresu v buňce [163](s preferencí pro detekci H_2O_2 , která ovšem není absolutní) jsme zjistili, že všechna použitá apoptotická a oxidační stres indukující činidla vyvolávají v endoteliálních buňkách produkci ROS, která je mnohem vyšší v buňkách proliferujících než v buňkách v klidové fázi (Obr. 26, str. 66, 67). Výjimkou je *ABT 737*, který působí jako mimetikum apoptotických proteinů s BH3 doménou [164] a produkci ROS nevyvolává, a staurosporin, jehož schopnost produkovat ROS v našem experimentálním systému je velmi limitovaná. Pilotní experimenty, které nejsou prezentované v této práci, též naznačují, že proliferující buňky bez stimulace ROS induktory také vykazují vyšší produkci ROS než buňky konfluentní, a to bez rozdílu použité fluorescenční značky (DHE, MitoSOX, DCFH2–DA). To je ve shodě s požadavkem na určitou, i když relativně nízkou hladinou ROS pro udržení buněčné proliferace. Z prezentovaných dat lze tedy vyvodit, že proliferující buňky mají tendenci zvyšovat hladinu ROS mnohem snáze po aplikaci rozdílných induktorů ROS než buňky konfluentní, což by mohlo usnadnit indukci buněčné smrti.

Oxidační stres je jedním z důležitých mediátorů mitochondriálně řízené apoptózy. Data získaná detekcí buněčné smrti při značení apoptotických buněk Annexinem V–FITC proteinem a pozdně apoptotických buněk PI napovídají, že proliferující buňky jsou náchylnější kromě produkce ROS i k oxidačně iniciované apoptóze, tzn. že proliferující buňky reagují apoptózou na nižší koncentraci použitého činidla než buňky konfluentní (viz Obr. 27, str. 67, 68). Křivky ukazující procento apoptotických buněk ve většině případů kopírují křivky produkce ROS. I když některé konfluentní buňky svoji produkci ROS lehce zvýšily, do apoptózy v případě H_2O_2 , PEITC, rotenonu a paklitaxelu i ve zvyšující se koncentrační řadě činidla v drtivé většině nevstupují. Po vystavení endoteliálních buněk paklitaxelu a doxorubicinu se jejich rozdíly vzhledem k produkci ROS v apoptotické citlivosti ještě mnohonásobně prohlubují, což je konzistentní s dalšími, na ROS nezávislými proapoptotickými efekty těchto látek diskutovaných výše. Nakonec konfluentní buňky jsou více náchylné k apoptóze indukované *ABT 737* a zdá se, že i antimycinem A. Tato činidla fungují jako mimetika BH3 proteinů, což je dobře dokumentované v literatuře, a tím vyvolávají apoptózu přímým působením na mitochondrie nezávisle na produkci ROS [107; 165].

Využitím $\rho 0$ buněk s defektním respiračním řetězcem bylo zjištěno, že respirační řetězec hraje klíčovou roli pro vznik rozdílné hladiny ROS vyvolané zkoumanými činidly v proliferujících buňkách a buňkách v klidové fázi. Pro většinu těchto činidel byly rozdíly v

hladině ROS značně sníženy (MitoVES, PEITC) nebo setřeny, či poněkud překvapivě invertovány (menadione, rotenone, antimycin A, H₂O₂). Hladina ROS byla ve většině situací nižší než u odpovídajících buněk s funkčním respiračním řetězcem (Obr. 28, str. 69, 70). Doxorubicin, paklitaxel, staurosporin v ρ0 buňkách hladinu ROS vůbec nezvýšily, což ukazuje, že i v tomto případě mitochondrie hrají důležitou roli.

Mnohem větší změna tendencí je pozorována při měření citlivosti k apoptóze. Apoptóza je v konfluentních ρ0 indukována ve větší míře než v konfluentních parentálních buňkách všemi proapoptotickými činidly a naopak v proliferujících ρ0 buňkách je většinou o něco nižší než v proliferujících buňkách parentálních. Výsledně se míra apoptózy mezi proliferujícími a konfluentními ρ0 buňkami buď příliš neliší, nebo je dokonce vyšší u buněk konfluentních (Obr. 29, str. 70, 71). To naznačuje, že defektní respirační řetězec způsobuje zvýšenou citlivost k buněčné smrti v konfluentních buňkách, což je patrné nejenom pro činidla, která oxidační stres způsobují, ale i pro ta, která ho nezpůsobují. Důvod této všeobecně zvýšené citlivosti k apoptóze je zatím neznámý. V každém případě není spojen s neschopností ρ0 vstoupit do klidové fáze, protože procento G₀ buněk v konfluentní populaci je podobné u ρ0 buněk jako u buněk parentálních (Obr. 37, str. 78).

Prodloužený vláknitý tvar mitochondrií proliferujících buněk Ea.hy926 v porovnání s fragmentovanými mitochondriemi konfluentních buněk (Obr. 39, str. 80) je ve shodě s vyšší aktivitou mitochondrií v proliferujícím stavu. Hlavním měřítkem mitochondriální aktivity je buněčná respirace, kterou je možno měřit jako spotřebu kyslíku a může souviset s produkcí ROS. Proliferující buňky mají vyšší celkovou spotřebu kyslíku a též spotřebu kyslíku při respiraci na substrátech specifických pro komplex I (Obr. 30, str. 72). Na druhou stranu respirační aktivita na substrátech specifických pro komplex II byla naměřena vyšší v izolovaných mitochondriích pocházejících z konfluentních buněk (Obr. 31, str. 73). Toto naznačuje, že proliferující buňky do určité míry preferují respiraci přes komplex I, zatímco buňky konfluentní přes komplex II. Zajímavé je, že v izolovaných mitochondriích nebyl detekován velký rozdíl v maximální respiraci proliferujících a konfluentních buněk, což může být dáno buď vyšší biomasou mitochondrií v proliferujících buňkách, nebo artefaktem měření na izolovaných mitochondriích. Porovnání exprese proteinových podjednotek respiračních komplexů v celobuněčném lyzátu ovšem poněkud překvapivě ukázalo zvýšenou expresi pro většinu respiračních komplexů v konfluentních buňkách s výjimkou komplexu II (Obr. 32, str. 74). To naznačuje, že míra exprese není určující pro aktivitu respiračního řetězce a že důležitou úlohu pravděpodobně hraje nadmolekulární organizace komplexů do

respiračních superkomplexů poskytující efektivnější přenos elektronů. Experimenty s použitím nativních gelů (Obr. 33, str. 75) toto potvrzují a naznačují výrazné rozdíly především v organizaci komplexu III, který byl v mnohem vyšší míře přítomen ve vyšších molekulárních strukturách v proliferaujících buňkách. Z literatury je známo, že asociace komplexu III do superkomplexů může mít rozhodující roli pro využití respiračních substrátů: čím více je komplex III přítomen v superkomplexech, tím více je využito respirace přes komplex I [57]. Také aktivita stanovená v gelu (Obr. 34, str. 76) ukázala vyšší aktivitu komplexů I a III v proliferaujících Ea.hy926 a naopak vyšší aktivitu komplexů II, IV a ATP synthasy v konfluentních buňkách, což odpovídá tomuto schématu. Rozdílné složení superkomplexů by mohlo mít vliv i na zvýšenou schopnost proliferaujících buněk produkovat ROS. V tomto ohledu přináší další úhel pohledu $\rho 0$ buněčná linie, která postrádá funkční komplexy I, III a IV a ve které je většina trendů produkce ROS opačná než u buněk s funkčním respiračním řetězcem. Jadernou DNA kódovaný CII tak může hrát nečekaně významnou roli při vzniku oxidačního stresu například ovlivňováním stability dalších respiračních komplexů. Takto myšlenka je podložena experimenty s MitoVES, který právě tento komplex blokuje a je vysoce specifický k proliferaujícím endoteliálním buňkám, zatímco v $\rho 0$ buňkách se jeho účinky dají popsat spíše jako nespecifické. Vysvětlení by mohla přinést identifikace konkrétních míst, ve kterých v respiračním řetězci v proliferaujících a konfluentních buňkách ROS vznikají, na což jsou nejvhodnějším modelem izolované mitochondrie. Z tohoto důvodu nyní optimalizujeme proces mitochondriální izolace, abychom byli schopni reprodukovatelným způsobem získat vysoce kvalitní mitochondrie z buněčné kultury.

Hladina ROS může být též určena efektivitou antioxidační ochrany. Toto je podpořeno pozorováním, že důležitý antioxidační enzym SOD2 je více exprimován v konfluentních buňkách Ea.hy926 (Obr. 35, str. 76). Překvapivě je tento enzym taktéž více exprimován v konfluentních $\rho 0$ buňkách, ačkoliv tyto buňky nevykazují výrazně vyšší rezistenci vůči ROS a jejich citlivost vůči apoptóze je dokonce vyšší. To naznačuje, že v tomto modelu antioxidační ochrana enzymem SOD2 není nejvýznamnějším činitelem určujícím hladinu ROS. Další prvek detoxifikačních systémů, volný GSH, se v proliferaujících buňkách Ea.hy926 vyskytuje ve vyšším množství než v buňkách konfluentních (Obr. 36, str. 77). V $\rho 0$ buňkách je tento trend opačný a ani v jednom systému nekoreluje s celkovou hladinou tvořených ROS. Na druhou stranu hladina GSH dobře koreluje s aktivitou glykolytické dráhy (Obr. 38, str. 79) v proliferaujících i konfluentních buňkách s funkčním a defektním

respiračním řetězcem. Zatímco u buněk s funkčním řetězcem je glykolýza aktivnější v proliferujících buňkách, u $\rho 0$ buněk je tomu naopak. Též pilotní experimenty (neprezentované v této práci) ukazují, že hladina NADPH nutné pro obnovu GSH je vyšší v proliferujících buňkách Ea.hy926. Významným zdrojem NADPH je pentózofosfátový cyklus, postranní dráha glykolýzy. Celkově se tedy zdá, že v našem experimentálním modelu antioxidační systémy v porovnání se stavem respiračního řetězce nehrají tak významnou roli v kontrole hladiny ROS a apoptotické citlivosti.

Citlivost k apoptóze by mohla být v proliferujících a konfluentních buňkách kontrolována též změnami rovnováhy mezi antiapoptotickými proteiny Mcl-1 a Bcl-x_L. Mcl-1 je více exprimovaný v proliferujících buňkách Ea.hy926, zatímco Bcl-x_L je více přítomen v buňkách konfluentních (Obr. 41, str. 81). Vzhledem k tomu, že Mcl-1 je z těchto dvou proteinů méně stabilní, mohl by se v oxidačním prostředí více degradovat než více stabilní Bcl-x_L a způsobovat zvýšenou citlivost k buněčné smrti. U $\rho 0$ buněk je rozdíl v množství Mcl-1 a Bcl-x_L zachovaný, přestože tyto buňky mají téměř opačnou citlivost k apoptóze v porovnání s buňkami s funkčním oxidačním řetězcem. Z tohoto důvodu se zdá, že rozdílná exprese proteinů z rodiny Bcl-2 nehraje určující roli pro citlivost proliferujících a konfluentních buněk k buněčné smrti.

Závěrem lze konstatovat, že výsledky prezentované v této práci naznačují významnou roli respiračního řetězce a jeho konfigurace v citlivosti proliferujících buněk k indukci apoptózy oxidačním stresem. Na druhou stranu získaná data nepodporují rozhodující roli detoxifikačních systémů kontrolujících ROS a proteinů rodiny Bcl-2 přímo se podílející na spouštění apoptózy. Přesné mechanismy s proliferací asociované citlivosti k vyšší produkci ROS zatím nejsou objasněny, i když byla provedena řada dílčích experimentů, které prokázali mnoho molekulární rozdílů mezi proliferujícími a konfluentními buňkami. K plnému porozumění této otázce je třeba provést další experimenty, které by též mohly pomoci při vývoji nových protirakovinných léčiv, obzvláště těch zaměřených na inhibici angiogeneze.

7. Závěr

Tato práce ukazuje, že proliferující buňky Ea.hy926 endoteliálního původu jsou více náchylné k indukci oxidačního stresu a buněčné smrti vyvolané ROS než buňky konfluentní. Toto je prokázáno pro oxidační činidla jako např. H₂O₂ nebo PEITC, stejně jako pro mnohé inhibitory buněčné respirace (MitoVES, rotenon, antimycin A). Taktéž ostatní látky, které vyvolávají určité zvýšení hladiny ROS, jako je např. doxorubicin, menadion a paklitaxel, tak činí více v proliferujících buňkách. Vzniklý oxidační stres poté vede k mnohem větší míře eliminace proliferujících buněk apoptózou v porovnání s buňkami konfluentními. Předpokládanou příčinou tohoto jevu je rozdílná aktivita respiračního řetězce v proliferujících a konfluentních buňkách, jelikož buňky ρ0, které kvůli eliminaci mtDNA neobsahují funkční komplexy I, III a IV, tento trend nevykazují a ve většině případů jsou v této situaci rozdíly v produkci ROS mezi proliferujícími a konfluentními buňkami ρ0 smazány či radikálně sníženy. Charakterizace respiračního řetězce naznačuje vyšší aktivitu oxidační fosforylace v proliferujících buňkách, což je podpořeno funkčními experimenty (spotřeba kyslíku, enzymová stanovení), i analýzou vyšší molekulární organizace respiračního řetězce do respiračních superkomplexů. Rozdíly v mitochondriální morfologii mezi proliferujícími a konfluentními buňkami (mitochondrie v proliferujících buňkách jsou delší, v konfluentních buňkách více fragmentované) jsou též konsistentní s aktivnějším respiračním řetězcem v proliferujících buňkách. Na druhou stranu získané výsledky nepodporují tezi, že antioxidantní systémy či rozdílná exprese antiapoptotických proteinů rodiny Bcl-2 jsou rozhodujícími faktory určující citlivost proliferujících buněk k oxidačnímu stresu.

Reference

- [1] Carmeliet, P., a R.K. Jain. 2011. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 473:298-307.
- [2] Rohlena, J., L.F. Dong, K. Kluckova, R. Zobalova, J. Goodwin, D. Tilly, J. Stursa, A. Pecinova, A. Philimonenko, P. Hozak, J. Banerjee, M. Ledvina, C.K. Sen, J. Houstek, M.J. Coster, a J. Neuzil. 2011. Mitochondrially targeted alpha-tocopheryl succinate is antiangiogenic: potential benefit against tumor angiogenesis but caution against wound healing. *Antioxid. Redox Signal.* 15:2923-2935.
- [3] Hardwick, J.S., Y. Yang, C. Zhang, B. Shi, R. McFall, E.J. Koury, S.L. Hill, H. Dai, R. Wasserman, R.L. Phillips, E.J. Weinstein, N.E. Kohl, M.E. Severino, J.R. Lamb, a L. Sepp-Lorenzino. 2005. Identification of biomarkers for tumor endothelial cell proliferation through gene expression profiling. *Mol. Cancer Ther.* 4:413-425.
- [4] Sennino, B., a D.M. McDonald. 2012. Controlling escape from angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer* 12:699-709.
- [5] Naik, E., L.A. O'Reilly, M.L. Asselin-Labat, D. Merino, A. Lin, M. Cook, L. Coultas, P. Bouillet, J.M. Adams, a A. Strasser. 2011. Destruction of tumor vasculature and abated tumor growth upon VEGF blockade is driven by proapoptotic protein Bim in endothelial cells. *J. Exp. Med.* 208:1351-1358.
- [6] Neuzil, J., L.F. Dong, J. Rohlena, J. Truksa, a S.J. Ralph. 2013. Classification of mitocans, anti-cancer drugs acting on mitochondria. *Mitochondrion* 13:199-208.
- [7] Vander Heiden, M.G., L.C. Cantley, a C.B. Thompson. 2009. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324:1029-1033.
- [8] Dong, L.F., V.J. Jameson, D. Tilly, J. Cerny, E. Mahdavian, A. Marin-Hernandez, L. Hernandez-Esquivel, S. Rodriguez-Enriquez, J. Stursa, P.K. Witting, B. Stantic, J. Rohlena, J. Truksa, K. Kluckova, J.C. Dyason, M. Ledvina, B.A. Salvatore, R. Moreno-Sanchez, M.J. Coster, S.J. Ralph, R.A. Smith, a J. Neuzil. 2011. Mitochondrial targeting of vitamin E succinate enhances its proapoptotic and anti-cancer activity via mitochondrial complex II. *J. Biol. Chem.* 286:3717-3728.
- [9] Don, A.S., O. Kisker, P. Dilda, N. Donoghue, X. Zhao, S. Decollogne, B. Creighton, E. Flynn, J. Folkman, a P.J. Hogg. 2003. A peptide trivalent arsenical inhibits tumor angiogenesis by perturbing mitochondrial function in angiogenic endothelial cells. *Cancer Cell* 3:497-509.
- [10] Mattson, M.P., M. Gleichmann, a A. Cheng. 2008. Mitochondria in neuroplasticity and neurological disorders. *Neuron* 60:748-766.
- [11] Williams, B.A., R.P. Hirt, J.M. Lucocq, a T.M. Embley. 2002. A mitochondrial remnant in the microsporidian *Trachipleistophora hominis*. *Nature* 418:865-869.
- [12] Goldberg, A.V., S. Molik, A.D. Tsaousis, K. Neumann, G. Kuhnke, F. Delbac, C.P. Vivares, R.P. Hirt, R. Lill, a T.M. Embley. 2008. Localization and functionality of microsporidian iron-sulphur cluster assembly proteins. *Nature* 452:624-628.
- [13] Embley, T.M., a W. Martin. 2006. Eukaryotic evolution, changes and challenges. *Nature* 440:623-630.
- [14] Tielens, A.G.M., C. Rotte, J.J. van Hellemond, a W. Martin. 2002. Mitochondria as we don't know them. *Trends in Biochemical Sciences* 27:564-572.
- [15] Green, D.R., a J.C. Reed. 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281:1309-1312.
- [16] Gogvadze, V., a S. Orrenius. 2006. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. *Chem. Biol. Interact.* 163:4-14.
- [17] von Ballmoos, C., A. Wiedenmann, a P. Dimroth. 2009. Essentials for ATP synthesis by F1F0 ATP synthases. *Annu. Rev. Biochem.* 78:649-672.
- [18] McBride, H.M., M. Neuspiel, a S. Wasiak. 2006. Mitochondria: more than just a powerhouse. *Curr. Biol.* 16:R551-560.

- [19] Liesa, M., a O.S. Shirihai. 2013. Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. *Cell Metab* 17:491-506.
- [20] Scheffler, I.E. 2007. Metabolic Pathways Inside Mitochondria. In Mitochondria. John Wiley & Sons, Inc., 298-344.
- [21] Varadarajan, S., M. Butterworth, J. Wei, M. Pellicchia, D. Dinsdale, a G.M. Cohen. 2013. Sabutoclax (BI97C1) and BI112D1, putative inhibitors of MCL-1, induce mitochondrial fragmentation either upstream of or independent of apoptosis. *Neoplasia* 15:568-578.
- [22] Andrei, L.M., Lomize; Irina, Pogozheva Orientations of Proteins in Membranes (OPM) database. dostupné na <http://opm.phar.umich.edu/localization.php?localization=Mitochondrial%20outer%20membrane>
- [23] Mannella, C.A., D.R. Pfeiffer, P.C. Bradshaw, Moraru, Il, B. Slepchenko, L.M. Loew, C.E. Hsieh, K. Buttle, a M. Marko. 2001. Topology of the mitochondrial inner membrane: dynamics and bioenergetic implications. *IUBMB Life* 52:93-100.
- [24] Lemarie, A., a S. Grimm. 2011. Mitochondrial respiratory chain complexes: apoptosis sensors mutated in cancer? *Oncogene* 30:3985-4003.
- [25] Breuer, M.E., W.J. Koopman, S. Koene, M. Nooteboom, R.J. Rodenburg, P.H. Willems, a J.A. Smeitink. 2013. The role of mitochondrial OXPHOS dysfunction in the development of neurologic diseases. *Neurobiol. Dis.* 51:27-34.
- [26] Sanderson, T.H., C.A. Reynolds, R. Kumar, K. Przyklenk, a M. Huttemann. 2013. Molecular mechanisms of ischemia-reperfusion injury in brain: pivotal role of the mitochondrial membrane potential in reactive oxygen species generation. *Mol. Neurobiol.* 47:9-23.
- [27] Balsa, E., R. Marco, E. Perales-Clemente, R. Szklarczyk, E. Calvo, M.O. Landazuri, a J.A. Enriquez. 2012. NDUFA4 is a subunit of complex IV of the mammalian electron transport chain. *Cell Metab* 16:378-386.
- [28] Baradaran, R., J.M. Berrisford, G.S. Minhas, a L.A. Sazanov. 2013. Crystal structure of the entire respiratory complex I. *Nature* 494:443-448.
- [29] Roessler, M.M., M.S. King, A.J. Robinson, F.A. Armstrong, J. Harmer, a J. Hirst. 2010. Direct assignment of EPR spectra to structurally defined iron-sulfur clusters in complex I by double electron-electron resonance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107:1930-1935.
- [30] Lenaz, G., a M.L. Genova. 2010. Structure and organization of mitochondrial respiratory complexes: a new understanding of an old subject. *Antioxid. Redox Signal.* 12:961-1008.
- [31] Sun, F., X. Huo, Y. Zhai, A. Wang, J. Xu, D. Su, M. Bartlam, a Z. Rao. 2005. Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell* 121:1043-1057.
- [32] Quinlan, C.L., A.L. Orr, I.V. Perevoshchikova, J.R. Treberg, B.A. Ackrell, a M.D. Brand. 2012. Mitochondrial complex II can generate reactive oxygen species at high rates in both the forward and reverse reactions. *J. Biol. Chem.* 287:27255-27264.
- [33] Drose, S. 2013. Differential effects of complex II on mitochondrial ROS production and their relation to cardioprotective pre- and postconditioning. *Biochim. Biophys. Acta* 1827:578-587.
- [34] Yankovskaya, V., R. Horsefield, S. Tornroth, C. Luna-Chavez, H. Miyoshi, C. Leger, B. Byrne, G. Cecchini, a S. Iwata. 2003. Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation. *Science* 299:700-704.
- [35] Solmaz, S.R., a C. Hunte. 2008. Structure of complex III with bound cytochrome c in reduced state and definition of a minimal core interface for electron transfer. *J. Biol. Chem.* 283:17542-17549.
- [36] Mulikdjanian, A.Y. 2005. Ubiquinol oxidation in the cytochrome bc1 complex: reaction mechanism and prevention of short-circuiting. *Biochim. Biophys. Acta* 1709:5-34.
- [37] Iwata, S., J.W. Lee, K. Okada, J.K. Lee, M. Iwata, B. Rasmussen, T.A. Link, S. Ramaswamy, a B.K. Jap. 1998. Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc1 complex. *Science* 281:64-71.

- [38] databáze proteinů UniProt. dostupné na <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9UDW1>
- [39] Richter, O.M., a B. Ludwig. 2003. Cytochrome c oxidase--structure, function, and physiology of a redox-driven molecular machine. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 147:47-74.
- [40] Lee, I., E. Bender, a B. Kadenbach. 2002. Control of mitochondrial membrane potential and ROS formation by reversible phosphorylation of cytochrome c oxidase. *Mol. Cell. Biochem.* 234-235:63-70.
- [41] Belevich, I., D.A. Bloch, N. Belevich, M. Wikstrom, a M.I. Verkhovsky. 2007. Exploring the proton pump mechanism of cytochrome c oxidase in real time. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104:2685-2690.
- [42] Meyer, B., I. Wittig, E. Trifilieff, M. Karas, a H. Schagger. 2007. Identification of two proteins associated with mammalian ATP synthase. *Mol. Cell. Proteomics* 6:1690-1699.
- [43] Abrahams, J.P., A.G.W. Leslie, R. Lutter, a J.E. Walker. 1994. Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* 370:621-628.
- [44] Baker, L.A., I.N. Watt, M.J. Runswick, J.E. Walker, a J.L. Rubinstein. 2012. Arrangement of subunits in intact mammalian mitochondrial ATP synthase determined by cryo-EM. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109:11675-11680.
- [45] Jonckheere, A.I., J.A. Smeitink, a R.J. Rodenburg. 2012. Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology. *J. Inherit. Metab. Dis.* 35:211-225.
- [46] Noji, H., R. Yasuda, M. Yoshida, a K. Kinosita, Jr. 1997. Direct observation of the rotation of F1-ATPase. *Nature* 386:299-302.
- [47] Panke, O., K. Gumbiowski, W. Junge, a S. Engelbrecht. 2000. F-ATPase: specific observation of the rotating c subunit oligomer of EF(o)EF(1). *FEBS Lett.* 472:34-38.
- [48] Schagger, H., a K. Pfeiffer. 2001. The ratio of oxidative phosphorylation complexes I-V in bovine heart mitochondria and the composition of respiratory chain supercomplexes. *J. Biol. Chem.* 276:37861-37867.
- [49] Armand, R., J.Y. Channon, J. Kintner, K.A. White, K.A. Miselis, R.P. Perez, a L.D. Lewis. 2004. The effects of ethidium bromide induced loss of mitochondrial DNA on mitochondrial phenotype and ultrastructure in a human leukemia T-cell line (MOLT-4 cells). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 196:68-79.
- [50] Yu, M., Y. Shi, X. Wei, Y. Yang, Y. Zhou, X. Hao, N. Zhang, a R. Niu. 2007. Depletion of mitochondrial DNA by ethidium bromide treatment inhibits the proliferation and tumorigenesis of T47D human breast cancer cells. *Toxicol Lett* 170:83-93.
- [51] Acin-Perez, R., a J.A. Enriquez. 2014. The function of the respiratory supercomplexes: the plasticity model. *Biochim. Biophys. Acta* 1837:444-450.
- [52] Hackenbrock, C.R., B. Chazotte, a S.S. Gupte. 1986. The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport. *J. Bioenerg. Biomembr.* 18:331-368.
- [53] Schagger, H., a K. Pfeiffer. 2000. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J.* 19:1777-1783.
- [54] Moreno-Lastres, D., F. Fontanesi, I. Garcia-Consuegra, M.A. Martin, J. Arenas, A. Barrientos, a C. Ugalde. 2012. Mitochondrial complex I plays an essential role in human respirasome assembly. *Cell Metab* 15:324-335.
- [55] Acin-Perez, R., P. Fernandez-Silva, M.L. Peleato, A. Perez-Martos, a J.A. Enriquez. 2008. Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Mol. Cell* 32:529-539.
- [56] Wumaier, Z., E. Nubel, I. Wittig, a H. Schagger. 2009. Chapter 8 Two-dimensional native electrophoresis for fluorescent and functional assays of mitochondrial complexes. *Methods Enzymol.* 456:153-168.
- [57] Lapuente-Brun, E., R. Moreno-Loshuertos, R. Acin-Perez, A. Latorre-Pellicer, C. Colas, E. Balsa, E. Perales-Clemente, P.M. Quiros, E. Calvo, M.A. Rodriguez-Hernandez, P. Navas, R. Cruz, A. Carracedo, C. Lopez-Otin, A. Perez-Martos, P. Fernandez-Silva, E. Fernandez-Vizarrá, a J.A.

- Enriquez. 2013. Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain. *Science* 340:1567-1570.
- [58] Kovarova, N., T. Mracek, H. Nuskova, E. Holzerova, M. Vrbacky, P. Pecina, K. Hejzlarova, K. Kluckova, J. Rohlena, J. Neuzil, a J. Houstek. 2013. High molecular weight forms of mammalian respiratory chain complex II. *PLoS One* 8:e71869.
- [59] Cogliati, S., C. Frezza, M.E. Soriano, T. Varanita, R. Quintana-Cabrera, M. Corrado, S. Cipolat, V. Costa, A. Casarin, L.C. Gomes, E. Perales-Clemente, L. Salviati, P. Fernandez-Silva, J.A. Enriquez, a L. Scorrano. 2013. Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes assembly and respiratory efficiency. *Cell* 155:160-171.
- [60] Giorgio, V., S. von Stockum, M. Antoniel, A. Fabbro, F. Fogolari, M. Forte, G.D. Glick, V. Petronilli, M. Zoratti, I. Szabo, G. Lippe, a P. Bernardi. 2013. Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110:5887-5892.
- [61] Davies, K.M., C. Anselmi, I. Wittig, J.D. Faraldo-Gomez, a W. Kuhlbrandt. 2012. Structure of the yeast F1Fo-ATP synthase dimer and its role in shaping the mitochondrial cristae. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109:13602-13607.
- [62] Halliwell, B., a C.E. Cross. 1994. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ. Health Perspect.* 102 Suppl 10:5-12.
- [63] Chen, Q., E.J. Vazquez, S. Moghaddas, C.L. Hoppel, a E.J. Lesnefsky. 2003. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J. Biol. Chem.* 278:36027-36031.
- [64] Quinlan, C.L., I.V. Perevoshchikova, M. Hey-Mogensen, A.L. Orr, a M.D. Brand. 2013. Sites of reactive oxygen species generation by mitochondria oxidizing different substrates. *Redox Biol* 1:304-312.
- [65] Turrens, J.F. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* 552:335-344.
- [66] Zhao, W., D.I. Diz, a M.E. Robbins. 2007. Oxidative damage pathways in relation to normal tissue injury. *Br. J. Radiol.* 80 Spec No 1:S23-31.
- [67] Rohlena, J., L.F. Dong, S.J. Ralph, a J. Neuzil. 2011. Anticancer drugs targeting the mitochondrial electron transport chain. *Antioxid. Redox Signal.* 15:2951-2974.
- [68] Murphy, M.P. 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* 417:1-13.
- [69] Treberg, J.R., C.L. Quinlan, a M.D. Brand. 2011. Evidence for two sites of superoxide production by mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J. Biol. Chem.* 286:27103-27110.
- [70] Zhang, L., L. Yu, a C.A. Yu. 1998. Generation of superoxide anion by succinate-cytochrome c reductase from bovine heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* 273:33972-33976.
- [71] Casteilla, L., M. Rigoulet, a L. Penicaud. 2001. Mitochondrial ROS metabolism: modulation by uncoupling proteins. *IUBMB Life* 52:181-188.
- [72] Esposti, M.D., a G. Lenaz. 1991. The kinetic mechanism of ubiquinol: cytochrome c reductase at steady state. *Arch Biochem Biophys* 289:303-312.
- [73] Drose, S., a U. Brandt. 2008. The mechanism of mitochondrial superoxide production by the cytochrome bc1 complex. *J. Biol. Chem.* 283:21649-21654.
- [74] Dong, L.F., V.J. Jameson, D. Tilly, L. Prochazka, J. Rohlena, K. Valis, J. Truksa, R. Zabalova, E. Mahdavian, K. Kluckova, M. Stantic, J. Stursa, R. Freeman, P.K. Witting, E. Norberg, J. Goodwin, B.A. Salvatore, J. Novotna, J. Turanek, M. Ledvina, P. Hozak, B. Zhitovovskiy, M.J. Coster, S.J. Ralph, R.A. Smith, a J. Neuzil. 2011. Mitochondrial targeting of alpha-tocopheryl succinate enhances its pro-apoptotic efficacy: a new paradigm for effective cancer therapy. *Free Radic. Biol. Med.* 50:1546-1555.
- [75] Salomon, A.R., D.W. Voehringer, L.A. Herzenberg, a C. Khosla. 2000. Understanding and exploiting the mechanistic basis for selectivity of polyketide inhibitors of F(0)F(1)-ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97:14766-14771.
- [76] Salomon, A.R., D.W. Voehringer, L.A. Herzenberg, a C. Khosla. 2001. Apoptolidin, a selective cytotoxic agent, is an inhibitor of FOF1-ATPase. *Chemistry & Biology* 8:71-80.

- [77] Droese, S., a U. Brandt. 2012. Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Adv. Exp. Med. Biol.* 748:145-169.
- [78] Burgering, B.M. 2008. A brief introduction to FOXology. *Oncogene* 27:2258-2262.
- [79] Wu, G., Y.Z. Fang, S. Yang, J.R. Lupton, a N.D. Turner. 2004. Glutathione metabolism and its implications for health. *J. Nutr.* 134:489-492.
- [80] Soderdahl, T., M. Enoksson, M. Lundberg, A. Holmgren, O.P. Ottersen, S. Orrenius, G. Bolcsfoldi, a I.A. Cotgreave. 2003. Visualization of the compartmentalization of glutathione and protein-glutathione mixed disulfides in cultured cells. *FASEB J.* 17:124-126.
- [81] Jurkovic, S., J. Osredkar, a J. Marc. 2008. Molecular impact of glutathione peroxidases in antioxidant processes. *Biochemia Medica* 18:162-174.
- [82] Circu, M.L., a T.Y. Aw. 2010. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.* 48:749-762.
- [83] Markovic, J., C. Borrás, A. Ortega, J. Sastre, J. Vina, a F.V. Pallardo. 2007. Glutathione is recruited into the nucleus in early phases of cell proliferation. *J. Biol. Chem.* 282:20416-20424.
- [84] Zimmermann, A.K., F.A. Loucks, E.K. Schroeder, R.J. Bouchard, K.L. Tyler, a D.A. Linseman. 2007. Glutathione binding to the Bcl-2 homology-3 domain groove: a molecular basis for Bcl-2 antioxidant function at mitochondria. *J. Biol. Chem.* 282:29296-29304.
- [85] Antico Arciuch, V.G., M.E. Elguero, J.J. Poderoso, a M.C. Carreras. 2012. Mitochondrial regulation of cell cycle and proliferation. *Antioxid. Redox Signal.* 16:1150-1180.
- [86] Cox, A.G., C.C. Winterbourn, a M.B. Hampton. 2010. Mitochondrial peroxiredoxin involvement in antioxidant defence and redox signalling. *Biochem. J.* 425:313-325.
- [87] Wood, Z.A., L.B. Poole, a P.A. Karplus. 2003. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science* 300:650-653.
- [88] Cairns, R.A., I.S. Harris, a T.W. Mak. 2011. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat. Rev. Cancer* 11:85-95.
- [89] Youle, R.J., a A. Strasser. 2008. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9:47-59.
- [90] Shen, H.M., a Z.G. Liu. 2006. JNK signaling pathway is a key modulator in cell death mediated by reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radic. Biol. Med.* 40:928-939.
- [91] Son, Y., S. Kim, H.-T. Chung, a H.-O. Pae. 2013. Chapter Two - Reactive Oxygen Species in the Activation of MAP Kinases. In *Methods Enzymol.* C. Enrique, and P. Lester, editors. Academic Press, 27-48.
- [92]
- [93] Garrido, C., L. Galluzzi, M. Brunet, P.E. Puig, C. Didelot, a G. Kroemer. 2006. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ.* 13:1423-1433.
- [94] Elmore, S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 35:495-516.
- [95] Lovell, J.F., L.P. Billen, S. Bindner, A. Shamas-Din, C. Fradin, B. Leber, a D.W. Andrews. 2008. Membrane binding by tBid initiates an ordered series of events culminating in membrane permeabilization by Bax. *Cell* 135:1074-1084.
- [96] Taylor, R.C., S.P. Cullen, a S.J. Martin. 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:231-241.
- [97] Brookes, P.S., Y. Yoon, J.L. Robotham, M.W. Anders, a S.S. Sheu. 2004. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 287:C817-833.
- [98] Bernardi, P. 2013. The mitochondrial permeability transition pore: a mystery solved? *Front. Physiol.* 4:95.
- [99] Jourdain, A., a J.C. Martinou. 2009. Mitochondrial outer-membrane permeabilization and remodelling in apoptosis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41:1884-1889.
- [100] Dai, H., A. Smith, X.W. Meng, P.A. Schneider, Y.P. Pang, a S.H. Kaufmann. 2011. Transient binding of an activator BH3 domain to the Bak BH3-binding groove initiates Bak oligomerization. *J. Cell Biol.* 194:39-48.

- [101] Cartron, P.F., C. Moreau, L. Oliver, E. Mayat, K. Meflah, a F.M. Vallette. 2002. Involvement of the N-terminus of Bax in its intracellular localization and function. *FEBS Lett.* 512:95-100.
- [102] Tan, K.O., K.M. Tan, S.L. Chan, K.S. Yee, M. Bevort, K.C. Ang, a V.C. Yu. 2001. MAP-1, a novel proapoptotic protein containing a BH3-like motif that associates with Bax through its Bcl-2 homology domains. *J Biol Chem* 276:2802-2807.
- [103] Adams, J.M., a S. Cory. 2007. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* 26:1324-1337.
- [104] Wasiak, S., R. Zunino, a H.M. McBride. 2007. Bax/Bak promote sumoylation of DRP1 and its stable association with mitochondria during apoptotic cell death. *J. Cell Biol.* 177:439-450.
- [105] Vandenberg, C.J., a S. Cory. 2013. ABT-199, a new Bcl-2-specific BH3 mimetic, has in vivo efficacy against aggressive Myc-driven mouse lymphomas without provoking thrombocytopenia. *Blood* 121:2285-2288.
- [106] Shiau, C.W., J.W. Huang, D.S. Wang, J.R. Weng, C.C. Yang, C.H. Lin, C. Li, a C.S. Chen. 2006. alpha-Tocopheryl succinate induces apoptosis in prostate cancer cells in part through inhibition of Bcl-xL/Bcl-2 function. *J. Biol. Chem.* 281:11819-11825.
- [107] Tzung, S.P., K.M. Kim, G. Basanez, C.D. Giedt, J. Simon, J. Zimmerberg, K.Y. Zhang, a D.M. Hockenbery. 2001. Antimycin A mimics a cell-death-inducing Bcl-2 homology domain 3. *Nat. Cell Biol.* 3:183-191.
- [108] Xiao, D., A.A. Powolny, M.B. Moura, E.E. Kelley, A. Bommareddy, S.H. Kim, E.R. Hahm, D. Normolle, B. Van Houten, a S.V. Singh. 2010. Phenethyl isothiocyanate inhibits oxidative phosphorylation to trigger reactive oxygen species-mediated death of human prostate cancer cells. *J. Biol. Chem.* 285:26558-26569.
- [109] Choi, W.S., R.D. Palmiter, a Z. Xia. 2011. Loss of mitochondrial complex I activity potentiates dopamine neuron death induced by microtubule dysfunction in a Parkinson's disease model. *J. Cell Biol.* 192:873-882.
- [110] Pommier, Y., E. Leo, H. Zhang, a C. Marchand. DNA Topoisomerases and Their Poisoning by Anticancer and Antibacterial Drugs. *Chemistry & biology* 17:421-433.
- [111] Tacar, O., P. Sriamornsak, a C.R. Dass. 2013. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *J. Pharm. Pharmacol.* 65:157-170.
- [112] Sun, X., Z. Zhou, a Y.J. Kang. 2001. Attenuation of doxorubicin chronic toxicity in metallothionein-overexpressing transgenic mouse heart. *Cancer Res.* 61:3382-3387.
- [113] Davies, K.J., a J.H. Doroshov. 1986. Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. I. Anthracycline radical formation by NADH dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 261:3060-3067.
- [114] Sasaki, R., Y. Suzuki, Y. Yonezawa, Y. Ota, Y. Okamoto, Y. Demizu, P. Huang, H. Yoshida, K. Sugimura, a Y. Mizushima. 2008. DNA polymerase gamma inhibition by vitamin K3 induces mitochondria-mediated cytotoxicity in human cancer cells. *Cancer Sci.* 99:1040-1048.
- [115] Criddle, D.N., S. Gillies, H.K. Baumgartner-Wilson, M. Jaffar, E.C. Chinje, S. Passmore, M. Chvanov, S. Barrow, O.V. Gerasimenko, A.V. Tepikin, R. Sutton, a O.H. Petersen. 2006. Menadione-induced reactive oxygen species generation via redox cycling promotes apoptosis of murine pancreatic acinar cells. *J. Biol. Chem.* 281:40485-40492.
- [116] Meshkini, A., a R. Yazdanparast. 2012. Involvement of oxidative stress in taxol-induced apoptosis in chronic myelogenous leukemia K562 cells. *Exp. Toxicol. Pathol.* 64:357-365.
- [117] Stepczynska, A., K. Lauber, I.H. Engels, O. Janssen, D. Kabelitz, S. Wesselborg, a K. Schulze-Osthoff. 2001. Staurosporine and conventional anticancer drugs induce overlapping, yet distinct pathways of apoptosis and caspase activation. *Oncogene* 20:1193-1202.
- [118] Pong, K., S.R. Doctrow, K. Huffman, C.A. Adinolfi, a M. Baudry. 2001. Attenuation of staurosporine-induced apoptosis, oxidative stress, and mitochondrial dysfunction by synthetic superoxide dismutase and catalase mimetics, in cultured cortical neurons. *Exp. Neurol.* 171:84-97.

- [119] Zhang, X.D., S.K. Gillespie, a P. Hersey. 2004. Staurosporine induces apoptosis of melanoma by both caspase-dependent and -independent apoptotic pathways. *Mol. Cancer Ther.* 3:187-197.
- [120] Gomes, L.C., G. Di Benedetto, a L. Scorrano. 2011. During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nat. Cell Biol.* 13:589-598.
- [121] Molina, A.J., J.D. Wikstrom, L. Stiles, G. Las, H. Mohamed, A. Elorza, G. Walzer, G. Twig, S. Katz, B.E. Corkey, a O.S. Shirihai. 2009. Mitochondrial networking protects beta-cells from nutrient-induced apoptosis. *Diabetes* 58:2303-2315.
- [122] Twig, G., A. Elorza, A.J. Molina, H. Mohamed, J.D. Wikstrom, G. Walzer, L. Stiles, S.E. Haigh, S. Katz, G. Las, J. Alroy, M. Wu, B.F. Py, J. Yuan, J.T. Deeney, B.E. Corkey, a O.S. Shirihai. 2008. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J.* 27:433-446.
- [123] Graves, J.A., Y. Wang, S. Sims-Lucas, E. Cherok, K. Rothermund, M.F. Branca, J. Elster, D. Beer-Stolz, B. Van Houten, J. Vockley, a E.V. Prochownik. 2012. Mitochondrial structure, function and dynamics are temporally controlled by c-Myc. *PLoS One* 7:e37699.
- [124] Song, Z., H. Chen, M. Fiket, C. Alexander, a D.C. Chan. 2007. OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L. *J. Cell Biol.* 178:749-755.
- [125] Liesa, M., M. Palacin, a A. Zorzano. 2009. Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. *Physiol. Rev.* 89:799-845.
- [126] Detmer, S.A., a D.C. Chan. 2007. Complementation between mouse Mfn1 and Mfn2 protects mitochondrial fusion defects caused by CMT2A disease mutations. *J. Cell Biol.* 176:405-414.
- [127] Koshiba, T., S.A. Detmer, J.T. Kaiser, H. Chen, J.M. McCaffery, a D.C. Chan. 2004. Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science* 305:858-862.
- [128] Arnoult, D., N. Rismanchi, A. Grodet, R.G. Roberts, D.P. Seeburg, J. Estaquier, M. Sheng, a C. Blackstone. 2005. Bax/Bak-dependent release of DDP/TIMM8a promotes Drp1-mediated mitochondrial fission and mitoptosis during programmed cell death. *Curr. Biol.* 15:2112-2118.
- [129] Karbowski, M., Y.J. Lee, B. Gaume, S.Y. Jeong, S. Frank, A. Nechushtan, A. Santel, M. Fuller, C.L. Smith, a R.J. Youle. 2002. Spatial and temporal association of Bax with mitochondrial fission sites, Drp1, and Mfn2 during apoptosis. *J. Cell Biol.* 159:931-938.
- [130] Bertoli, C., J.M. Skotheim, a R.A. de Bruin. 2013. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14:518-528.
- [131] Collier, H.A. 2011. Cell biology. The essence of quiescence. *Science* 334:1074-1075.
- [132] Collier, H.A. 2007. What's taking so long? S-phase entry from quiescence versus proliferation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8:667-670.
- [133] 2014. Eukaryotes and Cell Cycle. In Nature Education.
- [134] Bruce, A.A., Johnson; Julian, Lewis; Martin, Raff; Keith, Roberts; Peter, Walter. 2002. Molecular Biology of the Cell (4. edice). Garland Science, New York.
- [135] Frezza, C., S. Cipolat, a L. Scorrano. 2007. Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts. *Nat. Protoc.* 2:287-295.
- [136] Gomes, A., E. Fernandes, a J.L.F.C. Lima. 2005. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J. Biochem. Biophys. Methods* 65:45-80.
- [137] Floryk, D., a J. Houstek. 1999. Tetramethyl rhodamine methyl ester (TMRM) is suitable for cytofluorometric measurements of mitochondrial membrane potential in cells treated with digitonin. *Biosci. Rep.* 19:27-34.
- [138] Vermes, I., C. Haanen, H. Steffens-Nakken, a C. Reutellingsperger. 1995. A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of Immunological Methods* 184:39-51.
- [139] Lindahl, P.E., a K.E. Oberg. 1960. Mechanism of the physiological action of rotenone. *Nature* 187:784.

- [140] Pardee, A.B., a V.R. Potter. 1949. Malonate inhibition of oxidations in the Krebs tricarboxylic acid cycle. *J. Biol. Chem.* 178:241-250.
- [141] Lai, B., L. Zhang, L.Y. Dong, Y.H. Zhu, F.Y. Sun, a P. Zheng. 2005. Inhibition of Qi site of mitochondrial complex III with antimycin A decreases persistent and transient sodium currents via reactive oxygen species and protein kinase C in rat hippocampal CA1 cells. *Exp Neurol* 194:484-494.
- [142] Gnaiger, E. 2012. Mitochondrial Pathways and Respiratory Control. An Introduction to OXPHOS Analysis. In OROBOROS MiPNet Publications. Innsbruck.
- [143] Wiechelman, K.J., R.D. Braun, a J.D. Fitzpatrick. 1988. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal. Biochem.* 175:231-237.
- [144] Smith, P.K., R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, a D.C. Klenk. 1985. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Anal. Biochem.* 150:76-85.
- [145] Gnaiger, E., A. Kuznetsov, S. Schneeberger, R. Seiler, G. Brandacher, W. Steurer, a R. Margreiter. 2000. Mitochondria in the Cold. In Life in the Cold. G. Heldmaier, and M. Klingenspor, editors. Springer Berlin Heidelberg, 431-442.
- [146] Zerbetto, E., L. Vergani, a F. Dabbeni-Sala. 1997. Quantification of muscle mitochondrial oxidative phosphorylation enzymes via histochemical staining of blue native polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 18:2059-2064.
- [147] Wittig, I., R. Carrozzo, F.M. Santorelli, a H. Schagger. 2007. Functional assays in high-resolution clear native gels to quantify mitochondrial complexes in human biopsies and cell lines. *Electrophoresis* 28:3811-3820.
- [148] Wittig, I., M. Karas, a H. Schagger. 2007. High resolution clear native electrophoresis for in-gel functional assays and fluorescence studies of membrane protein complexes. *Mol. Cell. Proteomics* 6:1215-1225.
- [149] Kamencic, H., A. Lyon, P.G. Paterson, a B.H. Juurlink. 2000. Monochlorobimane fluorometric method to measure tissue glutathione. *Anal. Biochem.* 286:35-37.
- [150] Webb, C., C. Bedwell, A. Guth, P. Avery, a S. Dow. 2006. Use of flow cytometry and monochlorobimane to quantitate intracellular glutathione concentrations in feline leukocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 112:129-140.
- [151] Darzynkiewicz, Z., E. Bedner, a P. Smolewski. 2001. Flow cytometry in analysis of cell cycle and apoptosis. *Semin Hematol* 38:179-193.
- [152] Darzynkiewicz, Z., H. Crissman, a J.W. Jacobberger. 2004. Cytometry of the cell cycle: cycling through history. *Cytometry A* 58:21-32.
- [153] Shapiro, H.M. 1981. Flow cytometric estimation of DNA and RNA content in intact cells stained with Hoechst 33342 and pyronin Y. *Cytometry* 2:143-150.
- [154] O'Neil, R.G., L. Wu, a N. Mullani. 2005. Uptake of a fluorescent deoxyglucose analog (2-NBDG) in tumor cells. *Mol. Imaging Biol.* 7:388-392.
- [155] Zou, C., Y. Wang, a Z. Shen. 2005. 2-NBDG as a fluorescent indicator for direct glucose uptake measurement. *J. Biochem. Biophys. Methods* 64:207-215.
- [156] Trinder, P. 1969. Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. *J. Clin. Pathol.* 22:158-161.
- [157] Barham, D., a P. Trinder. 1972. An improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system. *Analyst* 97:142-145.
- [158] Buttke, T.M., a P.A. Sandstrom. 1994. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol. Today* 15:7-10.
- [159] Swift, L.P., A. Rephaeli, A. Nudelman, D.R. Phillips, a S.M. Cutts. 2006. Doxorubicin-DNA adducts induce a non-topoisomerase II-mediated form of cell death. *Cancer Res.* 66:4863-4871.

- [160] Mitra, K., C. Wunder, B. Roysam, G. Lin, a J. Lippincott-Schwartz. 2009. A hyperfused mitochondrial state achieved at G1-S regulates cyclin E buildup and entry into S phase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106:11960-11965.
- [161] Kluckova, K., A. Bezawork-Geleta, J. Rohlena, L. Dong, a J. Neuzil. 2013. Mitochondrial complex II, a novel target for anti-cancer agents. *Biochim. Biophys. Acta* 1827:552-564.
- [162] Han, Y.H., S.H. Kim, S.Z. Kim, a W.H. Park. 2008. Antimycin A as a mitochondrial electron transport inhibitor prevents the growth of human lung cancer A549 cells. *Oncol. Rep.* 20:689-693.
- [163] Aranda, A., L. Sequedo, L. Tolosa, G. Quintas, E. Burello, J.V. Castell, a L. Gombau. 2013. Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) assay: a quantitative method for oxidative stress assessment of nanoparticle-treated cells. *Toxicol. In Vitro* 27:954-963.
- [164] Vaillant, F., D. Merino, L. Lee, K. Breslin, B. Pal, M.E. Ritchie, G.K. Smyth, M. Christie, L.J. Phillipson, C.J. Burns, G.B. Mann, J.E. Visvader, a G.J. Lindeman. 2013. Targeting BCL-2 with the BH3 mimetic ABT-199 in estrogen receptor-positive breast cancer. *Cancer Cell* 24:120-129.
- [165] Oltersdorf, T., S.W. Elmore, A.R. Shoemaker, R.C. Armstrong, D.J. Augeri, B.A. Belli, M. Bruncko, T.L. Deckwerth, J. Dinges, P.J. Hajduk, M.K. Joseph, S. Kitada, S.J. Korsmeyer, A.R. Kunzer, A. Letai, C. Li, M.J. Mitten, D.G. Nettesheim, S. Ng, P.M. Nimmer, J.M. O'Connor, A. Oleksijew, A.M. Petros, J.C. Reed, W. Shen, S.K. Tahir, C.B. Thompson, K.J. Tomaselli, B. Wang, M.D. Wendt, H. Zhang, S.W. Fesik, a S.H. Rosenberg. 2005. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* 435:677-681.

