

UNIVERZITA PARDUBICE
Fakulta chemicko-technologická
Katedra biologických a biochemických věd

ZMĚNY KONCENTRACE ATP PŘI BUNĚČNÉM POŠKOZENÍ

Bakalářská práce

Autor práce: Eliška Andersová
Vedoucí práce: doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.
Konzultant: Mgr. Jan Čapek, Ph.D.

2020

UNIVERSITY OF PARDUBICE
Faculty of Chemical Technology
Department of Biological and Biochemical Sciences

CHANGES IN ATP CONCENTRATION DURING CELL DAMAGE

Bachelor thesis

Author: Eliška Andersová
Supervisor: doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.
Consultant: Mgr. Jan Čapek, Ph.D.

2020

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Eliška Andersová**
Osobní číslo: **C17111**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**
Téma práce: **Změny koncentrace ATP při buněčném poškození**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši, ve které bude popsána funkce mitochondrií. Dále pak popište dýchací řetězec a v popisu se soustřeďte na popis tvorby ATP.
2. V hlavní části práce charakterizujte a popište typy buněčného poškození. Dále popište mechanismy změn koncentrací ATP během buněčného poškození. Soustřeďte se na podrobný popis mechanismů a srovnání změn koncentrací ATP u buněk poškozených působením toxinů a buněk podstupujících proces apoptózy.
3. Jako zdroj informací pro zpracování kompilačního textu bakalářské práce využijte odborné články publikované v recenzovaných zahraničních časopisech. Informace přehledně zpracujte podle pokynů a doporučení školitele.

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

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant bakalářské práce: **Mgr. Jan Čapek**
Katedra biologických a biochemických věd
Datum zadání bakalářské práce: **20. prosince 2019**
Termín odevzdání bakalářské práce: **3. července 2020**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

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

V Pardubicích dne 28. února 2020

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

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

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 30.6.2020

Eliška Andersová

Poděkování:

Ráda bych poděkovala Mgr. Janu Čapkovi za věnovaný čas, trpělivost, vysvětlení dané problematiky, a především za cenné rady a připomínky při zpracování této bakalářské práce.

Anotace:

Bakalářská práce je věnována popisu stavby mitochondrií a jejich funkcí, dále pak syntéze adenosintrifosfátu, vysokoenergetické molekuly pohánějící velké množství reakcí uvnitř i vně buňky. V hlavní části práce jsou pak charakterizovány nejvýznamnější typy buněčného poškození, jejich vliv na koncentraci intracelulárního adenosintrifosfátu a důsledky, které má tato změna koncentrace ATP na viabilitu buněk.

Klíčová slova:

Adenosintrifosfát, mitochondrie, dýchací řetězec, apoptóza, nekróza

Title:

Changes in ATP concentration during cell damage

Annotation:

Bachelor's thesis is devoted to the description of the structure of mitochondria and their functions, as well as the synthesis of adenosine triphosphate, a high-energy molecule driving large amount of reactions inside and outside the cell. The main part of the literature search characterizes the most important types of cell damage, their effect on the concentration of intracellular adenosine triphosphate and the consequences that this change in concentration of ATP has on cells viability.

Keywords:

Adenosine triphosphate, mitochondria, respiratory chain, apoptosis, necrosis

Obsah

Úvod:.....	- 12 -
1. Mitochondrie a jejich funkce	- 13 -
1.1 Stavba mitochondrie.....	- 13 -
1.2 Funkce mitochondrie	- 15 -
1.2.1 Princip chemiosmózy a bilance redoxních ekvivalentů	- 16 -
1.2.2 Biosyntéza životně důležitých molekul.....	- 19 -
2. Adenosintrifosfát.....	- 20 -
2.1 Historie objevu ATP a výzkumů týkajících se ATP	- 21 -
2.2 Struktura molekuly ATP	- 22 -
2.3 Syntéza ATP a tvorba energie.....	- 23 -
2.3.1 Glykolýza	- 24 -
2.3.2 Citrátový cyklus.....	- 24 -
2.3.3 Oxidativní fosforylace.....	- 25 -
3. Typy buněčného poškození.....	- 30 -
3.1 Apoptóza	- 31 -
3.2 Nekróza	- 34 -
4. Detekce koncentrace ATP	- 36 -
5. Změny koncentrace ATP během buněčného poškození	- 38 -
6. Závěr	- 47 -
7. Seznam použité literatury	- 48 -

Seznam obrázků:

Obr. 1: Strukturní schéma mitochondrie	- 13 -
Obr. 2: Oxidovaná a redukovaná forma pyridinového koenzymu NAD	- 16 -
Obr. 3: Oxidovaná a redukovaná forma flavinového koenzymu FADH	- 17 -
Obr. 4: Cesty distribuce NAD skrze vnitřní mitochondriální membránu	- 19 -
Obr. 5: Chemická struktura adenosintrifosfátu.	- 22 -
Obr. 6: Lokace parciálních nábojů na atomech kyslíků a fosforu	- 23 -
Obr. 7: (A) struktura ATP syntázy. (B) Trojrozměrná struktura F ₁ ATPázy	- 28 -
Obr. 8: Cesty vedoucí k buněčné smrti	- 35 -
Obr. 9: Schématický nákres ATP sondy založené na FRET, ATeam	- 37 -
Obr. 10: A) Tvar buněčné smrti při vyčerpání ATP v závislosti na čase. B) Změny ve způsobu buněčné smrti po upnutí koncentrace ATP na definovaných hladinách nebo v různých časech	- 41 -
Obr. 11: Funkční a morfologické důsledky snížené hladiny intracelulárního ATP během buněčného poškození	- 46 -

Seznam zkratek:

ACLY	ATP citrátlyáza
ADP	Adenosindifosfát
AIDS	Syndrom získaného selhání imunity (<i>Acquired immune deficiency syndrome</i>)
AIF	Faktor indukující apoptózu (<i>Apoptosis inducing factor</i>)
AMP	Adenosinmonofosfát
AMPK	AMP aktivovaná protein kináza
ANT	Adenin nukleotid translokátor
Apaf-1	Faktor aktivující apoptickou proteázu (<i>Apoptotic protease activating factor</i>)
ATeam	ATP indikátor založený na epsilonové podjednotce pro analytická měření (<i>ATP indicator based on epsilon subunit for analytical measurements</i>)
ATP	Adenosintrifosfát
Bak	Homologní antagonist/zabiják Bcl-2 (<i>Bcl-2 homologous antagonist/killer</i>)
Bax	X protein asociovaný s Bcl-2 (<i>Bcl-2 associated X protein</i>)
Bcl-2	Lymfom B-buněk (<i>B-Cell Lymphoma</i>)
Bcl2L11/Bim	Protein 11 podobný Bcl-2 (<i>Bcl-2-like protein 11</i>)
Bid	Agonista smrti domény interagující s BH3 (<i>BH3 interacting domain death agonist</i>)
CD	Shluky diferenciací (<i>Cluster of differentiation</i>)
CoA	Koenzym A
CS	Citrátsyntáza
CTP	Cytosintrifosfát
DHAP	Dihydroxyacetonfosfát
DISC	Signalizační komplex indukující smrt (<i>Death inducing signaling complex</i>)
DNA	Deoxyribonukleová kyselina (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DR	Receptor smrti (<i>Death receptor</i>)
FAD/FADH ₂	Flavinadenindinukleotid

FMN	Flavinmononukleotid
FRET	Forsterův/fluorescenční rezonanční přenos energie (<i>Förster/fluorescence resonance energy transfer</i>)
GOT	Glutamát-oxalacetát transamináza
GPDH	Glycerol-3-fosfátdehydrogenáza
G3P	Glycerol-3-fosfát
GTP	Guanosintrifosfát
MDH	Malátdehydrogenáza
MTHFD	Methylentetrahydrofolát dehydrogenáza
NADH/NAD ⁺	Nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NGF	Nervový růstový faktor (<i>Nerve growth factor</i>)
PARP	Poly (ADP-ribóza) polymeráza
Pi	Anorganický fosfát
PI	Propidium jodid
RIP	Protein interagující s receptorem (<i>Receptor interacting protein</i>)
ROS	Reaktivní formy kyslíku (<i>Reactive oxygen species</i>)
STS	Staurosporin
TCA	Cyklus trikarboxylových kyselin (<i>Tricarboxylic acid cycle</i>)
THF	Tetrahydrofolát
TIM	Translokáza vnitřní membrány (<i>Translocase of the inner membrane</i>)
TNF	Faktor nekrózy nádorů (<i>Tumor necrosis factor</i>)
TOM	Translokáza vnější membrány (<i>Translocase of the outer membrane</i>)
TORC-1	Cíl rapamycinového komplexu 1 (<i>Target of rapamycin complex 1</i>)
TRAIL	Ligand indukující apoptózu příbuzný s TNF (<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>)
UTP	Uridintrifosfát
VDAC	Aniontový kanál závislý na napětí (<i>Voltage dependent anion channel</i>)

Úvod:

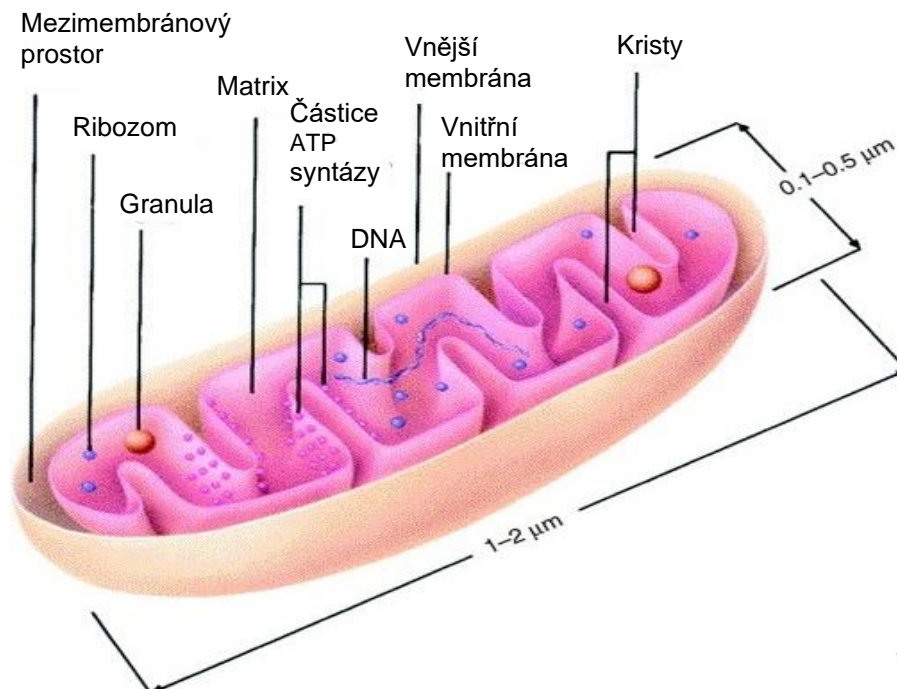
V lidském těle se nachází nespočet neustále se obnovujících buněk, které vyžadují energii. V mitochondriích dochází k tvorbě této energie ve formě vysokoenergetických molekul ATP, které při rozkladu svou energii uvolňují a poskytují jí různým buněčným pochodům. Tyto molekuly jsou syntetizovány na vnitřní mitochondriální membráně prostřednictvím proteinových komplexů během procesu zvaném oxidativní fosforylace. Tyto proteinové komplexy využívají vysoce energetické elektrony pocházející z nikotinamidadeninukleotidu k čerpání protonů z matrix mitochondrií do mezimembránového prostoru, čímž vytváří koncentrační protonový gradient. Pozitivně nabité protony poté vlivem elektrochemického gradientu prostupují zpět přes membránu do mitochondriální matrix skrze transmembránový proteinový komplex ATP syntázu, kterému svým průchodem dodávají energii, roztáčí ho a tím podněcují syntézu ATP z adenosindifosfátu a anorganického fosfátu. Z mitochondrie je ATP poté transportováno do buňky, aby se mohl účastnit nejrůznějších mechanismů a reakcí uvnitř buňky a sloužit extracelulárně jako signalizační molekula.

K buněčnému poškození může dojít následkem vnějších či vnitřních podnětů. Buňka se danému podnětu adaptuje, což vede k jejímu přežití nebo na základě tohoto podnětu dojde k buněčné smrti. Nejčastější typy buněčné smrti jsou apoptóza a nekróza. Při apoptóze neboli programované formě buněčné smrti, se buňka smršťuje, kondenzuje a vytváří tzv. apoptická tělíška, která jsou pohlcovaná fagocytujícími buňkami. Při nekróze se naopak buňka zvětšuje a praská, následkem čehož se zánětlivý obsah vylévá z buňky a poškozuje okolní tkáň. Mezi podněty vedoucí k jedné z těchto buněčných smrtí patří deplece ATP. Způsob smrti, kterým buňka umře závisí na koncentraci intracelulárního ATP. A to proto, že apoptické procesy jsou energeticky náročné a k jejich provedení je zapotřebí mít vysokou hladinu intracelulárního ATP. Pokud je intracelulární koncentrace ATP příliš nízká, buňka programovanou smrtí projít nemůže a je nucena podstoupit nekrózu. Co všechno a jakým způsobem ovlivňuje v buňce deplece ATP je popsáno v hlavní části této bakalářské práce.

1. Mitochondrie a jejich funkce

1.1 Stavba mitochondrie

Vzniku mitochondrií předcházela přibližně před dvěma miliony let tzv. endosymbiotická událost při níž byla mitochondrie, tehdy pouze alfa-probakterie, pohlcena eukaryotickým progenitorem a stala se semiautonmní organelou eukaryotické buňky. Mitochondrie jsou viditelné pod světelným mikroskopem a jsou popisovány jako protáhlé válce. Mohou mít však různorodé prostorové uspořádání i velikost (v řádu μm). A taktéž jako její bakteriální předchůdci, ze kterých pochází, mají mitochondrie dvě fosfolipidové membrány, vnitřní a vnější, které mají odlišné funkce a vlastnosti. Vnitřní mitochondriální membrána bývá spojována s přeměnou energie, zatímco vnější membrána je hlavní základnou pro mitochondriální signalizaci. Mezi nimi se pak nachází mezimembránový prostor (Nunnari, et al. 2012). Vnitřní membrána v sobě uzavírá mitochondriální cytoplazmu, nebo také matrix, obsahující mitochondriální DNA a velké množství molekul, enzymů a granul (obr. 1).



Obr. 1: Strukturní schéma mitochondrie (Frey, et al. 2000).

Vnitřní membránu lze dále rozdělit na dva morfologicky odlišné segmenty, a to křivky a vnitřní hraniční membránu. Křivky jsou základní strukturou

mitochondrií. Jsou to záhyby vnitřní membrány vyčnívající do prostoru mitochondriální matrix, zásadně navyšující celkový povrch této membrány, a to až několikanásobně. V kristách jsou zakotveny enzymové komplexy dýchacího řetězce a ATP syntáza, a proto na nich probíhá oxidativní fosforylace (Giacomello, et al. 2020). Od mezimembránového prostoru jsou kristy odděleny úzkými tubulárními spoji a k vnitřní hraniční membráně jsou připojeny prostřednictvím tzv. „*cristae junctions*“ neboli spojů, které uzavřením kristy zabraňují uvolňování jejího obsahu, například metabolitů nebo proteinů, do mezimembránového prostoru (Rampelt, et al. 2017). Stejně tak, jako mitochondrie přizpůsobují svůj tvar takovým způsobem, aby mohli být zachovány nezbytné buněčné funkce, tak i tvar a velikost krist se dynamicky mění v závislosti na rozdílných fyziologických podmínkách za pomoci membrány tvarujících proteinů. Příkladem může být prodloužení mitochondrie, jenž jí chrání před degenerací, která by mohla nastat při aktivaci recyklační autofagické dráhy nebo během vystavení oxidačnímu stresu. Prodloužení organely také podporuje tvorbu adenosintrifosfátu (ATP), čímž zvyšuje účinnost přeměny energie při nedostatku živin. Naopak zmenšení organely bylo pozorováno při nadbytku živin, kdy mitochondriální fragment inhibuje oxidativní fosforylaci a tím i produkci ATP (Cogliati, et al. 2016). Vnitřní hraniční membrána přiléhá těsně k vnější membráně a obsahuje různorodé kanálové transportéry, kterými prochází ionty, metabolity o malé velikosti a dochází zde i k výměně ATP a adenosindifosfátu (ADP) mezi cytoplazmou a mitochondriální matrix. Zmíněné transportéry se nazývají TIM komplexy (*Translokáza vnitřní membrány; Translocase of the Inner Membrane*) a z mnoha typů těchto komplexů jsou nejdůležitější TIM 22, který zprostředkovává import mitochondriálních přenašečů vnitřní membrány a TIM 23, jehož funkcí je přenos prekurzorů se signálem cíleným na mitochondriální matrix (Donzeau, et al. 2000). Vnitřní membrána obsahuje další důležité proteiny, mezi které patří například proteiny spojující mitochondrie s jinými subcelulárními kompartmenty na specifických tzv. membránových kontaktních místech a proteiny, které koordinují signální transdukční dráhy s mitochondriální funkcí. Na vnější membráně tak probíhá velké množství signalizačních kaskád, kvůli kterým je mitochondrie považována za signalizační organelu (Giacomello, et al. 2020).

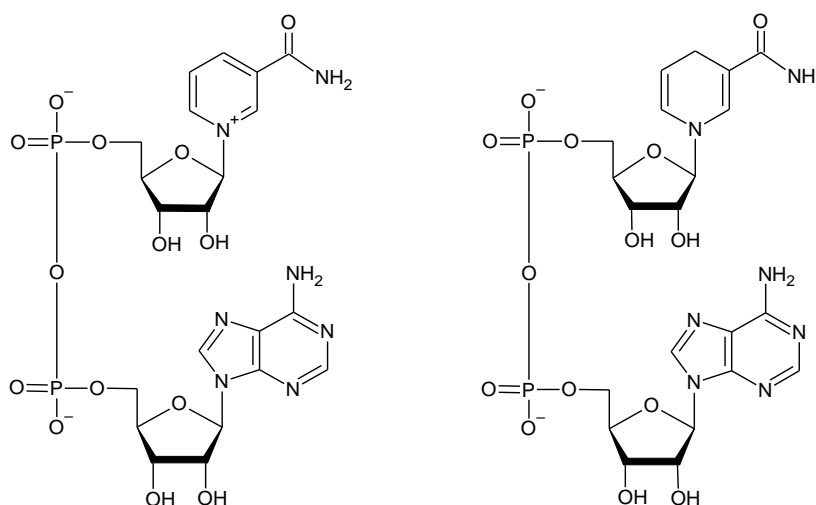
Vnější fosfolipidová membrána uzavírá celou mitochondrii a tvoří tedy bariéru mezi vnitřním prostředím organely a vnějším cytosolem buňky. Její permeabilita, na rozdíl od vnitřní membrány, nemá tak vysoké nároky na specifitu substrátů, které jsou skrze ni transportovány. A to proto, že na jejím povrchu se vyskytuje mnoho kopií transportního proteinu zvaného porin nebo také VDAC (*Aniontový kanál závislý na napětí; Voltage-Dependent Anion Channel*), které tvoří poměrně velké kanálky skrze fosfolipidovou dvojvrstvu. Kanálky jsou propustné pro většinu látek, především hydrofilních, s molekulovou hmotností, která nepřesahuje 5 kDa a tím zamezuje vstupu makromolekul (Alberts, et al. 2002). Bílkoviny s vyšší molekulovou hmotností se do organely musí importovat jiným způsobem, a to za pomoci tzv. TOM komplexů (*Translokáza vnější membrány; Translocase of the Outer Membrane*), které přes vnitřní membránu přenášejí také jaderně kódované preproteiny (Ahting, et al. 1999).

1.2 Funkce mitochondrie

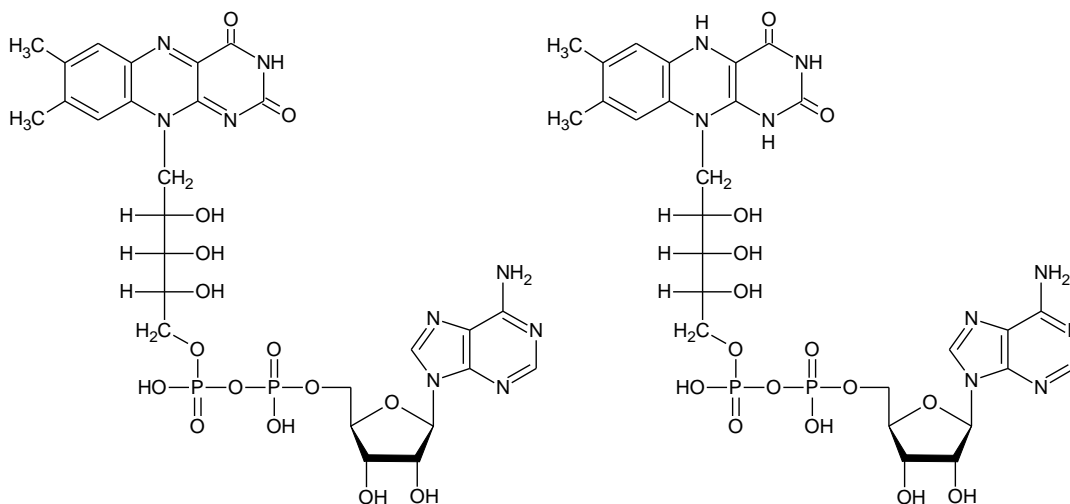
Eukaryotní buňka může v závislosti na buněčném typu (srdeční, ledvinná, jaterní atd.) obsahovat desítky až statisíce mitochondrií. Mitochondrie je již dlouhou dobu všeobecně známá jako energetický útvar eukaryotické buňky produkující při procesu oxidativní fosforylace ATP, základní jednotku energie v organismu. Zastává však mnoho dalších metabolických funkcí zasahujících i za hranice bioenergetiky. Kromě ATP produkují mitochondrie metabolické prekurzory pro lipidy, proteiny, DNA a další makromolekuly, rozdělují metabolity pro udržování redoxní homeostázy, která je také udržována zásluhou granulí, zadržujících vápník. Vytváří také vedlejší produkty metabolických drah jako například amoniak nebo reaktivní formy kyslíku (ROS, *Reactive Oxygen Species*), které se používají v buněčné signalizaci, ale mohou způsobit i oxidační poškození. Mají také své mechanismy, kterými se zbavují nebo kterými využívají odpadní produkty metabolismu. Dále koordinují buněčnou adaptaci na stresory, kterými mohou být oxidační stres, stres endoplazmatického retikula, nedostatek živin nebo i poškození DNA. Krom toho jsou mitochondrie zapojené do buněčné komunikace prostřednictvím kontaktů a signálních drah s dalšími organelami. Funkce nebo disfunkce mitochondrií se také projevily jako faktor při průběhu metabolických onemocnění, rakoviny buněk, buněčné apoptózy, stárnutí nebo neurodegenerace (Spinelli, et al. 2018).

1.2.1 Princip chemiosmózy a bilance redoxních ekvivalentů

V mitochondriích probíhá buněčné dýchání, jehož intenzita je závislá na množství kříst v mitochondriích. Více kříst totiž znamená větší povrch vnitřní membrány a zároveň také vyšší zásobování mitochondrie kyslíkem. V citrátovém cyklu jsou elektrony skrze oxidace ukládány v nikotinamidadenindinukleotidu (NADH, obr. 2) a flavinadenindinukleotidu (FADH₂, obr. 3) Tyto nosiče umisřují elektrony do elektronového transportního řetězce ve vnitřní membráně mitochondrie. Přenos elektronů je spojen s transportem H⁺ ionů z matrix přes vnitřní membránu do mezimembránového prostoru, což má za následek vytvoření pH gradientu. V matrix dojde k navýšení pH oproti mezimembránovému prostoru, kde je pH obecně kolem 7, stejně jako v cytosolu buňky, protože malé molekuly přecházejí přes vnější membránu volně, a tím pH neustále vyrovnávají. Dochází také k vytvoření napěťového gradientu (membránového potenciálu), napříč vnitřní membránou mitochondrie. Tento membránový potenciál je uvnitř membrány záporný a vně kladný, v důsledku odtékání kladných ionů. Vlivem pH gradientu jsou vodíkové ionty poháněny zpět do matrix a hydroxylové ionty ven z matrix a tím je posíleno i působení membránového potenciálu, který pozitivní ionty přitahuje do matrix a negativní vytlačuje ven (Alberts, et al. 2002). Tento základní mechanismus transdukce energie v mitochondriích je nazýván chemiosmóza.



Obr. 2: Oxidovaná (NAD⁺, vlevo) a redukovaná (NADH, vpravo) forma pyridinového koenzymu NAD. Skládá se z nikotinamidu, adeninu, dvou molekul ribózy a dvou fosfátů.



Obr. 3: Oxidovaná (FAD, vlevo) a redukovaná (FADH₂, vpravo) forma flavinového koenzymu FADH. Skládá se z vitamínu B₂, adeninu, ribózy a dvou fosfátů.

Mitochondrie a cytosol mají odlišné požadavky na koenzym NAD⁺. Správná distribuce těchto a dalších redoxních ekvivalentů je zásadní pro přežití buňky při reakcích na enviromentální stresory nebo při udržování buněčné homeostázy. V cytosolu je více oxidační prostředí, ve kterém je poměr NAD⁺/NADH v rozmezí mezi 60 a 700, zatímco v mitochondriích se více využívá redukčních metabolických reakcí a poměr NAD⁺/NADH je přibližně 7-8. Aby byla dodržena tato distribuce NAD, jsou zapojeny nepřímé dráhy, protože u člověka a celkově u savců, nejsou k dispozici žádné přímé transportéry pro NAD a buňky se spoléhají na kompartmentalizovaný tok metabolitů, aby podpořily rovnováhu redoxních ekvivalentů NAD⁺/NADH a NADP/NADPH. Mezi tyto vedlejší dráhy patří malát-aspartátové kyvadlo, malát-citrátové kyvadlo, glycerol-3-fosfátové kyvadlo a folátové kyvadlo (jednouhlíkatý metabolismus).

Malát-aspartátové kyvadlo (obr. 4a) – Je to komplikovaná metabolická dráha, kterou lze přenést vodík z cytosolového NADH do mitochondriální matrix. Principem je oxidace NADH na NAD⁺ a zároveň redukce oxalacetátu na malát za katalýzy cytosolické malátdehydrogenázy (MDH1). Malát poté prochází přes malát- α -ketoglutarátový antiport do matrix, kde se zpětně oxiduje na oxalacetát za redukce NAD⁺ na NADH, katalyzované mitochondriálním izoenzymem MDH2. Přes stejný antiport se do mezimembránového prostoru dostává α -ketoglutarát. Oxalacetát se za pomoci glutamátu přeměňuje transaminací, která je katalyzovaná mitochondriální glutamát-oxalacetát transaminázou (GOT2), na aspartát. Vzniklý aspartát prochází skrze glutamát-aspartátový antiport

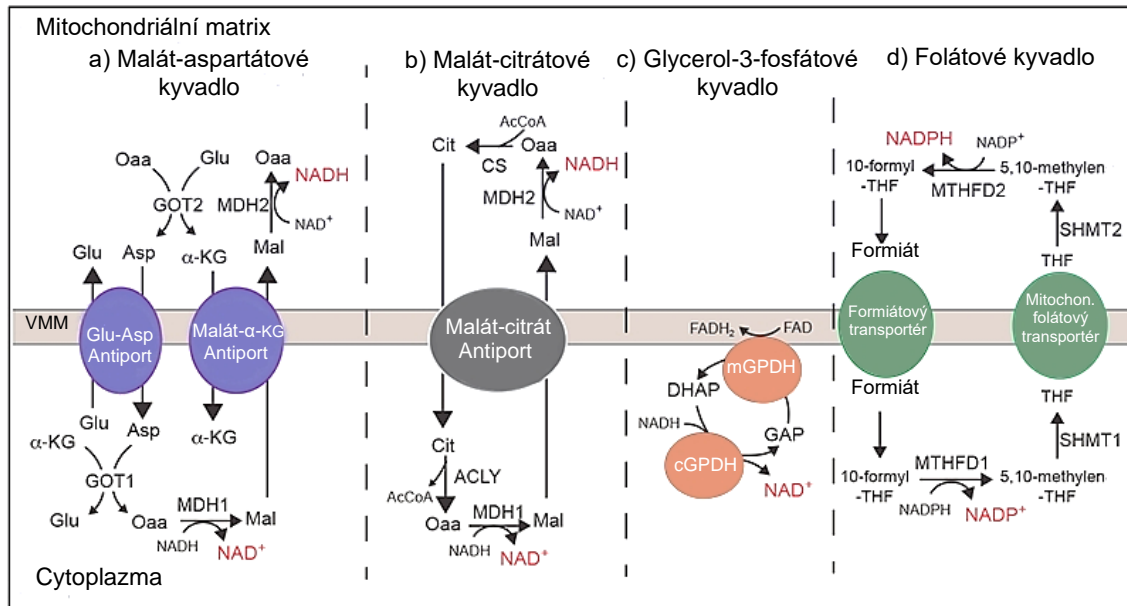
do cytosolu a místo něho je do matrix čerpán glutamát, využívaný v právě popsané transaminaci. Aspartát v cytosolu podléhá další transaminaci, katalyzované tentokrát cytosolickým izoenzymem GOT1, která ho přemění opět na oxalacetát. Odštěpená aminoskupina se naváže na α -ketoglutarát v cytosolu a mění ho na glutamát, který je čerpán skrze glutamát-aspartátový antiport do matrix, kde opět zprostředkovává transaminaci (Lane, et al. 2005).

Malát-citrátové kyvadlo (obr. 4b) – Umožňuje transport dvou uhlíků z acetylkoenzymu A (acetyl-CoA), nacházejícího se v matrix. Tyto dva uhlíky se naváží na oxalacetát za vzniku citrátu. Ten poté skrze malát-citrátový antiport přechází do cytosolu, kde se dva uhlíky od oxalacetátu opět oddělí a jsou použitelné pro syntézy mastných kyselin. Oxalacetát v cytosolu je redukován na malát a zároveň NADH je oxidován na NAD^+ . Malát je transportován do matrix, kde je zpětně oxidován na oxalacetát za redukce NAD^+ na NADH. Toto kyvadlo funguje na podobném principu jako malát-aspartátové, jelikož využívá stejné malátdehydrogenázové izofomy. Jejich aktivita je však spojena s jinými enzymy, a to citrátsyntázou (CS), ATP citrátlyázou (ACLY) (Kirimura, et al. 2019).

Glycerol-3-fosfátové kyvadlo (obr. 4c) – Principem je oxidace NADH na NAD^+ katalyzovaná cytosolovou glycerol-3-fosfát dehydrogenázou (cGPDH) a zároveň probíhá redukce dihydroxyacetonfosfátu (DHAP) na glycerol-3-fosfát (G3P). Když se G3P dostane do mezimembránového prostoru, je zpětně oxidována na DHAP za katalýzy mitochondriální glycerol-3-fosfát dehydrogenázou (mGPDH). Na tomto enzymu je navázána molekula FAD, která od G3P přijímá vysokoenergetické elektrony a dva ionty H^+ za vzniku FADH_2 . Ten je ale oxidován zpět na FAD a dva protony a elektrony jsou převedeny na ubichinon ze kterého tak vzniká ubichinol přenášející elektrony po elektronovém transportním řetězci (Shi, et al. 2018).

Folátové kyvadlo (obr. 4d) – Enzym methylenetetrahydrofolát dehydrogenáza (MTHFD) patří mezi největší přispěvatele buněčné NADPH a podílí se na metabolismu folátů přijímaných z potravy (vitamin B9). Zprostředkovává vzájemnou přeměnu 5,10-methylen-THF (tetrahydrofolát), a 10-formyl-THF, který je dárcovským kofaktorem pro *de novo* biosyntézu purinů a pyrimidinů. Cytoplazmatický izoenzym MTHFD1 je katalyzátorem pro reakci, při níž dochází k produkci NADP^+ a mitochondriální izoenzym MTHFD2 katalyzuje reakci vzniku

NADPH (Neagos, et al. 2010). Cytosolický enzym serinová hydroxymethyltransferáza (SHMT1) katalyzuje reverzibilní přeměnu 5,10-methylen-THF na THF a také přeměnu serinu na glycin. Mitochondriální forma tohoto enzymu (SHMT2) pak katalyzuje přeměnu THF zpět na 5,10-methylen-THF (Ducker, et al. 2017).



Obr. 4: Nepřímé cesty distribuce NAD skrze vnitřní mitochondriální membránu (Spinelli, et al. 2018). Zkratky: Glu – glukóza, Asp – aspartát, Oaa – oxalacetát, Mal – malát, αKG – α ketoglutarát, Cit – citrát, MDH – malátdehydrogenáza, ACLY – ATP citrátlyáza, DHAP – dihydroxyacetonfosfát, G3P- glycerol-3-fosfát, THF – tetrahydrofolát, MTHFD – methylen-tetrahydrofolát dehydrogenáza, SHMT – serinová hydroxymethyltransferáza

1.2.2 Biosyntéza životně důležitých molekul

Mitochondrie jsou zásadním zdrojem stavebních látek pro biosyntézu nukleotidů, mastných kyselin, cholesterolu, glukózy, hemu a dále pro syntézu aminokyselin, včetně alaninu, aspartátu, glutaminu, glutamátu a prolinu, ze kterých následně vznikají bílkoviny. Například syntéza nukleotidů závisí na generaci jednoválcových jednotek v jednoválcovém metabolismu a jejich transport přes membránu je zprostředkovaný THF přenašeči. Také například syntéza citrátu, která v mitochondriích probíhá redukcí α-ketoglutarátu, katalyzovanou izocitrátdehydrogenázou nebo první reakcí citrátového cyklu, kde citrát vzniká za katalýzy citrát-syntázou. V případě výskytu patologie lidského organismu může dojít k nesprávným regulacím těchto biosyntetických drah (Spinelli, et al. 2018). Mitochondrie se také podílejí na syntéze steroidních

hormonů a bylo zjištěno, že mitochondriální funkce může zase reagovat na aktivitu pohlavních hormonů (Brand, 2014).

2. Adenosintrifosfát

Adenosintrifosfát je vysoce energetická sloučenina, která je velmi důležitá pro funkci všech eukaryotních i prokaryotních buněk, energetickou bilanci a udržení homeostázy. Má systematický název ((2R,3S,4R,5R)-5-(6-amino-9H-purin-9-yl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)methylhydrogentrifosfát a jeho molární hmotnost je 507,184 g/mol (PubChem Database, 2019). Molekula ATP je nositelem energie v anabolických a katabolických dějích a účastní se řady metabolických a signalizačních drah intracelulárně i extracelulárně. Adenosintrifosfát řadíme mezi makroergní sloučeniny. Jsou to takové sloučeniny, které mají vysoký obsah chemické energie a podléhají jednoduchému, vždy však enzymově řízenému štěpení. Produkty vzniklé z tohoto štěpení mají mnohonásobně nižší energii než výchozí sloučenina. Energie, která se z této reakce uvolní, může být využita pro energeticky náročné endergonické procesy probíhající v organismu, nebo v opačném případě může být energie získaná z exergonického procesu využita na endergonickou syntézu ATP (Kodíček, et al. 2018). Mezi další důležité procesy, které ATP podporuje, patří aktivní transport, fosforylace a svalové kontrakce způsobené aktivací myozinů za spotřeby ATP (Bonora, et al. 2012). Při aerobních dějích je ATP syntetizován intracelulárně v mitochondriích procesem oxidativní fosforylace a u rostlin kromě mitochondrií vzniká také fotofosforylací ve fotosyntetizujících thylakoidech chloroplastů (Kodíček, et al. 2018). V lidském organismu se ATP vyskytuje především intracelulárně ve vysokých koncentracích (3-10 mmol/l). Oproti tomu koncentrace ATP obsaženého v extracelulárním prostředí je mnohem nižší. Jen zanedbatelné množství se nachází například v krvi nebo v tkáňovém moku (cca 20-100 nmol/l) (Bonora, et al. 2012). Energeticky bohaté sloučeniny, jako je ATP, jsou nestabilní v kyselém a alkalickém prostředí a jsou termosenzibilní (Fursule, 2009). Díky tomu je pro přerušení relativně slabé vazby mezi fosforem a kyslíkem potřeba jen nízká aktivační energie a fosfátová skupina je tak snadno přenášena z jedné molekuly na druhou za současného uvolnění energie (Bonora, et al. 2012; Kodíček, et al. 2018). V lidském těle je ATP nejvíce spotřebovávánou i nejvíce produkovánou molekulou a každý den je ho syntetizováno 40 až 910 kg.

2.1 Historie objevu ATP a výzkumů týkajících se ATP

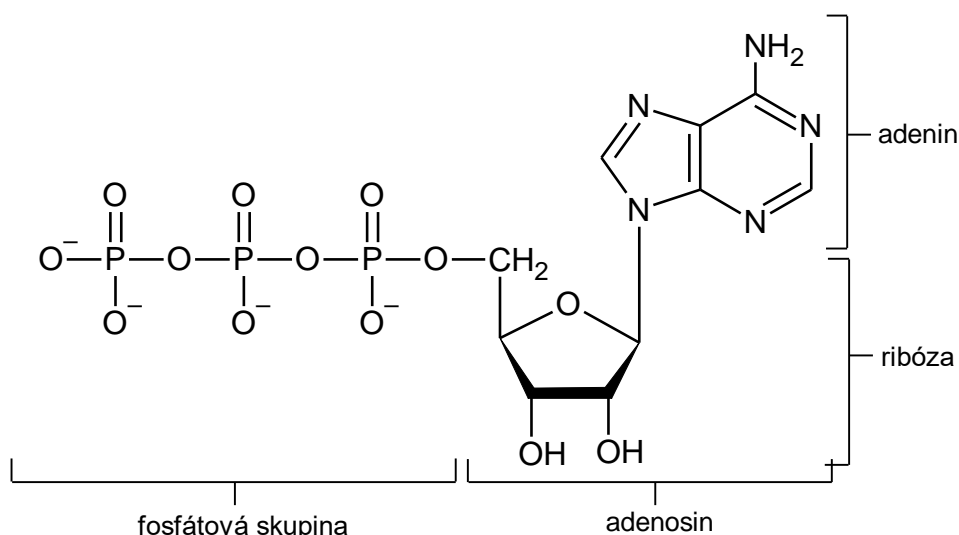
Existence ATP byla objevena v roce 1929, a to současně dvěma různými vědeckými institucemi. Průlomový objev učinil německý chemik Karl Lohmann, který spolupracoval s Ottem Meyerhofem. Souběžně s nimi však tento objev učinil i profesor biochemie Cyrus H. Fiske ve spolupráci s Yellapragadou Subbarowem. Ten dokázal, že stahování svalových buněk je umožněno intracelulární aktivitou, která závisí na molekule sestavené z adenosinu a tří fosfátů, tedy ATP. Ačkoliv se jednalo o dvě analogické práce, po prozkoumání detailů obou studií bylo dosaženo závěru, že oba nezávisle na sobě objevili molekulu ATP. Přesto se zásluhy připisují spíše Lohmannovi, protože jeho práce předcházela tu Fiskeho a Subbarowovu a také kvůli jeho zdařilým úspěchům, zahrnujícím například Lohmannovu reakci, což je kreatinkinázová reakce, kdy cytoplazmatický enzym kreatinkináza katalyzuje přenos fosfátu z kreatinfosfátu na ADP za vzniku ATP a kreatinu (Žurmanová, 2014). Přesná stavba molekuly byla ale objasněna až o několik let později. Správná struktura byla poprvé navržena Katashi Makinou v roce 1935 a kompletní struktura byla potvrzena až po deseti letech Basilem Lythoguem a Alexandrem R. Toddem, kteří molekulu ATP chemicky syntetizovali (Khakh, Burnstock, 2009).

O další objevy týkající se ATP se zasloužili například americký biochemik Fritz Lipmann, který navrhl koncept vysokoenergetické fosfátové vazby (Maruyama, 1991) nebo výzkum Engelhardta a Liubimova ve kterém bylo potvrzeno, že přípravky myozinu mají ATP aktivitu štěpící jednu fosfátovou skupinu rychle a ostatní velmi pomalu nebo vůbec. Ukázali tak, že ATP aktivita svalu je spojena s myozinovou frakcí svalových proteinů a poprvé v roce 1932 prokázali oxidativní fosforylaci (Needham, 1942). Výzkumem oxidativní fosforylace a syntézy ATP se dále zabýval americký biochemik Paul D. Boyer, který navrhl hlavní principy a mechanismy syntézy ATP včetně katalytické kooperace a rotační katalýzy. Za tento výzkum se podílel na převzetí Nobelovy ceny společně s Johnem E. Walkerem a Jensem C. Skouem (Kresge, et al. 2006; Boyer, 2002). Britský chemik Peter Mitchell navrhl chemiosmotickou hypotézu. Byla založena na tom, že živé buňky mají membránový potenciál a pohyb nabitých iontů přes membránu je ovlivněn elektrickými silami a tendencí látek difundovat z oblastí s vyšší koncentrací do oblastí s nižší koncentrací. Dokázal,

že syntéza ATP je spojena s tímto elektrochemickým gradientem a že energie potřebná k výrobě ATP je dodávána v podobě H^+ protonů protékajících mitochondriální membránou (Mitchell, 1966).

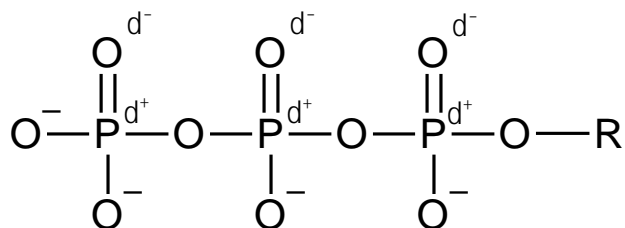
2.2 Struktura molekuly ATP

Adenosin trifosfát je nukleotid, který je tvořen z ribózy, adeninu a tří fosfátových skupin. Ribóza je 5 uhlíkatý cukr nacházející se v centru molekuly, který je i základní strukturní jednotkou ribonukleové kyseliny (RNA). Z jedné strany je ribóza navázána N-glykosidickou vazbou na purinovou bázi adenin, a z druhé strany jsou fosfodiesterovou vazbou navázány fosfátové skupiny (obr. 5). Ribózový cukr společně s adeninovou bází tvoří adenosinovou složku ATP, ale trifosfátová část molekuly, která je navzájem spojena anhydridovými vazbami je důležitější, protože tvoří reaktivní místo, kterým se ATP účastní buněčných reakcí, zvané také jako „aktivní oblast“ (Ng et al., 2016).



Obr. 5: Chemická struktura adenosin trifosfátu.

Pyrofosfátová skupina je při pH 7 plně ionizovaná. Na fosforu se nachází pozitivní parciální náboj a na kyslíku negativní parciální náboj. Dochází tak k polarizaci vazby fosforu na kyslík (obr. 6). Když je pyrofosfátová skupina hydrolyticky štěpena, z molekuly se uvolní energie. Stejným principem dochází k uvolnění energie i při přeměně ADP na adenosinmonofosfát (AMP) a anorganický fosfát.



Obr. 6: Lokace parciálních nábojů na atomech kyslíků a fosforu v pyrofosfátové skupině (Fursule, 2009).

Důvody, proč má ATP tak vysokou vnitřní energii, mohou být dva. Prvním z nich je ten, že na sebe záporné náboje na trifosfátovém řetězci působí elektrostatickou odpudivou silou, protože trifosfátová část řetězce je při neutrálním pH zcela disociována. Každé oddálení nabitých fosfátových skupin během hydrolytického štěpení ATP na ADP (AMP) vede k výraznému snížení elektrostatické energie systému molekuly.

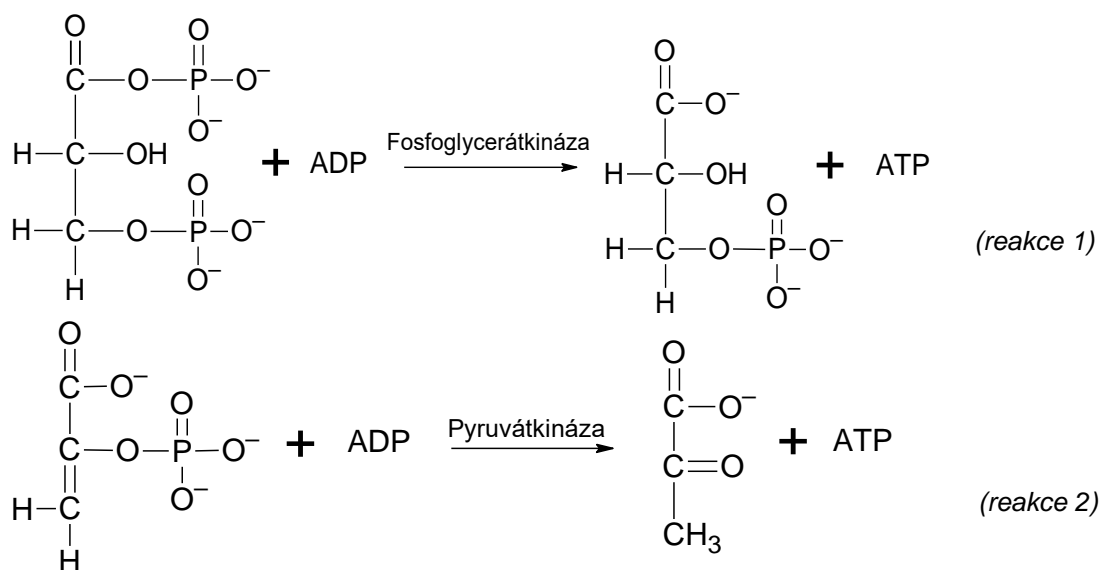
Druhým důvodem může být skutečnost, že trifosfátový řetězec může existovat hned v několika rezonančních stavech, a to kvůli tomu, že některé z jeho kyslíků přecházejí mezi anionickým a nenabitým stavem. Podle obecné teorie chemické vazby však se stoupajícím počtem možných rezonančních stavů, klesá energie systému. Pokud je ATP hydrolyticky rozštěpen na produkt ADP nebo AMP, počet možných rezonančních stavů se ještě navýší a celková energie v systému bude tedy nižší než v původní molekule ATP (Kodíček, et al. 2018).

2.3 Syntéza ATP a tvorba energie

Substráty oxidačních reakcí, při nichž dochází k uvolnění volné energie jsou sacharidy, lipidy a bílkoviny. Tato energie může být uložena ve fosfoanhydridových vysokoenergetických vazbách nacházejících se v molekulách ATP či ADP, ale také například ve fosfoenolpyruvátu, karbamoylfosfátu a některých fosfagenech jako je fosfoarginin nebo fosfokreatin. Během metabolických reakcí spotřebovává buněčný organismus cukry, aminokyseliny nebo mastné kyseliny. Výsledkem těchto metabolických reakcí je poté uvolnění energie ve formě ATP nebo guanosintrifosfátu (GTP). Nejvíce využívaným zdrojem energie je glukóza, která je následně katalyzovaná ve třech po sobě jdoucích procesech.

2.3.1 Glykolýza

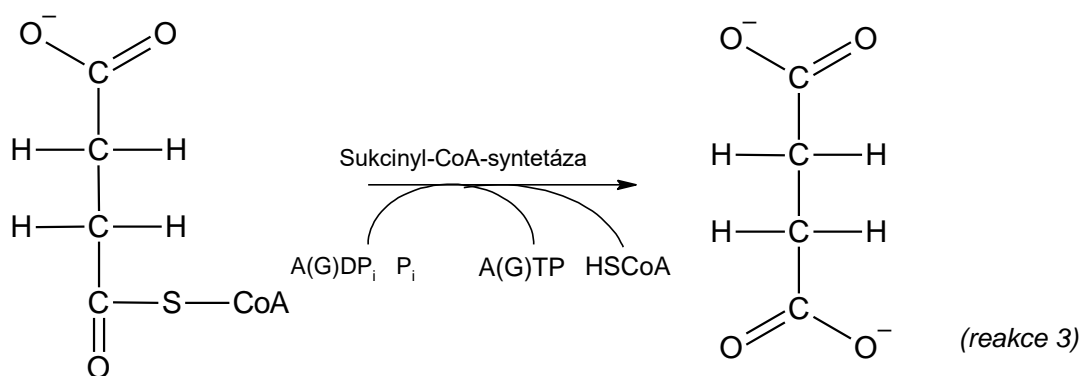
Jako první nastává glykolýza, což je soubor deseti enzymaticky katalyzovaných reakcí probíhajících v cytosolu buněk, kterými je glukóza postupně přeměňována na dvě molekuly pyruvátu. V první reakci glykolýzy se glukóza přeměňuje pomocí enzymu hexokinázy a energie dodané ve formě ATP na glukózu-6-fosfát a obdobně tomu tak je i při přeměně fruktózy-6-fosfátu na fruktózu-1,6-bisfosfát za pomoci enzymu fosfofruktokinázy. V následujících reakcích procesu glykolýzy dochází ke dvěma konverzím, ve kterých probíhá syntéza ATP. Při reakci, kdy se za katalýzy enzymu fosfoglycerátkinázy přeměňuje 1,3-bisfosfoglycerát na 3-fosfoglycerát, dochází k přenosu fosfátové skupiny z 1,3-bisfosfoglycerátu na ADP za vzniku ATP (reakce č. 1). Pomocí enzymu pyruvátkinázy je přenesena fosfátová skupina z fosfoenolpyruvátu na ADP, přičemž vznikne ATP a pyruvát (reakce č. 2). Dvě molekuly ATP jsou spotřebovány ze začátku glykolýzy a celkem čtyři molekuly ATP jsou vytvořeny. Při energetické bilanci glykolýzy tedy dochází ke konečnému zisku dvou molekul ATP (Li, et al. 2015).



2.3.2 Citrátový cyklus

Dalším krokem k získání energie a k syntéze ATP je citrátový cyklus, známý také jako Krebsův cyklus či cyklus trikarboxylových kyselin (TCA; *Tricarboxylic Acid Cycle*). Zde je výchozí sloučeninou pyruvát, který je produktem glykolýzy a prostřednictvím aktivity pyruvátdehydrogenázového komplexu, který je složený ze tří enzymů, je oxidován na acetyl-CoA a jako vedlejší produkt je vytvořen oxid

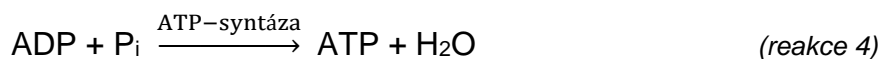
uhličitý. Acetyl-CoA poté vstupuje do citrátového cyklu, který umožňuje vznik redukované formy NADH z oxidované formy NAD⁺ a redukované formy FADH₂ z jeho oxidované formy FAD. Tyto koenzymy jsou následně substrátem pro první enzymový komplex dýchacího řetězce a jsou nezbytné pro produkci ATP v procesu oxidativní fosforylace, neboť jsou nositeli vysokoenergetických elektronů získaných při spalování uhlohydrátů, tuků a jiných substrátů v dřívějších fázích jejich oxidace. Molekula ATP je však citrátovým cyklem vytvořena pouze jedna, a to při reakci, ve které se přeměňuje sukcinyl-SCoA na sukcinát prostřednictvím enzymu sukcinyl-CoA-syntetázy (reakce č. 3). Tato reakce využívá energii získanou z odbourání CoA k fosforylaci ADP na ATP, nebo guanosindifosfátu (GDP) na GTP (Bonora, et al. 2012; Kodíček, et al. 2018; Li, et al. 2015). Zajímavostí je, že ačkoliv je citrátový cyklus součástí aerobního metabolismu, sám o sobě molekulární kyslík nevyužívá (Alberts, et al. 2002).



2.3.3 Oxidativní fosforylace

Závěrečnou fází aerobního katabolického procesu, zajišťujícího tvorbu ATP, je dýchací řetězec. Jedná se o elektronový transportní řetězec ve vnitřní mitochondriální membráně, který přijímá elektrony s vysokou energií. Tyto vysokoenergetické elektrony jsou z redukovaných koenzymů NADH a FADH₂, pocházejících z glykolýzy nebo citrátového cyklu, vedeny postupně přes komplexy až na konečný akceptor elektronů, jímž je u aerobních organismů molekulární kyslík. Ten je poté procesem oxidativní fosforylace, probíhající v mitochondriích, redukován na vodu. Při oxidativní fosforylaci je řízena tvorba ATP a zahrnuje také generaci protonového gradientu (pH gradientu) na membráně a chemiosmotickou vazbu.

Proces přenosu elektronů začíná tehdy, když elektron, který se vyskytuje na koenzymu NADH v mitochondriální matrix, je přijímán do části proteinového komplexu I zasahujícího do matrix. Zároveň při přenosu elektronů dochází vlivem energie uvolněné při oxidačních a redukčních reakcích k deprotonaci NADH (aby mohla být zpětně regenerována z NAD⁺ na NADH). Uvolněný vodíkový proton je komplexem I, který funguje také jako protonová pumpa, čerpán skrze vnitřní membránu do mezimembránového prostoru mitochondrií. Kromě komplexu I dochází k čerpání protonů do mezimembránového prostoru také přes komplex III a komplex IV. Nezávisle na tomto procesu jsou protony pasivně propouštěny zpět do mitochondriální matrix skrze ATP syntázu, kterou díky svému průchodu roztáčí a dochází tak k produkci ATP oxidativní fosforylací (reakce č. 4). Tímto neustálým transportem protonů přes komplexy a zpět, zajišťují protony protonový gradient a vytvářejí protonmotivní sílu, kterou lze měřit v jednotkách milivoltů (mV). V průměrné buňce je protonmotivní síla na vnitřní membráně mitochondrie přibližně 200 mV a je tvořena mitochondriálním membránovým potenciálem, což je elektrochemický gradient, který vzniká na vnitřní membráně transportem elektronů po elektronovém řetězci, o síle přibližně 140 mV a pH gradientem o přibližně -1 pH jednotky (Alberts, et al. 2002).

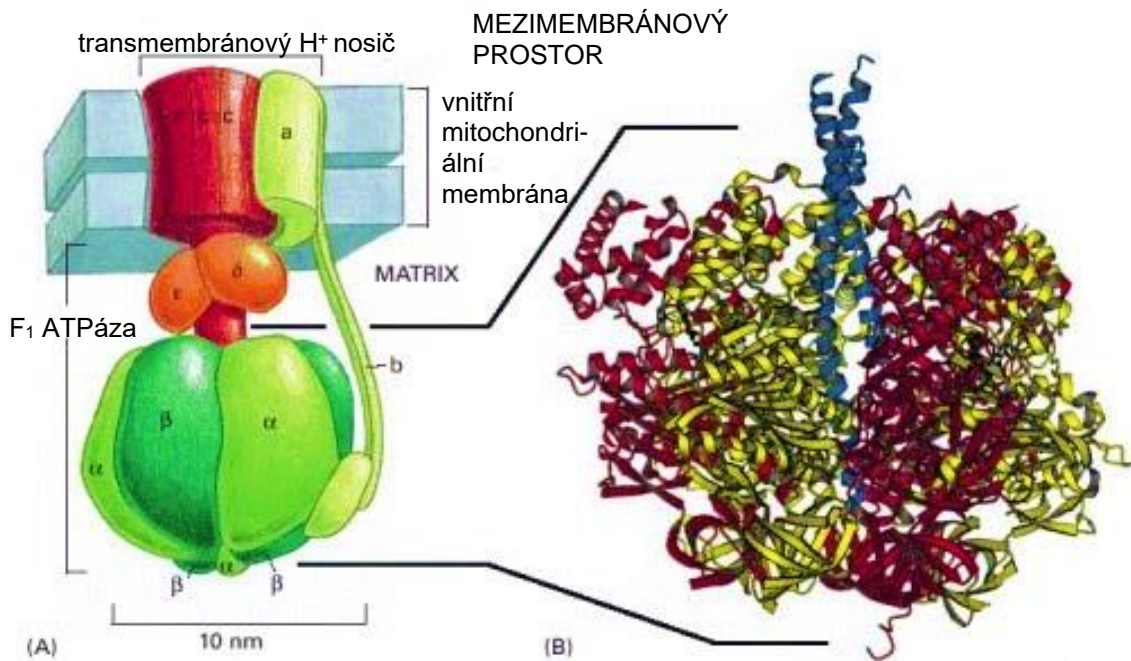


Elektrony vstupující do elektronového transportního řetězce začínají s velmi vysokou energií a postupně o ni přicházejí při průchodu dýchacím řetězcem. Dráha, kterou jsou elektrony vedeny, se skládá ze čtyř vícesložkových enzymových komplexů, komplex I až komplex IV, umístěných na vnitřní mitochondriální membráně. Pátým komplexem je pak ATP syntáza, která už netransportuje elektrony, ale využívá protonmotivní síly pro čerpání H⁺ z mezimembránového prostoru do matrix. Komplex I (NADH: ubichinon oxidoreduktáza) je velký komplex ve tvaru L složený ze 45 polypeptidových podjednotek. Přes komplex I se oddělují dva vysokoenergetické elektrony z NADH a navazují se na akceptorovou skupinu flavinmononukleotid (FMN). Přijetím těchto elektronů dochází k redukci FMN na FMNH₂, která obsahuje stejnou prostetickou skupinu, isoalloxazin, jako FAD. Elektrony jsou poté

komplexem přepravovány přes FeS proteiny, které obsahují komplexy železa a anorganickou síru, až na koenzym Q známý také jako ubichinon. Ten kromě dvou elektronů přijímá také dva vodíkové protony a napomáhá udržení elektrochemického gradientu. Po akceptování dvou elektronů a protonů je ubichinon redukován na ubichinol, který dále přenáší elektrony na komplex III. Komplex II (sukcinát: ubichinon oxidoreduktáza) je proteinový komplex obsahující sukcinátdehydrogenázu, která katalyzuje reakci citrátového cyklu kdy je sukcinát oxidován na fumarát za současné redukce FAD na FADH₂. Komplex II nemá rozdíl od komplexu I funkci protonové pumpy a je zodpovědný za získávání elektronů z FADH₂. V komplexu jsou elektrony z FADH₂ odebrány, čímž kofaktor znovu získá oxidovanou formu, a přesouvány řadou FeS skupin, dokud neskončí opět na ubichinonu. Ten, jako v případě prvního komplexu, podléhá redukcí na ubichinol. V obou případech se poté ubichinol od komplexu oddělí a pokračuje dále elektronovým transportním řetězcem ke komplexu III (ubichinol: cytochrom c oxidoreduktáza). Komplex III, známý také pod názvem Q cyklus, je složen z 11 polypeptidových řetězců a jeho funkcí je převést vysokoenergetické elektrony z ubichinolu na jinou molekulu sloužící jako přenašeč, a to cytochrom c. Ten poté přenáší jediný elektron na komplex IV (cytochrom c oxidoreduktáza), který je posledním ale významným článkem elektronového transportního řetězce. Dvě redukované molekuly cytochromu c předávají komplexu dva elektrony, čímž se sami oxidují. Tyto elektrony, které jsou postupně přenášeny prostetickými skupinami komplexu, doputují k měďnatému atomu a k hemové skupině a zredukuje je. Na tyto dvě zredukované formy se naváže kyslík a vytvoří mezi nimi takzvaný peroxidový most. Do komplexu jsou poté z matrix přijaty dva vodíkové protony, které vazbu mezi kyslíky rozdělí a vytvoří skupinu hydroxidu mědi a hydroxidu hemu. Dalšími dvěma protony, které komplex IV z matrix přijme, se hydroxydové skupiny navrátí do svého původního oxidovaného stavu, a z vodíkových iontů a zbývajících hydroxylů jsou syntetizovány dvě molekuly vody. Každý komplex v řetězci má pro elektrony vyšší afinitu než jeho předchůdce a koncový kyslík má pro elektrony afinitu nejvyšší (Enríquez, 2016; Vedel, et al. 1999).

Jedinou cestou, kterou však mohou vodíkové ionty prostoupit membránou zpět do matrix je skrze pátý mitochondriální bílkovinný komplex ATP syntázu,

jenž je vázána na vnitřní membráně. ATP syntáza, nazývaná také F_0F_1 ATPáza, je multipodjednotkový protein o hmotnosti vyšší než 500 kDa. Komplex je složen z enzymové hlavové části, nazývané F_1 ATPáza a transmembránového H^+ nosiče nazývaného F_0 (0 značí citlivost proteinu k oligomycinu což je toxin, který inhibuje toku protonů) podílejícího se na protonové translokaci. Obě tyto části jsou tvořeny z ještě dalších podjednotek. Hlava ATP syntázy je tvořena prstencem ze 3α a 3β podjednotek a zasahuje do mitochondriální matrix (Neupane, et al. 2019). Podlouhlé rameno hlavu přidržuje na místě a přivazuje ji ke skupině transmembránových proteinů, které tvoří „stator“ v membráně (zelený). Tento stator je v kontaktu s „rotorem“, rotující stopkou, která je tvořena prstencem 10 až 14 identických transmembránových proteinových podjednotek (červeně) (obr. 7).



Obr. 7: (A) struktura ATP syntázy. (B) Trojrozměrná struktura F_1 ATPázy, stanovená rentgenovou krystalografií (Alberts, et al. 2002).

Při průchodu protonů úzkým kanálem vytvořeným mezi státorem a rotorem dochází k rozpořbování prstence rotoru a s ním se otáčí také k rotoru připojená stopka (obr. 7B, modrá část). Díky této stopce se rychle otočí uvnitř enzymové hlavy komplexu. V důsledku toho byla vytvořena hydrofilní cesta přes vnitřní mitochondriální membránu, která umožňuje protonům stékat po jejich elektrochemickém gradientu. Energie těchto protonů stékajících po gradientu je přeměněna na mechanickou energii prostřednictvím dvou sad proteinů, které

se o sebe vzájemně třou, a to rotující stonkové proteiny, které tlačí proti stacionárnímu kruhu hlavových proteinů. Tři ze šesti podjednotek v hlavě obsahují vazebná místa pro ADP a anorganický fosfát. Tyto podjednotky jsou poháněny k tvorbě ATP, zatímco je mechanická energie přeměňována na chemickou vazebnou energii skrze opakované změny v bílkovinné konformaci. Tímto způsobem je ATP syntáza schopna produkovat více než 100 molekul ATP za sekundu. Je za potřebí tři nebo čtyř protonů, které musí projít tímto komplexním procesem, aby mohla být vytvořena jednotlivá molekula ATP. Metabolismus cukrů je dokončen v mitochondriích a celý proces je natolik efektivní, že za každou molekulu oxidované glukózy je vyprodukováno přibližně 30 molekul ATP. Syntéza ATP není jediným procesem řízeným elektrochemickým gradientem protonů. V mitochondriích je také mnoho nabitých malých molekul, jako je pyruvát, ADP a Pi, které jsou čerpány do mitochondriální matrix z cytosolu, zatímco jiné, jako je ATP, se musí pohybovat opačným směrem. V eukaryotických buňkách se tedy protonový gradient používá k řízení jak tvorby ATP, tak k přenosu určitých metabolitů přes vnitřní mitochondriální membránu (Jonckheere, et al. 2012; Alberts, et al. 2002).

Adenosintrifosfát, kromě přenosu energie, působí jako extracelulární signalizační molekula prostřednictvím interakcí se specifickými purinergními receptory. Signální aktivita ATP byla poprvé objevena mezi nervovými buňkami a svalovou tkání. Jako neurotransmitter se ATP podílí na mozkových funkcích, na komunikaci mezi neurony navzájem nebo mezi neurony a gliovými buňkami. Signalizační ATP nebo jeho produkty rozkladu se podílejí na pohybu, spánku, a na učení a paměti. Stimuluje také vývoj a opravy tkání po poranění, a může i podporovat smrt buněk v případě neurodegenerativních onemocnění. Dále se podílí na smyslovém vnímání, kdy ATP reguluje informace pocházející ze sensorů v uších, očích nosu či jazyku. Společně s noradrenalinem molekula ATP stimuluje kontrakce srdečního svalu. Signální aktivitou ATP je také ovlivňováno vylučování enzymů během trávení a střevní kontrakce, stejně také kontrakce močového měchýře, a i erekce či relaxace penisu vyžaduje signalizování ATP. Aktivací ATP receptorů se stimulují buňky vytvářející kosti a zprostředkovává přeměnu kožních buněk při regeneraci. Uvolněné ATP z poraněné tkáně pobízí buňky imunitního systému, aby vyvolali zánět nebo jim

ATP signalizace může napomáhat při eliminaci buněk infikovaných bakteriemi. Mají také nepřímou roli v proliferaci a apoptóze melanocytů a komplexní roli v Langerhansově buněčné adaptivní imunitě (Khakh, et al. 2009).

3. Typy buněčného poškození

Buňky si ve svém fyziologickém stavu udržují stabilní vnitřní prostředí, které nazýváme jako homeostázu. Pokud ale na buňky začne působit nadměrný fyziologický nebo patologický stres, jsou donuceny se přizpůsobit a reagovat na tyto stimuly tak, aby si udržely stabilní intracelulární prostředí. Novému ustálenému stavu se adaptují svým počtem a buněčným typem v tkáni, změnou velikosti, tvaru a funkce ve vztahu k působícímu stresu. Procesy adaptace zahrnují atrofii (zmenšení velikosti buněk), hypertrofii (zvětšení velikosti buněk), hyperplazii (zvýšení počtu buněk v orgánu nebo tkáni) a metaplazii (reverzibilní změna typu buněk). Fyziologická adaptace je navozena reakcí buněk, které odpovídají na stimulaci hormony nebo endogenními mediátory a patologická adaptace představuje přímou reakci na stres, který umožňuje buňkám modifikovat jejich strukturu a funkci, a tím zamezit jejich dalšímu poškození a následně zahájit vlastní opravu. Adaptace je reverzibilní a poškození buňky, které při ní nastává, je obvykle mírné. Zachová si však díky němu svoji životaschopnost. Pokud na buňku působí příliš mnoho stresu, nebo je stres už ze své podstaty škodlivý, dojde k překročení její adaptivní kapacity. Buňka se nadále nedokáže reparovat a vstupuje do období stárnutí nebo nastane proces buněčné smrti (Zhang, et al. 2013). Poškození většího množství buněk vede k poškození příslušného orgánu, což je poté prezentováno jako klinický projev nemoci. K poškození buněk dochází kvůli vnitřním i vnějším změnám v prostředí, které mohou být způsobeny chemickými, fyzikálními, biologickými, infekčními, imunologickými či genetickými faktory. Mezi vnější příčiny poškození buněk můžeme zařadit například teplo či chlad, radiační záření, toxiny, léky, viry a bakterie. Mezi příklady vnitřních příčin poškození mohou patřit metabolity, hormony, genetické defekty, cytokiny a další bioaktivní látky. K samotné buněčné smrti může dojít programovanou cestou, apoptózou (a autofagií), nebo cestou smrti způsobenou akutním traumatem, nekrózou. Kromě tohoto základního označení jsou popisovány ještě další podtypy buněčné smrti. Patří mezi ně například nekroptóza, ferroptóza, pyroptóza, entotická a NETotická buněčná

smrt, imunogenní buněčná smrt, parthanatos atd. (Galluzzi, et al. 2018). Zda buňky vyvolají obrané mechanismy nebo podlehnou buněčné smrti, závisí především na povaze stresu, a délce jeho působení.

3.1 Apoptóza

Apoptóza je programovaná forma buněčné smrti a je považována za důležitou součást různých procesů buňky. Mezi takové procesy můžeme zařadit například přirozený buněčný obrat, kdy k apoptóze dochází přirozeně během vývoje a stárnutí buněk, čímž je udržována buněčná populace v tkáních, a to takovým způsobem, že jsou staré buňky tkáně apopticky usmrcovány a konstantně nahrazovány buňkami mladšími. Apoptóza také hraje roli při správném vývoji a činnosti imunitního systému, kdy slouží také jako obranný mechanismus při poškození buněk škodlivými činiteli. Dalšími procesy, kterých se apoptóza účastní, mohou být hormonálně závislá atrofie, embryonální vývoj nebo i prevence rakoviny (Elmore, 2007). Aby mohla být zachována normální funkce a fyziologie tkání, je nezbytně nutné, aby byly poškozené, nefunkční nebo nepotřebné buňky neustále odstraňovány a nahrazovány novými a zdravými buňkami. Pokud je tato funkce porušena a dochází k odstraňování příliš velkého nebo příliš malého množství buněk, dochází k řadě neurodegenerativních, kardiovaskulárních a infekčních chorob a k mnoha dalším nemocem, vedoucích mnohdy až k úmrtí. Mezi tyto nemoci patří například AIDS, rakovina nebo autoimunitní onemocnění (Sartorius, et al. 2001).

Při apoptické smrti buňky aktivují vlastní enzymy jako primární efekторы, a ty degradují vlastní jadernou DNA společně s proteiny obsaženými v cytoplazmě a v jádře. Přípravují tak buňky procházející procesem apoptózy, aby mohly být odstraněny fagocyty a způsobovaly okolním buňkám a tkáním jen minimální stres. Těmito enzymy jsou kaspázy, patřící do skupiny cysteinových proteáz. Podle jejich umístění v apoptické transdukci signálu se kaspázy dělí na iniciační (kaspáza-2, -8, -9, -10) a efektorové (kaspáza-3, -6, -7). Kromě proteolytického odstraňování buněčných struktur, včetně cytoskeletu, mitochondrií, endoplazmatického retikula a dalších, se kaspázy v organismu podílejí také na procesu zánětu. Kaspázy jsou nejprve syntetizovány jako jednořetězcové neaktivní proenzymy prokaspázy, které po své aktivaci štěpí různé substráty v jádru nebo v cytoplazmě (Fulda, et al. 2009). Aktivace proenzymů je závislá

na permeabilitě vnější mitochondriální membrány a její schopnosti propouštět z mitochondrie cytochrom c, jehož uvolnění do okolí buňky právě signalizuje zahájení apoptózy (Samali, et al. 2010). Sloučení proteinových komplexů s vysokou molekulovou hmotností vytváří základnu sloužící pro aktivaci iniciačních kaspáz, které se následně štěpí, čímž aktivují efektorové kaspázy, které vedou k uskutečnění apoptické buněčné smrti následované změnami v jaderné morfologii. Z podrobnějšího pohledu je apoptóza iniciována buď externími nebo interními stimuly, kterými mohou být například vyčerpání růstových faktorů či hormonů nebo tepelný šok, a její mechanismus probíhá dvěma odlišnými cestami. Vnitřní cestou, která je zprostředkována mitochondriemi a vnější cestou, kterou zprostředkovávají transmembránové proteiny označované jako receptory smrti. Konvergencí obou těchto cest dochází ke zvláštnímu způsobu apoptózy, která využívá namísto kaspázy molekulu AIF (*Apoptosis-Inducing Factor*), neboli faktor indukující apoptózu.

Vnitřní aktivační cesta apoptózy je iniciována interními stimuly z mitochondrie buňky. Klíčovými regulátory této dráhy jsou proteiny Bcl-2 (*B-Cell Lymphoma*) vyskytující se na vnější mitochondriální membráně. Je to soubor proteinů, které v sobě obsahují jednu či více Bcl-2 homologických aminokyselinových sekvencí značených jako BH1 až BH4. Tyto sekvence jsou podle svých funkcí rozděleny do tří podtříd. Proteiny, které tvoří první podtřídou, obsahují až čtyři domény BH a jejich funkcí je přežití buňky. Proteiny druhé podtřídou obsahují pouze jednu BH doménu a jsou pro-apoptické pouze pro BH3, které iniciují vnitřní cestu. Těmito aktivátory apoptózy mohou být například Bcl2L11 (*Bcl-2-Like protein 11*) nazývaný také jako Bim, agonista smrti domény interagující s BH3 označovaný pod zkratkou Bid a mnoho dalších. Když je buňka ve fyziologickém stavu, zabraňují Bcl-2 proteiny procesu apoptózy. Pokud však dojde k jejímu poškození jsou produkovány a uvolňovány pro-apoptické proteiny třetí podskupiny nazývané Bax (*Bcl-2 Associated X protein*) a Bak (*Bcl-2 homologous Antagonist/Killer*). Terminální transmembránové domény v Bax a Bak se pak před nebo po apoptickém stimulu ukotví na C-konci Bcl-2 a inhibují ho. Aktivací Bax nebo Bak proteinů dojde na povrchu mitochondrií ke změně sterického uspořádání těchto proteinů což jim umožňuje oligomerizovat a vytvářet makropóry ve vnější mitochondriální membráně a zvýšit tak

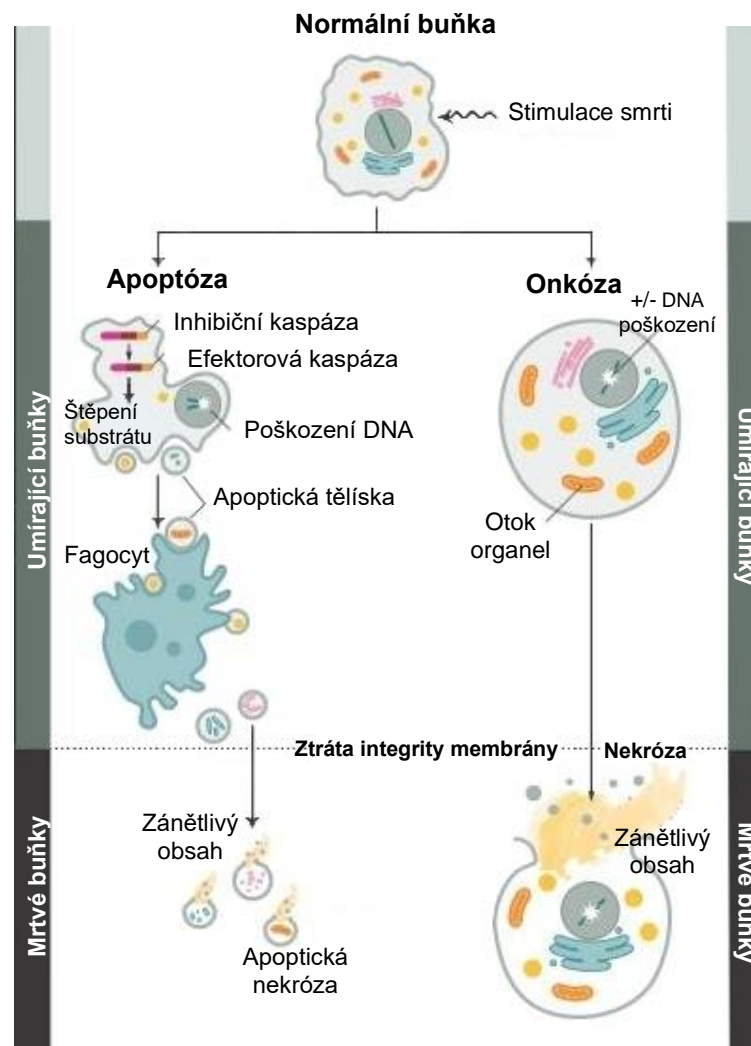
propustnost membrány pro cytochrom c, z mezimembránového prostoru, který se poté v buněčné cytoplazmě připojí na další typ proteinu známý jako apoptický proteázový aktivační faktor (Apaf-1; *Apoptotic Protease Activating Factor 1*). Tento protein po vazbě s cytochromem c tvoří oligomerní apoptozom, který se váže na prokaspázu-9 a štěpí jí na aktivovanou formu. Takto aktivovaná kaspáza-9 poté štěpí a rozkládá DNA a další vnitřní struktury a stimuluje kaspázovou kaskádu vedoucí k apoptóze buňky (Singh, et al. 2019; Dewson, et al. 2009).

Hlavním rozdílem mezi vnější a vnitřní cestou je, že signální molekuly, které stimulují proces apoptózy vnější cestou pocházejí z extracelulárního prostředí. Viabilní buňky obsahují speciální integrální membránové proteiny známé jako receptory smrti, které mohou vázat komplementární molekuly známé jako aktivátory smrti. Receptory smrti zprostředkovávají vnější apoptickou dráhu jsou podskupinou patřící do skupiny receptorů TNF (*Tumor Necrosis Factor*)/NGF (*Nerve Growth Factor*). Tato skupina je charakteristická dvěma až pěti extracelulárními doménami bohatými na cystein. Receptory smrti se zase vyznačují obsahem intracelulární domény smrti DD (*Death Domain*) složené ze svazku šesti α -helixů. Tato doména je důležitá pro přenos apoptického signálu. Do skupiny receptorů smrti patří TNF-R1 (CD120a; *Cluster of Differentiation 120*), CD95 (Apo-1; *apoptosis antigen-1* nebo také jako Fas), DR3 (*Death Receptor 3*) TRAIL-R1 (*TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*, známý také jako DR4), TRAIL-R2 (nebo také DR5), a DR6. Receptory smrti jsou aktivovány navázáním svých odpovídajících ligandů, které se nachází na membránovém povrchu a společně tvoří signalizační multiproteinový komplex DISC (*Death-Inducing Signaling Complex*). Tímto navázáním je stimulován vnitřní proces aktivující kaspázu-8, která dále aktivuje ostatní součásti kaspázové kaskády vedoucí ke zničení organel, struktur a DNA v jádře buňky, což vede k její programované smrti (Sartorius, et al. 2001). Programované odumření buňky mohou však kromě kaspáz vykonávat i proteázy kalpainy, katepsiny, endonukleázy a další, které mohou být řízeny například mitochondriemi, lysozomy nebo endoplazmatickým retikulem a mohou spolu i navzájem spolupracovat (Bröker, et al. 2005).

Poslední mechanismus vzniklý spojením vnější a vnitřní cesty využívá namísto kaspáz AIF, který se nachází v mezimembránovém prostoru mitochondrií. Je to oxidoreduktáza obsahující navázaný FAD, vykazující aktivity závislé na NADH. Když je stará či poškozená buňka předurčena k apoptóze, proteolyzovaný AIF je vypuštěn z mezimembránového prostoru do cytoplazmy buňky, odkud putuje do jádra. V jádře se naváže na DNA což má za následek kondenzaci chromatinu a degradaci DNA. Faktor AIF je v apoptóze závislý na druhu a typu buňky a podnětu vyvolávajícího smrt. Tento typ mechanismu je však především prováděn neurony (Sevrioukova, 2011). Proces apoptózy je charakterizován řadou morfologických znaků. Na počátku dochází ke smrštění buňky včetně jádra a ke kondenzaci jaderného chromatinu. Buňka se oddělí od okolní tkáně a její jádro postupně kondenzuje a rozpadá se. Plazmatická membrána se utěsňuje a vytváří vezikuly obsahující organely a zbytky jádra buňky. Tato apoptické tělíška jsou pohlcována makrofágy a jinými fagocytujícími buňkami, ve kterých dochází k jejich degradaci. (Saraste, et al. 2000).

3.2 Nekróza

Jedná se o neregulovaný energeticky nezávislý proces buněčné smrti, který vzniká jako následek nevratného poškození buňky. Nekróza je téměř vždy spojena s patologickým procesem a obvykle postihuje velkou oblast buněk na rozdíl od apoptózy, jenž ovlivňuje méně buněk nebo jen konkrétní buňku. Je však možné, aby se apoptóza a nekróza vyskytovali ve tkáni současně v závislosti na délce a intenzitě stimulu poškozujícího buňku a dostupnosti intracelulárního ATP a kaspáz. Za nedostatečného množství těchto dvou klíčových látek dochází k přechodu procesu apoptózy do nekrózy. Mezi hlavní mechanismy nekrotického poškození buněk patří přerušování přísunu energie do buňky nebo přímé poškození buněčné stěny. Mezi charakteristické morfologické změny, ke kterým dochází při nekróze, patří otok buňky (proces také známý jako onkóza), jádra i mitochondrií, a tudíž zvětšení jejího objemu, tvorba cytoplazmatických vakuol, otok nebo popraskání mitochondrií a lysozomů, a ztráta integrity plazmatické membrány (obr. 8). V důsledku porušení celistvosti membrány se z buňky uvolňuje cytoplazmatický obsah do extracelulárního prostředí, což spouští kaskádu vedoucí k zánětu a následně i k poškození tkáně (Elmore, 2007). Nekróza se v závislosti na vzhladu dělí na dva hlavní typy.



Obr. 8: Cesty vedoucí k buněčné smrti (převzato a upraveno dle Fink & Cookson, 2005).

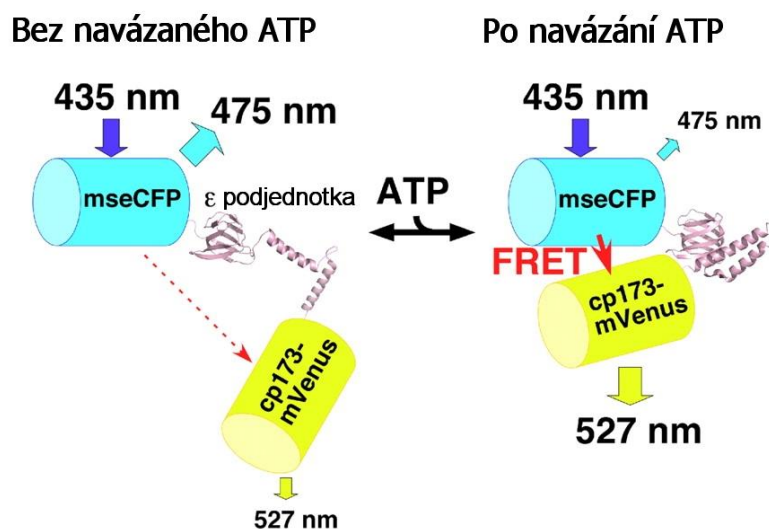
Kolikvační nekróza se vyznačuje částečným nebo úplným rozpuštěním odumřelé tkáně buňky bakteriálními nebo lysozomálními hydrolytickými enzymy, čímž tkáň transformují na tekutou hmotu. Při koagulační nekróze se tkáň naopak srazí a stavba tkáně je zachována i několik dní po buněčné smrti. Hlavním rozdílem mezi kolikvační a koagulační nekrózou je ten, že u kolikvační nekrózy není porušen enzymatický systém nekrotické tkáně a proces buněčného trávení může být zahájen okamžitě skrze autolýzu a heterolýzu. Buněčné trávení při koagulační nekróze je však závislé hlavně na heterolýze (Adigun, et al. 2019). Existuje několik popsaných cest přenosu signálu podílejících se na smrti nekrotické buňky. Jedním z klíčových mediátorů je serin/threonin RIP1 kináza (*Receptor Interacting Protein*), která je důležitá pro nekrózu vyvolanou receptorem smrti, a RIP3, která je zásadní pro nekrózu při stimulaci TNF cytokinů a také během virové infekce. RIP3 reguluje fosforylaci RIP1 a tím i generaci ROS.

Tyto reaktivní formy kyslíku vznikající především v mitochondriích jsou společně s vápníkem, stimulujícím jejich generaci, dalšími důležitými mediátory podílející se na šíření nekrotického signálu. Mohou způsobovat poškození buněčných organel a makromolekul a tím napomáhat narušení celistvosti buňky (Fulda, et al. 2009).

4. Detekce koncentrace ATP

Buňky jsou závislé na přísunu energie ve formě ATP produkovaného substrátovou či membránovou fosforylací. Zatímco běžné metody založené na analýze buněčné suspenze pro stanovení ATP poskytují průměrnou hladinu v souboru buněk, pro monitorování a souběžnou kvantifikaci hladin ATP v reálném čase uvnitř jednotlivých živých buněk neexistuje žádná metoda. Existují pokusy o metody měření hladin v reálném čase, ty však naráží na řadu problémů. Koncentrace ATP v buňkách se dají například stanovit pomocí bioluminiscenčního testu, kdy se kvantifikuje světlo produkované reakcí ATP s luciferázou, což je oxidoreduktáza umožňující bioluminiscenci živočichů a vyskytuje se například u světlušek. Luciferáza oxiduje svůj substrát luciferin na produkty oxyluciferin a energii, která je vyzařována ve formě světla. Množství uvolněných fotonů je poté kvantifikováno použitím luminometru. Mezi množstvím přítomného ATP a množstvím světla, které bylo vyzářeno, existuje lineární vztah (Casem, 2016). Průběh této chemiluminiscenční metody závisí na koncentraci intracelulárního ATP, luciferázy, a na koncentraci dalších substrátů jako luciferinu a kyslíku. Výsledky měření bývají ovlivněny, a to vlivem pH a přirozeným úbytkem ATP v buňce v důsledku fyziologických dějů. Zachycení luminiscenčního obrazu luciferinu vyžaduje delší dobu expozice a sledované hladiny ATP tak neodpovídají reálnému času. Jinými metodami lze stanovit koncentrace ATP měřením aktivity iontového kanálu nebo prostřednictvím konformačních změn K_{ATP} kanálu (draselného kanálu citlivého na ATP). Tyto metody jsou však omezeny pouze na měření oblastí kolem plazmatické membrány a expresí K_{ATP} kanálu může dojít k ovlivnění vlastností buněk. Dále byly vyvinuty fluorescenční indikátory ATP/ADP poměru. Používají se však spíše k měření celkové hladiny buněčné energie a k přímému zjištění koncentrace ATP v buňce je využít nelze. Následně byla v roce 2009 vyvinuta metoda, kterou je možné měřit hladiny ATP v jednotlivých živých buňkách a jejich různých kompartmentech použitím

geneticky kódovaného indikátoru ATP založeného na FRET (Fluorescence/ Förster Resonance Energy Transfer) nesoucího název ATeam (Adenosine 5'- Triphosphate indicator based on Epsilon subunit for Analytical Measurements), který využívá ϵ podjednotku bakteriální FoF₁-ATP syntázy (Imamura, et al. 2009). Pro ATeam senzor poskytuje ϵ podjednotka řadu výhod. Například se dokáže vázat na ATP, aniž by ho hydrolyzoval a také se vyznačuje velmi vysokou specifitou pro ATP na rozdíl od ostatních nukleotidů jako jsou ADP, GTP, CTP (cytidintrifosfát) a UTP (uridintrifosfát). Tento ATP indikátor odvozený od FRET je tvořen genetickou vazbou mseCFP, což je varianta azurového fluorescenčního proteinu, a monomerní cp173-mVenus, variantou žlutého fluorescenčního proteinu nesoucí aminokyselinovou substituci A206K (obr. 9). Tyto proteiny jsou navázané buď na N konec nebo C konec podjednotky ϵ . V takovéto konformaci lze senzor nazvat jako AT1.03 a je díky vazebné sekvenci optimalizován pro použití při 20 až 30 °C. Bez navázání na ATP dochází jen k nízkému přenosu energie fluorescenční rezonancí. Jakmile ale dojde k navázání ATP, změnou konformace dojde k přiblížení dvou fluoroforů k sobě a tím se zvýší účinnost přenosu rezonanční energie.



Obr. 9: Schématický náčrt ATP sondy založené na FRET, ATeam, varianta AT1.03 před a po navázání na molekulu ATP (upraveno dle Imamura et al. 2009).

Afinita ATeamu k ATP lze ovlivnit tím, že se ϵ podjednotka nahradí jiným druhem podjednotky, nebo prostřednictvím změny aminokyselinových zbytků na rozhraní domény, díky čemuž je možné cílit na specifické orgány v buňce jako je jádro nebo mitochondrie. S použitím této metody bylo zjištěno, že ačkoliv

se v mitochondriích ATP produkuje, tak jeho hladiny jsou překvapivě nižší než hladiny v cytoplazmě buňky. ATeam je schopný vizualizovat různé intracelulární kompartmenty v závislosti na přidaných signálních sekvencích nebo na navázání lokalizovaných proteinů. Sondu lze využít i k jiným úkonům biologického oboru, například ke studiu energetického metabolismu a mitochondriální funkce buněk. Sledování hladin ATP může být zase využito k vyhodnocení toxicity látek nebo životaschopnosti buněk, jelikož mrtvé buňky ztrácí svojí intracelulární ATP (Ando, et al. 2012).

5. Změny koncentrace ATP během buněčného poškození

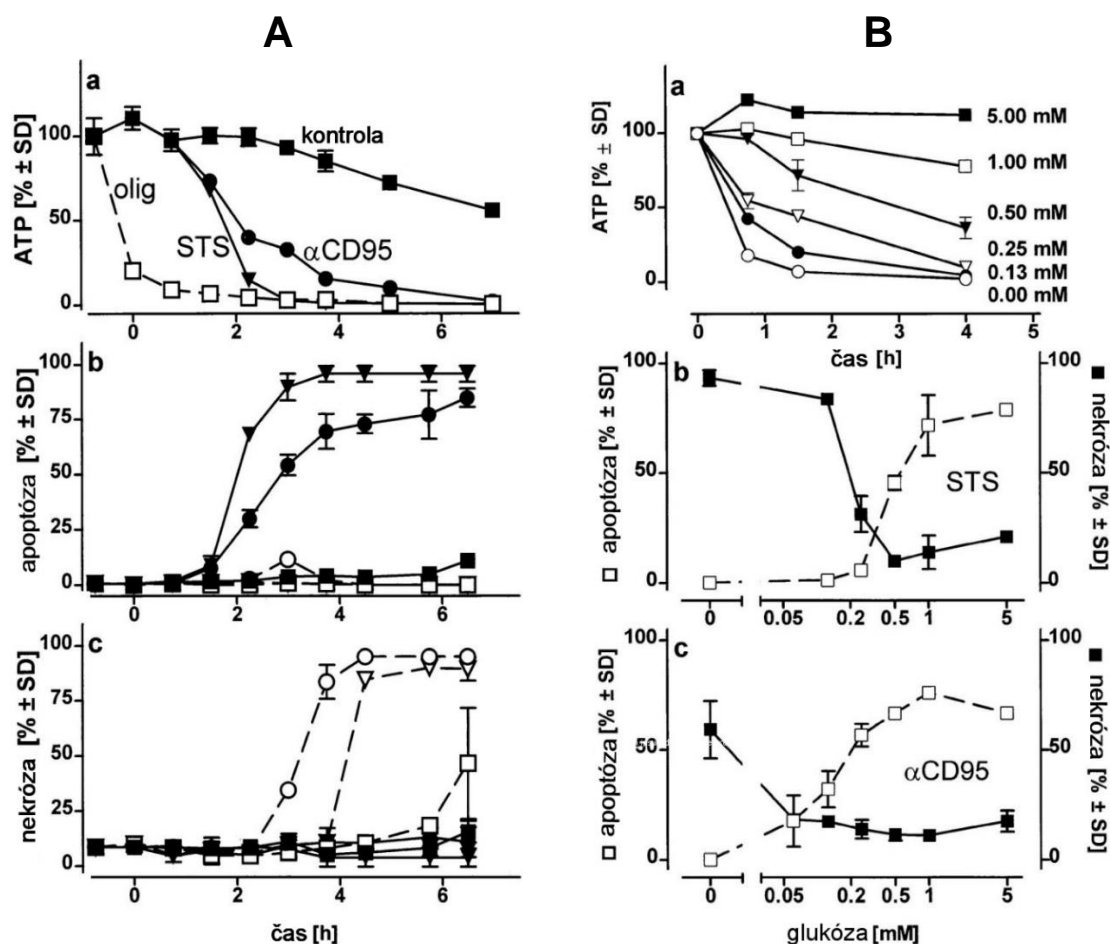
Proces apoptózy je energeticky aktivním procesem a vyžaduje udržování adekvátních hladin energie ve formě intracelulárního ATP, jelikož při něm probíhají vysoce regulované ATP dependentní procesy, které existují po směru i proti směru dráhy přenosu apoptického signálu. Mezi tyto procesy patří například aktivace kaspáz, hydrolyza makromolekul, kondenzace chromatinu a tvorba apoptických tělísek. Buňka zůstává viabilní, dokud koncentrace ATP neklesne pod určitou hodnotu. Proces apoptózy nastává, když hodnota ATP klesne, ale je ho v buňce stále dostatek na uskutečnění energeticky náročných apoptických procesů. Pokud dojde k přerušení přísunu energie a buněčné ATP prudce klesne, nebo je při procesu apoptózy spotřebováno, dojde k ovlivnění jednoho či více kroků apoptické dráhy. Tím se přeruší provádění procesů, jejichž aktivace je nutná pro apoptickou morfologii. Při těchto podmínkách buňky stále umírají, ale dochází ke změně způsobu buněčné smrti z apoptické na nekrotickou (Richter, et al. 1996).

Jakým způsobem ATP ovlivňuje buňku a jaká je jeho role při apoptóze a nekróze objasnil experiment ve kterém na buňkách Jurkat, což jsou linie immortalizovaných lidských T lymfocytů, byly použity dva apoptické induktory za podmínek deplece ATP, pomocí zablokování mitochondriální i glykolytické syntézy ATP. Jedním z těchto induktorů apoptózy byly antiCD95 protilátky (α CD95), které aktivací korespondujících receptorů nacházejících se na povrchu buňky, indukují apoptózu. Druhým induktorem byl staurosporin (STS), inhibitor proteinkináz prostřednictvím zabránění vazby ATP na kinázy, který ve vyšších

koncentracích v buňce též indukuje apoptózu. Důvodem pro zvolení těchto apoptických stimulů byl ten, že nejsou nijak ovlivněny nefunkčností dýchacího řetězce. Buňky byly před experimentem vloženy do média bez glukózy a s přidavkem pyruvátu, čímž je buňkám umožněna pouze mitochondriální syntéza ATP. Buňky byly po adaptaci na médium vystaveny působení oligomycinu a byla u nich indukována apoptóza. Oligomycin inhibuje mitochondriální F_0F_1 -ATPázu a inhibuje produkci ATP jak z glykolýzy, tak z oxidativní fosforylace. U kultivovaných buněk jsou pod invertovaným mikroskopem po obarvení směsí barviv, která se skládá z barviva propustného membránou a barviva nepropustného membránou, pozorovatelné morfologie apoptických a nekrotických buněk, jejich poškození plazmatické membrány a stav jádra. Během prvních 90 minut působení apoptických induktorů jsou hladiny intracelulárního ATP stálé a začínají se snižovat až po objevení prvních apoptických buněk. Při koncentraci ATP pohybující se mezi 30-50 % z původní hodnoty, se po stimulaci apoptickými induktory občasné objevují částečně kondenzovaná jádra v prasklých buňkách, a mírné zpoždění v kinetice nekrózy. Buňky po přidání samotného oligomycinu vykazují rychlý pokles koncentrace intracelulárního ATP, a to během 10 minut o 60 %, během 20 minut o 75 % a během 30 minut o více než 90 % z původní hodnoty ATP (obr. 10 A). Buňky, které jsou nejprve ovlivněny oligomycinem a teprve poté jsou vystaveny STS nebo α CD95, mají jádra normální velikosti bez apoptické kondenzace chromatinu a nedocházelo u nich ani k fragmentaci jaderné DNA. V takto ovlivněných buňkách, neprobíhá ani expozice fosfatidylserinů na povrchu plazmatické membrány, což je proces, který by měl za následek rozpoznání buňky jako apoptické. Tyto úkazy naznačují, že pokud buňka nemá dostatečnou hladinu ATP na provedení procesů charakteristických pro apoptózu, je nucena podstoupit nekrotický způsob smrti (Eguchi, et al. 1997; Leist, et al. 1997). Apoptické buňky, u kterých nedošlo k fagocytóze, procházejí sekundárními degenerativními změnami, které jsou důsledkem ztráty integrity plazmatické membrány. Takové změny jsou označovány jako sekundární nekróza, nebo novějším termínem, post-apoptóza (Lieberthal, et al. 1998).

Při studii (Leist, et al. 1997), která vedla ke zjištění, jaká je dostatečná hladina ATP pro umožnění apoptického procesu, byla do média při různých

koncentracích ATP buněk ovlivněných oligomycinem, doplňována glukóza (obr. 10 B) a buňky byly poté inkubovány s induktory apoptózy. U buněk ovlivněných STS je vyčerpání intracelulárního ATP nad 50 % původní hladiny dostatečné ke změně způsobu smrti z apoptické na nekrotickou. Při působení α CD95 je deplece více jak 70 % původní hladiny vždy následována nekrotickou smrtí buňky. Přidáváním glukózy či fruktózy lze zamezit ztrátě ATP a tím je možno změnit způsob smrti z nekrózy zpět na apoptózu. Působením podobných substrátů jako je například glycerol, dihydroxyaceton či použitím nižší koncentrace fruktózy, není možné dosáhnout vyrovnání ztrát ATP ani změny způsobu buněčné smrti. Intracelulární ATP generovaný pouze glykolýzou je dostatečný pro umožnění smrti buňky apoptózou. Mitochondriální syntézu ATP je možné obnovit i pokud se v buňce nenachází glukóza a nemůže probíhat glykolýza, a to za pomoci pyruvátu. Buňka je tak schopná přirozeně obnovit hladiny ATP a doplnit i extramitochondriální pool (pohotovostní zásoba ATP) (Eguchi, et al. 1997).



Obr. 10: **A**) Tvar buněčné smrti při vyčerpání ATP v závislosti na čase. Buňky byly v médiu byly inkubovány rozpouštědlem (kontrola; ■), s 1,2 μ M STS (\blacktriangle) nebo se 100 ng/ml α CD95 (\bullet). V grafu je znázorněna i předúprava 2,5 μ M oligomycinem (\square). Koncentrace intracelulárního ATP byly měřeny v uvedených dobách a vyjádřeny jako procenta neošetřených kontrol. Data jsou průměry minimálně čtyř stanovení \pm směrodatná odchylka. **B**) Změny ve způsobu buněčné smrti po upnutí koncentrace ATP na definovaných hladinách nebo v různých časech. (a) Hladiny ATP buněk v médiu bez glukózy obsahující pyruvát, byly stanoveny v uvedených časech po vystavení oligomycinu a po přidání uvedených koncentrací glukózy. (b & c) Buňky byly předinkubovány v médiu s oligomycinem a s indikovanou koncentrací glukózy. Poté se na buňky působilo STS (b) a α CD95 (c) a způsob buněčné smrti byl vyhodnocen po 3 a půl hodinách (Leist et al. 1997).

Hladina ATP v buňce se snižuje, pokud dojde k poškození mitochondrie a tím i k inhibici mitochondriálního dýchacího řetězce vedoucího k syntéze ATP, nebo poklesem mitochondriálního membránového potenciálu, který je hnací silou syntézy ATP. Syntéza ATP probíhající v mitochondriích je závislá na transportu ADP přes vnitřní membránu z cytosolu do mitochondrie. Tento transport je uskutečněn prostřednictvím ATP/ADP translokázy známé také pod názvem adenin nukleotid translokátor (ANT). ANT reguluje výměnu ATP a ADP (1:1) za předpokladu, že dochází k přechodu mezi jeho konformačními stavy c (cytosol) a m (matrix). Kromě výměny ATP/ADP reguluje ANT svými konformačními stavy také uvolňování cytochromu c do cytosolu buňky. Zabráněním přechodu ANT do konformačního stavu c dochází k útlumu transportu ADP, který je pro syntézu ATP nezbytný, a tím dochází i ke snížení hladin ATP v buňce a následně k nekrotické buněčné smrti (Temkin, et al. 2006). Inhibice mitochondriálního dýchacího řetězce může být kromě poškození mitochondrie způsobena například i endogenním mediátorem oxidem dusnatým, který inhibuje komplex I v dýchacím řetězci a tím způsobuje snížení hladiny ATP a mění způsob smrti z apoptického na nekrotický (Leist, et al. 1999). Ke snížení hladin ATP může dojít také nadměrnou aktivací proteinu poly (ADP-ribóza) polymerázy (PARP). Ten je aktivován v buňkách vystavených stresu nebo pokud dojde k poškození DNA. Ve snaze poškozenou DNA opravit PARP vyčerpává buněčné zásoby ATP až do kritických hladin, při kterých již buňka podlehně nekrotické smrti (Snyder, et al. 1999).

Jakým způsobem smrti buňka projde, závisí na její aktuální hladině intracelulárního ATP. Při nedostatku ATP je buňka nucena přerušit či dočasně pozastavit proces apoptózy. Pokud jsou ale zdroje ATP nebo zásoby glukózy postupně obnoveny, hladiny ATP se opět zvýší a buňka je schopna aktivovat kaspázovou aktivitu a navrátit se k procesu apoptické smrti. Hladiny ATP

se navrácí do původních hodnot při suplementaci buňky roztokem glukózy. Buňky za takových podmínek přežívají dobře, jelikož je ATP znovu produkováno glykolýzou nebo oxidativní fosforylací. Například při poškození buňky hypoxií (nedostatek kyslíku v tkáních) se při takovéto suplementaci glukózou dokážou hladiny ATP udržovat na hodnotách, které by vykazovala buňka při normoxii (standardní hodnota kyslíku v tkáních). Při apoptickém procesu jsou dostatečné hladiny ATP zapotřebí ještě před charakteristickými změnami v jádře, a to proto, aby se kolaps jádra, degradace jaderného DNA a kondenzace chromatinu uskutečnili ještě před buněčnou lyzí. Klíčovým procesem pro jaderný kolaps je degradace jaderných lamin, síťovité vrstvy proteinů tvořené intermediárními filamenti, která je uskutečněna aktivací příslušných kaspáz. Při vyčerpání ATP vedoucí k nekróze buňky, je aktivita proteolytického systému zodpovědného za štěpení jaderných lamin výrazně snížena. Apoptické změny jádra způsobené Fas (Apo-1/CD95), což je transmembránový protein ze skupiny TNF cytokinů, jsou při snížení intracelulárních hladin ATP také zcela zablokovány. Z toho vyplývá, že apoptické změny jader jsou závislé na ATP. Deplece ATP však nemění expresi Fas-antigenu nacházejícího se na buněčném povrchu (Eguchi, et al. 1999). Nezávislá na hladině ATP je také aktivace většiny kaspáz u B lymfocytů včetně kaspázy 8 a 9, které se štěpí bez ohledu na intracelulární hladinu ATP. Kroky, které jsou závislé na ATP se vyskytují pouze po směru aktivace kaspázy 3. Jsou to takové kroky vyžadující hydrolýzu ATP pro uskutečnění aktivního mechanismu jaderného přenosu, kterým jsou transportovány apoptické signály z cytoplazmy buňky do jádra. U T lymfocytů jsou na ATP hladině závislé kroky, vyskytující se ještě před aktivací kaspázy 9 a kaspázy 8 a tudíž při ATP depleci bylo jejich štěpení inhibováno, společně s inhibicí štěpení prokaspázy 3, která je za normálních podmínek aktivována kaspázami 9 a 8 na efektorovou kaspázu 3 (Tsujimoto, 1997; Nicoitera, et al. 1998). Snížení hladiny ATP způsobí narušení funkcí sodno-draselných a vápenatých pump závislých na přísunu ATP, jejichž funkcí je udržování osmotické rovnováhy a objemu buněk. Buňky tak nedokážou regulovat přítok či odtok elektrolytů a vody a dochází ke zvýšenému intracelulárnímu přílivu sodných a vápenatých iontů, což vede k osmotickému otoku buňky. Zvýšení hladiny intracelulárních iontů vápníku má za následek aktivaci cytosolových enzymů jako jsou proteázy, fosfolipázy, endonukleázy, ATPázy a další enzymy,

kteře zvyšují mitochondriální permeabilitu a dochází tak k uvolňování cytochromu c do cytoplazmy. Jedním z takových spouštěčů může být například proapoptický protein Bax, který je translokován z cytosolu do mitochondrií. Na vnitřní straně mitochondrií pak může tvořit mitochondriální póry přechodné propustnosti neboli selektivní kanály pro uvolňování cytochromu c, který má za následek inhibici syntézy ATP a rozpojení mitochondriálního dýchacího řetězce, ve kterém mají funkci elektronového přenašeče. (Tatsumi, et al. 2003). Nadměrné množství intracelulárního vápenatého iontu také napomáhá dráze cytotoxických jevů vedoucích kromě buněčné smrti také ke zvýšení produkce ROS. Vyšší než fyziologické koncentrace vápenatých iontů a ROS v buňkách jsou spojovány s apoptózou a za určitých podmínek spolu přímo souvisí. Zvýšená produkce ROS, způsobená zvýšenou hladinou vápenatých iontů, zároveň napomáhá jejich specifickému uvolňování z mitochondrií.

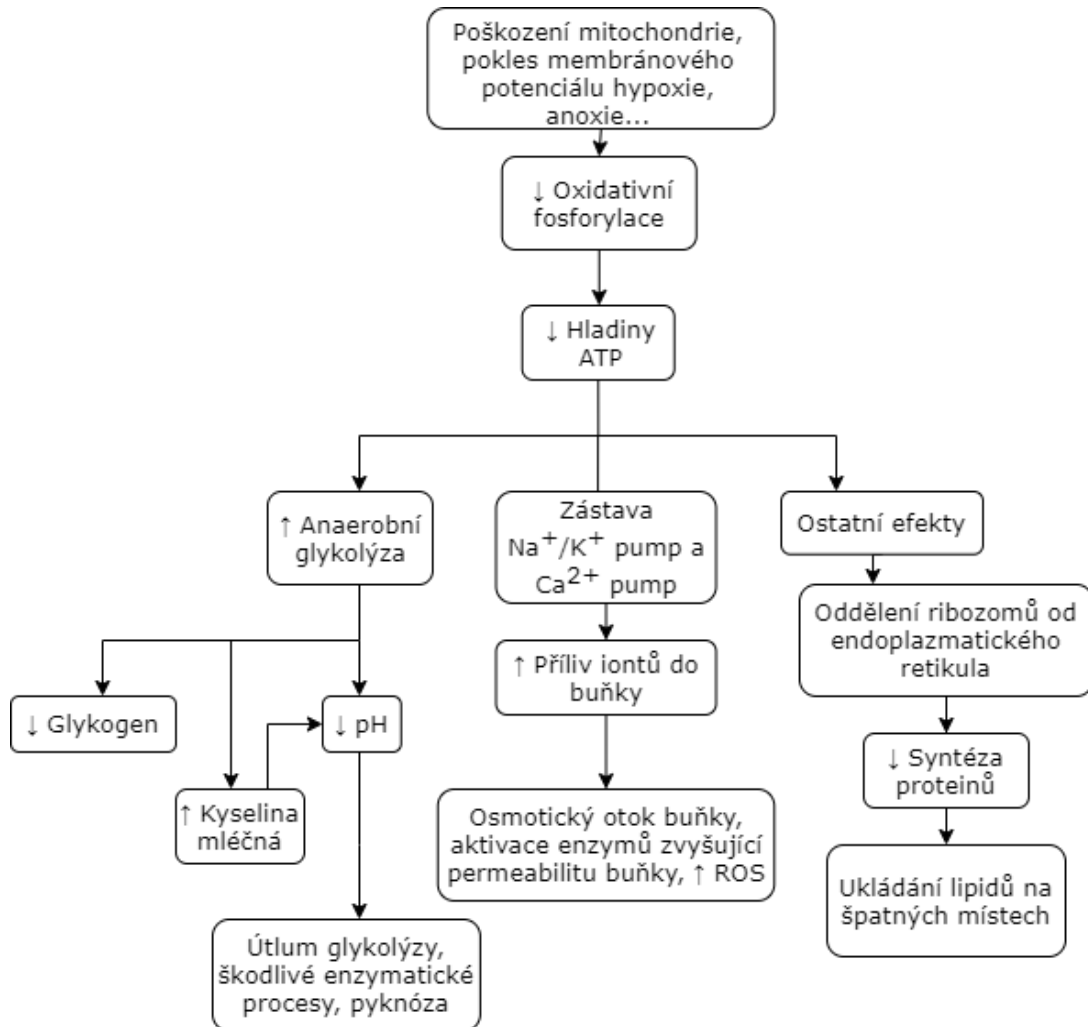
V oblastech, kde je omezený průtok krve, dochází k vyčerpání intracelulárního ATP, a to kvůli nedostatečnému množství kyslíku a rychlému spotřebování glukózy. K vyčerpání ATP dochází rychle jelikož v tkáních je ho uloženo jen malé množství (cca 5 mmol/l). V anoxickém či těžce hypoxickém prostředí klesají hladiny citrátu, který při normálním zásobení buňky kyslíkem reguluje rychlost glykolýzy, buňky zastaví oxidační metabolismus a nahrazují ho anaerobní glykolýzou. Energie potřebná pro provedení glykolýzy se získává nízkenergetickým štěpením glykogenu, který je uložený převážně v játrech a pak ve svalech. Anaerobní glykolýza probíhá sice rychleji, ale produkuje pouze dvě molekuly ATP na jedinou molekulu glukózy, což je 19 krát méně, než je celý energetický potenciál molekuly glukózy (36-38 molekul ATP v závislosti na způsobu vstupu NADH do mitochondrie). Procesem anaerobní glykolýzy se také snižuje pH v tkáni, kvůli akumulaci kyseliny mléčné vzniklé přeměnou pyruvátu na laktát v posledním kroku cyklu. Zvýšená acidita má za následek útlum glykolytické aktivity a zprostředkovává uvolňování enzymů škodlivých pro buňku. Mezi ně patří například proteolýzy, lipázy a další enzymy, které napadají buněčné substráty jako proteiny, glykoproteiny, glykolipidy a také natravují funkční a strukturální složky buněk. Dalším důsledkem deplece ATP je předčasné zahuštění jaderného chromatinu známé také pod názvem pyknóza, po kterém následuje rozpad buněčného jádra (karyorhýza) vedoucí k buněčné

smrti (Chien, 2000-2013). Rychlost, jakou buňka umírá, je přímo úměrná závažnosti úbytku koncentrace ATP v buňce a je nezávislá na způsobu buněčné smrti. Pokud je buňka vystavena příliš nízké koncentraci ATP nebo je ATP zcela vyčerpáno, dochází k inhibici apoptózy a indukci nekrotické buněčné smrti. Prahová koncentrace určující, jakým způsobem smrti buňky odumírají je 15-25% z koncentrace ATP viabilní buňky. Koncentrace nižší, než je 15% z původní hladiny, značí těžkou depleci ATP způsobující rychlý metabolický kolaps a rovnoměrné odumírání buněk nekrózou. Nekrotická buněčná smrt je snadno identifikovatelná a to proto, že bobtnající buňky, které následkem poškození celistvosti membrány praskají a vylévají svůj zánětlivý obsah do extracelulárního prostředí, jsou snadno morfologicky rozpoznatelné. Identifikace apoptických buněk je na rozdíl od těch nekrotických složitá a je zapříčiněna dvěma faktory. Prvním faktorem je skutečnost, že jsou apoptické buňky velmi rychle vychytávány a odstraňovány fagocytujícími buňkami a druhým faktorem je, že apoptické buňky, na rozdíl od těch nekrotických udržují svou membránu co nejdéle neporušenou díky čemuž je buňka zneškodněna ještě před uvolněním svého intracelulárního obsahu. V buňkách se sníženou koncentrací intracelulárního ATP pod 15% původní hladiny, je elektroforézou DNA prokázána degradace DNA na malé, nerovnoměrně veliké fragmenty. Na agarózovém gelu je v takovém případě zobrazen rozmazaný vzor, který je typický pro nekrózu. Naproti tomu u buněk podléhajících apoptóze s hladinami nad 25 % původní koncentrace ATP, byla elektroforézou DNA na agarózovém gelu DNA ladder (žebřík) testu zobrazen žebříkový vzor s 180-200 bp (páry bazí), který je důsledkem internukleozomálního štěpení DNA. Počet mrtvých buněk je téměř úměrný stupni fragmentace DNA. Určování mechanismu buněčné smrti podle fragmentace DNA však není naprosto spolehlivé. Proto je lepší sledovat vzhled buněk při úbytku intracelulárního ATP například světelným mikroskopem při fázovém kontrastu, kterým lze sledovat morfologii buněk. Buňky, u kterých je koncentrace ATP snížena pod 15 % z původní hodnoty se v mikroskopu projevují zvětšeně, otekle a pozitivně na trypanovou modř. Všechny tyto znaky jsou pro nekrózu typické. Při depleci nižší než 25 % z celkové původní hodnoty ATP se ve fázovém kontrastu světelného mikroskopu buňky projevují smrštěním buňky, jejím zaoblením a negativní odezvou na účinek trypanové modři, a to kvůli celistvosti buněčné membrány. Tyto vlastnosti jsou zase typické pro apoptózu.

Další možností, jak spolehlivě pozorovat buňky se sníženou či zvýšenou koncentrací ATP, je epifluorescenční mikroskopie zobrazující jadernou morfologii. V této metodě jsou pozorovány buňky obarvené směsí bisbenzimidu (Hoechst 33342) a propidium jodidu (PI). Bisbenzimid je organická sloučenina používaná jako fluorescenční barvivo pro DNA, ve které se váže především na oblasti bohaté na adenin a thymin. Propidium jodid je červené kontrastní barvivo fluorescenčně barvící jádra a chromozomy a neprostupuje přes membrány živých buněk. Proto se také využívá pro detekci mrtvých buněk v populaci. Buňky s těžkou deplecí ATP se pod fluorescenčním mikroskopem vyznačují pozitivním jaderným PI barvením a morfologicky normálním jaderným vzorcem obarveným bisbenzimidem. Chromatin v jádrech buněk, které jsou ovlivněny mírnější deplecí ATP (nad 25 % původní hodnoty) má po obarvení bisbenzimidem viditelné různorodé morfologie. Tyto abnormální morfologie jader jsou způsobeny kondenzací chromatinu typického pro apoptózu. Jádra buněk s mírnější deplecí ATP jsou také negativní pro PI což naznačuje, že je možný jejich návrat k životaschopnosti (Lieberthal, et al. 1998).

Pokud jsou energetické hladiny v buňce nízké, je aktivován jeden z regulátorů buněčného metabolismu nazývaný AMP-aktivovaná protein kináza (AMPK). Enzym AMPK působí jako energetický senzor v buňce a k její aktivaci dochází již při mírném snížení produkce ATP. Je také citlivá na poměr AMP/ATP, který narůstá během různých forem buněčného stresu. Funkcí AMPK je fosforylace metabolických enzymů, koaktivátorů a transkripčních faktorů, které napomáhají produkci ATP katabolickými drahami, kam patří například absorpce a metabolismus glukózy a mastných kyselin, a inhibice anabolických drah, které ATP spotřebovávají. Mezi procesy inhibované AMPK patří biosyntéza proteinů, mastných kyselin, cholesterolu, glykogenu a inhibuje také proliferaci buněk. Syntéza proteinů je zablokována prostřednictvím inaktivace proteinového komplexu mTORC1, jehož funkcí je translace proteinů. K útlumu syntézy proteinů může dojít i jiným mechanismem a to tak, že vlivem deplece ATP přestávají fungovat iontové pumpy a dochází k osmotickému otoku buňky včetně otoku hrubého endoplazmatického retikula, kde se na vnější straně za pomoci ribozomů syntetizují proteiny. Při nabobtnání endoplazmatického retikula se však ribozomy odpojí a k syntéze proteinů nedochází. Následkem toho poté mimo jiné

dochází i k ukládání a hromadění lipidů na nesprávných místech, jelikož nejsou dostupné transportní proteiny, které by přepravovaly lipidy krví na určená místa (Hardie, 2007; Mihaylova, et al. 2011).



Obr. 11: Funkční a morfologické důsledky snížené hladiny intracelulárního ATP během buněčného poškození.

6. Závěr

Mitochondrie jsou semiautonomní organely eukaryotických buněk a jejich počet se v závislosti na typu buněk pohybuje od desítek až po statisíce v jediné buňce. Mitochondrie mají dvě membrány a mezi nimi se nachází mezimembránový prostor. Vnější membrána slouží jako ochranná vrstva mitochondrie a zároveň je díky porinům (VDAC) permeabilní. Vnitřní membrána obklopuje mitochondriální matrix a její plocha je větší než u vnější membrány, jelikož formuje zvlněné kristy. Na kristách jsou umístěny ATP syntázy a enzymy dýchacího řetězce, které udržují na membráně protonový gradient, zásluhou čehož je možná syntéza vysokoenergetických molekul ATP, které svým štěpením poskytují energii veškerým energeticky závislým procesům v buňkách.

Buněčná smrt nastává, pokud je buňka poškozena, napadena mikroorganismy, pokud je nedostatečně zásobena živinami nebo v důsledku působení škodlivých vlivů, jako je například teplo, toxiny, genetické defekty a další. V závislosti na způsobu buněčné smrti rozlišujeme dva základní typy, apoptózu a nekrózu. Apoptóza je programovaný způsob buněčné smrti a to proto, že zahrnuje energeticky závislé procesy. Mezi morfologické změny buněk procházejících apoptózou patří mimo jiné smrštění buňky, fragmentace a kondenzace jádra a odškrcování apoptických tělísek, která jsou následně pohlcována fagocyty, díky čemuž nedochází k porušení celistvosti membrány a vylití zánětlivého obsahu mimo buňku. Nekróza je naopak pasivním procesem, pro který je charakteristická onkóza buňky včetně jádra, tvorba cytoplazmatických vakuol, a především porušení celistvosti buněčné membrány a tím i vylití zánětlivého obsahu do okolní tkáně.

Adenosintrifosfát neboli ATP, je nezbytný pro většinu buněčných procesů a pro buněčnou signalizaci. Skládá se z adeninové báze, ribózy a tří fosfátů. Procesem hydrolýzy se za odštěpení jedné fosfátové skupiny z molekuly ATP uvolňuje energie. Nedostatečná hladina ATP v buňce způsobí, že je buňka nucena ukončit řadu energeticky závislých procesů potřebných k udržení buněčné viability. Dlouhodobá deplece intracelulárního ATP nakonec vede k buněčné smrti apoptózou nebo nekrózou podle jeho aktuální koncentrace v buňce.

7. Seznam použité literatury

- [1] Adenosine-5'-triphosphate, National Center for Biotechnology Information, PubChem Database, PubChem release 18.6.2019, CID=5957. Dostupné z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Adenosine-5_-triphosphate.
- [2] Adigun R, Basit H, Murray J. (2019). *Necrosis, Cell (Liquefactive, Coagulative, Caseous, Fat, Fibrinoid, and Gangrenous)*. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430935>.
- [3] Ahting U., Thun C., Hegerl R., et al. (1999). *The Tom Core Complex: The General Protein Import Pore of the Outer Membrane of Mitochondria*, J Cell Biol, 147 (5): 959–968. doi: 10.1083/jcb.147.5.959.
- [4] Alberts B., Johnson A., Lewis J., et al. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science. The Mitochondrion. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26894>.
- [5] Amaral A., Lourenço B., Marques M., and Ramalho-Santos, J. (2013). *Mitochondria functionality and sperm quality*. Reproduction 146, 5, r163-r174.
- [6] Ando T., Imamura H., Suzuki R., Aizaki H., et al. (2012). *Visualization and measurement of ATP levels in living cells replicating hepatitis C virus genome RNA*. PLoS pathogens, 8(3), e1002561. doi: 10.1371/journal.ppat.1002561.
- [7] Bonora M., Patergnani S., Rimessi A., et al. (2012). *ATP synthesis and storage*. Purinergic signalling, 8(3), 343–357. doi:10.1007/s11302-012-9305-8.
- [8] Boyer P. D. (2002) *A Research Journey with ATP Synthase*, The Journal of Biological Chemistry, 277, 39045-39061.
- [9] Brand M. D. (2014). *The role of mitochondria in longevity and healthspan*. Longev Healthspan 3, doi: 10.1186/2046-2395-3-7.
- [10] Bröker L. E., Kruyt F. A. E., Giaccone G. (2005). *Cell Death Independent of Caspases: A Review*. Clin Cancer Res, (11) (9) 3155-3162; doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-2223.

- [11] Casem M. L. (2016). *Chapter 11 - Cell Metabolism*. In *Problem Sets in Biological and Biomedical Sciences, Case Studies in Cell Biology*, Academic Press, 263-281, ISBN 9780128013946, doi: 10.1016/B978-0-12-801394-6.00011-7.
- [12] Cogliati S., Enriquez J. A., Scorrano L. (2016). *Mitochondrial Cristae: Where Beauty Meets Functionality*, *Trends in Biochemical Sciences*, Volume 41, Issue 3, Pages 261-273, ISSN 0968-0004. doi: 10.1016/j.tibs.2016.01.001.
- [13] Dewson G., Kluck R. M. (2009). *Mechanisms by which Bak and Bax permeabilise mitochondria during apoptosis*, *Journal of Cell Science*, 122: 2801-2808; doi: 10.1242/jcs.038166.
- [14] Donzeau M., Káldi K., Adam A., et al. (2000). *Tim23 Links the Inner and Outer Mitochondrial Membranes*, *Cell*, Volume 101, Issue 4, Pages 401-412, ISSN 0092-8674. doi:10.1016/S0092-8674(00)80850-8.
- [15] Ducker G. S., Rabinowitz J. D. (2017). *One-Carbon Metabolism in Health and Disease*, *Cell Metabolism*, Volume 25, Issue 1, Pages 27-42, ISSN 1550-4131, doi: 10.1016/j.cmet.2016.08.009.
- [16] Eguchi Y., Srinivasan A., Tamaselli K. J., et al. (1999). *ATP-dependent Steps in Apoptotic Signal Transduction*, *Cancer Res* May 1 1999 (59) (9) 2174-2181.
- [17] Eguchi Y., Shimizu S., Tsujimoto Y. (1997). *Intracellular ATP Levels Determine Cell Death Fate by Apoptosis or Necrosis*, *Cancer Res*, Volume 57, Issue 10, 1835-1840; ISSN 1538-7445.
- [18] Elmore, S. (2007). *Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death*, *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495-516, doi: 10.1080/01926230701320337.
- [19] Enriquez J. A. (2016). *Supramolecular Organization of Respiratory Complexes*. *Annual Review of Physiology*. Vol. 78, 533-561, doi: 10.1146/annurev-physiol-021115-105031.
- [20] Frey T. G., Mannella C. A. (2000). *The internal structure of mitochondria*, *Trends in Biochemical Sciences*, Volume 25, Issue 7, Pages 319-324, ISSN 0968-0004, doi: 10.1016/S0968-0004(00)01609-1.
- [21] Fulda S., Gorman A. M., Hori O., et al. (2009). *Cellular Stress Responses: Cell Survival and Cell Death*, Volume 2010, Article ID 214074, 23 pages, doi: 10.1155/2010/214074.

- [22] Fursule R. A., Kulkarni J. S., and Agarkar P. H. (2009). *Biochemistry: basic and applied*. Pune: Nirali Prakashan, Publication, Fourth edition, 2,6-2,7.
- [23] Galluzzi L., Vitale I., Aaronson S. A., et al. (2018). *Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death*. *Cell death and differentiation*, 25(3), 486–541, doi: 10.1038/s41418-017-0012-4.
- [24] Giacomello M., Pyakurel A., Glytsou C., et al. (2020). *The cell biology of mitochondrial membrane dynamics*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, doi: 10.1038/s41580-020-0210-7.
- [25] Hardie, D. (2007). *AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy*. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 774–785, doi: 10.1038/nrm2249.
- [26] Chial H. & Craig J. (2008). *mtDNA and mitochondrial diseases*. *Nature Education*, 1(1):217.
- [27] Chien S. (2000-2013). *Metabolic Management*. In: Madame Curie Bioscience Database [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience;. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6156>.
- [28] Imamura H., Huynh Nhat K. P., Togawa H., Saito K., et al. (2009). *Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106 (37) 15651-15656; doi: 10.1073/pnas.0904764106.
- [29] Jacob W. A., Bakker A., Hertsens R. C. and Biermans W. (1994). *Mitochondrial matrix granules: Their behavior during changing metabolic situations and their relationship to contact sites between inner and outer mitochondrial membranes*. *Microsc. Res. Tech.*, 27: 307-318. doi:10.1002/jemt.1070270406.
- [30] Jonckheere A. I., Smeitink J. A., Rodenburg R. J. (2012). *Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology*. *Journal of inherited metabolic disease*, 35(2), 211–225. <https://doi.org/10.1007/s10545-011-9382-9>.
- [31] Khakh B. S., Burnstock G., (2009). *The double life of ATP*. *Scientific American*, 301(6), 84–92. doi:10.1038/scientificamerican1209-84.

- [32] Kirimura K., Kobayashi K., Yoshioka I. (2019). *Decrease of citric acid produced by Aspergillus niger through disruption of the gene encoding a putative mitochondrial citrate-oxoglutarate shuttle protein*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 83:8, pages 1538-1546.
- [33] Kodíček M., Valentová O., Hynek R. (2018). *Biochemie - chemický pohled na biologický svět*, str. 223-315, Publikace, Vydavatelství VŠCHT Praha, ISBN: 978-80-7592-013-3.
- [34] Kresge N., Simony R. D., Hill R. L. (2006). *ATP Synthesis and the Binding Change Mechanism: the Work of Paul D. Boyer*, *The Journal of Biological Chemistry*, 281, e18.
- [35] Lane M., Gardner D. K. (2005). *Mitochondrial Malate-Aspartate Shuttle Regulates Mouse Embryo Nutrient Consumption*. *The Journal of Biological Chemistry*, 280, 18361-18367, doi: 10.1074/jbc.M500174200.
- [36] Leist M., Single B., Castoldi A. F., Kühnle S., Nicotera P. (1997). *Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis*. *The Journal of experimental medicine*, 185(8), 1481–1486. <https://doi.org/10.1084/jem.185.8.1481>.
- [37] Leist M., Single B., Naumann H., et al. (1999). *Inhibition of Mitochondrial ATP Generation by Nitric Oxide Switches Apoptosis to Necrosis*, *Experimental Cell Research*, Volume 249, Issue 2, Pages 396-403, ISSN 0014-4827, doi: 10.1006/excr.1999.4514.
- [38] Li X.-b., Gu J.-d. and Zhou Q.-h. (2015), *Aerobic glycolysis in lung cancer*. *Thoracic Cancer*, 6: 17-24. doi:10.1111/1759-7714.12148.
- [39] Lieberthal W., Menza S. A., Levine J. S. (1998). *Graded ATP depletion can cause necrosis or apoptosis of cultured mouse proximal tubular cells*. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 274:2, 315-327, doi: 10.1152/ajprenal.1998.274.2.F315.
- [40] Maruyama K., (1991). *The Discovery of Adenosine Triphosphate and the Establishment of Its Structure*. *Journal of the History of Biology*, 24(1), 145-154. Retrieved January 9, 2020, from www.jstor.org/stable/4331161.
- [41] Mihaylova M. M., Shaw R. J. (2011). *The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism*. *Nature cell biology*, 13(9), 1016–1023. doi: 10.1038/ncb2329.

- [42] Mitchell P. (1966). *Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation*. *Biological Reviews*, 41: 445-501. doi:10.1111/j.1469-185X.1966.tb01501.x.
- [43] Neagos D., Cretu R., Tutulan-Cunita A. et al. (2010). *Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (MTHFD) enzyme polymorphism as a maternal risk factor for trisomy 21: a clinical study*. *Journal of medicine and life*, 3(4), 454–457.
- [44] Needham D. M. (1942). *The adenosinetriphosphatase activity of myosin preparations*. *The Biochemical journal*, 36(1-2), 113–120. doi:10.1042/bj0360113.
- [45] Neupane P., Bhujju S., Thapa N., & Bhattarai H. (2019). *ATP Synthase: Structure, Function and Inhibition*, *Biomolecular Concepts*, 10(1), 1-10. doi: <https://doi.org/10.1515/bmc-2019-0001>.
- [46] Ng S., Lim H. S., Ma Q., Gao Z. (2016). *Optical Aptasensors for Adenosine Triphosphate*. *Theranostics*, 6(10), 1683–1702. doi:10.7150/thno.15850.
- [47] Nicotera P., Leist M., Ferrando-May E. (1998). *Intracellular ATP, a switch in the decision between apoptosis and necrosis*, *Toxicology Letters*, Volumes 102–103, Pages 139-142, ISSN 0378-4274, doi: 10.1016/S0378-4274(98)00298-7.
- [48] Nunnari J., Suomalainen A. (2012). *Mitochondria: in sickness and in health*. *Cell* vol. 148,6: 1145-59. doi: 10.1016/j.cell.2012.02.035.
- [49] Rajendran M., Dane E., Conley J., & Tantama M. (2016). *Imaging Adenosine Triphosphate (ATP)*. *The Biological bulletin*, 231(1), 73–84. doi:10.1086/689592.
- [50] Rampelt H., Zerbes R. M., Martin van der Laan, Pfanner N. (2017). *Role of the mitochondrial contact site and cristae organizing system in membrane architecture and dynamics*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, Volume 1864, Issue 4, Pages 737-746, ISSN 0167-4889, doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.05.020.
- [51] Richter Ch., Schweizer M., Cossarizza A., Franceschi C.(1996). *Control of apoptosis by the cellular ATP level*, *FEBS Letters*, 378, doi: 10.1016/0014-5793(95)01431-4.

- [52] Samali A., Fulda S., Gorman A. M., et al. (2010). *Cell Stress and Cell Death*, Volume 2010, Article ID 245803, 2 pages, doi: 10.1155/2010/245803.
- [53] Saraste A., Pulkki K., (2000). *Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis*, Cardiovascular Research, Volume 45, Issue 3, Pages 528–537, doi: 10.1016/S0008-6363(99)00384-3.
- [54] Sartorius U., Schmitz I., Krammer, P. H. (2001), *Molecular Mechanisms of Death-Receptor-Mediated Apoptosis*. ChemBioChem, 2: 20-29. doi:10.1002/1439-7633(20010105)2:1<20::AID-CBIC20>3.0.CO;2-X.
- [55] Sevrioukova I. F. (2011). *Apoptosis-inducing factor: structure, function, and redox regulation*. Antioxidants & redox signaling, 14(12), 2545–2579. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3445>.
- [56] Shi Y., Wang H., Yan Y., et al. (2018). *Glycerol-3-Phosphate Shuttle Is Involved in Development and Virulence in the Rice Blast Fungus Pyricularia oryzae*. Frontiers in plant science, 9, 687, doi: 10.3389/fpls.2018.00687.
- [57] Singh, R., Letai, A., Sarosiek, K. (2019). *Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of Bcl-2 family proteins*, Nat Rev Mol Cell Biol 20, 175–193, doi: 10.1038/s41580-018-0089-8.
- [58] Snyder S. H., Hyo Chol Ha. (1999). *Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion*, Proceedings of the National Academy of Sciences, 96 (24) 13978-13982; doi: 10.1073/pnas.96.24.13978.
- [59] Spinelli J. B., Haigis M. C. (2018). *The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism*. Nat Cell Biol 20, 745–754. doi: 10.1038/s41556-018-0124-1.
- [60] Tatsumi T., Shiraishi J., Keira N., et al. (2003). *Intracellular ATP is required for mitochondrial apoptotic pathways in isolated hypoxic rat cardiac myocytes*, Cardiovascular Research, Volume 59, Issue 2, Pages 428–440, doi: 10.1016/S0008-6363(03)00391-2.
- [61] Temkin V., Huang Q., Liu H., et al. (2006). *Inhibition of ADP/ATP Exchange in Receptor-Interacting Protein-Mediated Necrosis*. Molecular and Cellular Biology, 26 (6) 2215-2225; doi: 10.1128/MCB.26.6.2215-2225.2006.

- [62] Todd A. R. (1954). *Chemical structure of the nucleic acids*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 40(8), 748–755. doi:10.1073/pnas.40.8.748.
- [63] Tsujimoto Y. (1997). *Apoptosis and necrosis: Intracellular ATP level as a determinant for cell death modes*. Cell Death and Differentiation, 429-434.
- [64] Vedel F., Lalanne É., Sabar M., et al. (1999). *The mitochondrial respiratory chain and ATP synthase complexes: Composition, structure and mutational studies*, Plant Physiology and Biochemistry, Volume 37, Issue 9, Pages 629-643, ISSN 0981-9428, doi: 10.1016/S0981-9428(00)80093-5.
- [65] Zhang Q., Kang R., Zeh H. J., et al. (2013). *DAMPs and autophagy*, Autophagy, 9:4, 451-458, doi: 10.4161/auto.23691.
- [66] Žurmanová J. (2014). *Kreatinkinázový systém v kosterním svalu*. Živa avrc, nakladatelství Academia, SSČ AV ČR, v. v. i.