

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH VĚD

**ZMĚNY METABOLISMU BUNĚK PO PŮSOBENÍ MODELOVÝCH
TOXICKÝCH LÁTEK**
DIPLOMOVÁ PRÁCE

AUTOR PRÁCE: Bc. Barbora Tošovská

VEDOUCÍ PRÁCE: doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.

KONZULTANT: Mgr. Jan Čapek, Ph.D.

2022

UNIVERSITY OF PARDUBICE
FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL SCIENCES

**CHANGES IN CELLULAR METABOLISM AFTER TREATMENT
WITH TOXIC SUBSTANCES**

THESIS

AUTHOR: Bc. Barbora Tošovská

SUPERVISOR: doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.

CONSULTANT: Mgr. Jan Čapek, Ph.D.

2022

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Barbora Tošovská**
Osobní číslo: **C20588**
Studijní program: **N0914P360001 Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**
Téma práce: **Změny metabolismu buněk po působení modelových toxických látek**
Téma práce anglicky: **Changes In Cellular Metabolism After Treatment With Toxic Substances**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Zpracujte literární rešerši zaměřenou na popis energetického metabolismu buněk a vybraných metod pro detekci energetického metabolismu buňky. Jmenovitě se zaměřte na obecný popis mitochondrií a konkrétně se věnujte zevrubného popisu dýchacího řetězce (zejména syntézy ATP). Dále popište možný vztah změny exprese HSP proteinů a apoptózy. V poslední části literární rešerše se věnujte popisu vybraných metod pro detekci intracelulární koncentrace ATP (např. luminiscenční, fluorescenční metody atd.), detekci HSP proteinů (metoda *Simple Western*, *Western blotting*, aj.) a respirometrii s využitím přístroje Oroboros. Ke zpracování tohoto přehledu využijte elektronické databáze (*ScienceDirect*, *NCBI Pubmed*, *Web of Science*).
2. V rámci praktické části: 1) optimalizujte přípravu biologického materiálu a luminiscenční metodu pro detekci koncentrace ATP v buňkách, vč. komerční metody; 2) zavedené metody využijte k detekci intracelulární koncentrace ATP po působení modelových toxinů na buňkách, a tyto výsledky komparujte; 3) pro doplnění popisu změn energetického metabolismu u testovaných buněk po inkubaci s modelovými toxiny využijte některou z následujících metod (např. metoda WST, metoda MCB, *Simple western*, Oroboros aj.).
3. Získaná experimentální data statisticky zpracujte a diskutujte. Své výsledky následně porovnejte s výstupy jiných autorů.

Rozsah pracovní zprávy: **35 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí diplomové práce: **doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant diplomové práce: **Mgr. Jan Čapek, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Datum zadání diplomové práce: **18. prosince 2021**
Termín odevzdání diplomové práce: **6. května 2022**

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc. v.r.
děkan

L.S.

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

V Pardubicích dne 28. února 2022

Prohlašuji:

Práci s názvem Změny metabolismu buněk po působení modelových toxických látek 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 5.5.2022

Barbora Tošovská v.r.

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu diplomové práce doc. RNDr. Tomáši Roušarovi, Ph.D. za odborné vedení této práce. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Janu Čapkovi, Ph.D. a Mgr. Pavlíně Majtnerové, Ph.D. za vstřícnost, ochotu, trpělivost a cenné rady při konzultacích, které mi během vypracování práce věnovali. Za praktické rady vděčím také Mgr. Filipovi Petirovi.

V neposlední řadě bych také ráda poděkovala svým kolegyním a kamarádkám Štěpánce, Nikče a Ivče, rodině a partnerovi za podporu během celého studia. Díky Vám všem.

ANOTACE

Diplomová práce se zabývá změnami energetického metabolismu buňky po působení modelových toxických látek. Teoretická část se věnuje popisu mitochondrií, podrobnému popisu dýchacího řetězce, zejména syntéze ATP, a metodám detekce koncentrace ATP. Dále je zde popsán možný vztah proteinů teplotního šoku (= HSP) a apoptózy. V závěru jsou uvedeny metody pro detekci HSP proteinů.

Experimentální část se věnuje optimalizaci přípravy buněčného materiálu a luminiscenční metody pro detekci intracelulární koncentrace ATP po působení modelových toxických sloučenin na buněčných liniích SH-SY5Y a A549. Jako modelové jsme zvolili cisplatinu, CdCl_2 , acetaminofen a strausosporin. Pro popis změn energetického metabolismu u testovaných buněk jsme použili WST-1 test, fluorescenční sondu monochlorobiman, stanovení koncentrace ATP a metodu *Simple Western*. Morfologii buněk inkubovaných s toxickými látkami jsme pozorovali pod mikroskopem ve fázovém kontrastu, pro vizualizaci cytoskeletu jsme zvolili fluorescenčně značený faloidin a pro pozorování jader sondu Hoechst 33258. V závěru práce jsou výsledky diskutovány.

KLÍČOVÁ SLOVA

Adenosintrifosfát, cytotoxicita, buněčná linie SH-SY5Y, buněčná linie A549, proteiny teplotního šoku, *Simple Western*.

ANNOTATION

The diploma thesis deals with changes in the energy metabolism of the cell after treatment with toxic substances. First, the theoretical part of the thesis describes the mitochondria, a detailed description of the respiratory chain, especially the synthesis of ATP, and methods detecting ATP concentration. Then, a possible relationship between Heat Shock Proteins (HSP) and apoptosis is described. Finally, the methods used for detection of HSP proteins are described.

The experimental part is devoted to the optimization of cell material preparation and luminescence method for the detection of intracellular ATP concentration after treatment with model toxic compounds in SH SY5Y and A549 cell lines. We chose cisplatin, CdCl₂, acetaminophen and staurosporine as model compounds. To complete the description of changes of energy metabolism in tested cells, we used the WST-1 test, fluorescence probe monochlorobimane and the Simple Western method. We observed the morphology of cells incubated with toxic substances using phase contrast and fluorescence microscopy for cytoskeletal visualization and nuclear observation. At the end of the thesis, the results are discussed.

KEYWORDS

Adenosine Triphosphate, Cytotoxicity, SH-SY5Y cell line, A549 cell line, Heat Shock Proteins, Simple Western.

OBSAH

ÚVOD	15
1. MITOCHONDRIE	16
1.1 Struktura mitochondrií	17
1.2 Dýchací řetězec	19
1.2.1 Komplex I	20
1.2.2 Komplex II	21
1.2.3 Komplex III	22
1.2.4 Komplex IV	23
1.2.5 Komplex V	25
1.2.6 Superkomplexy dýchacího řetězce	26
1.3 Další úlohy mitochondrií v organismu.....	26
1.3.1 Apoptóza	26
1.3.2 Homeostáza vápníku	27
1.3.3 Syntéza hemu	27
1.3.4 Syntéza klastrů Fe-S	27
1.3.5 β -oxidace mastných kyselin.....	28
1.4 Adenosintrifosfát	28
1.4.1 Role ATP při apoptóze	29
1.5 Detekce koncentrace ATP	30
1.6 Respirometrie	34
1.6.1 Inhibitory dýchacího řetězce	36
1.7 Proteiny teplotního šoku.....	38
1.7.1 Rodina HSP70.....	39
1.7.2 Rodina HSP60.....	41
1.7.3 Rodina HSP27.....	42

1.7.4	Vazba HSP na apoptotický aktivační faktor-1	43
1.7.5	Detekce HSP proteinů	44
2.	CÍLE PRÁCE	48
3.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	49
3.1	Pomůcky a přístroje	49
3.2	Seznam použitých chemikálií	50
3.3	Příprava roztoků	51
3.4	Kultivace buněk SH-SY5Y	53
3.5	Kultivace buněk A549	53
3.6	Testování cytotoxicity pomocí bioanalytických metod	53
3.6.1	Bioluminiscenční analýza intracelulární koncentrace ATP	54
3.6.2	Fluorimetrické stanovení koncentrace glutathionu	54
3.6.3	Detekce intracelulární dehydrogenázové aktivity	55
3.7	Detekce cytotoxicity s využitím fluorescenční mikroskopie	56
3.7.1	Vizualizace aktinových vláken	56
3.7.2	Vizualizace buněčného jádra	57
3.8	Proteinová exprese HSP	57
3.8.1	Příprava proteinového lyzátu buněk	57
3.8.2	Stanovení koncentrace proteinů metodou dle Bradfordové	58
3.8.3	Stanovení vybraných proteinů metodou Simple Western	59
3.9	Statistická analýza naměřených dat	59
4.	VÝSLEDKY	60
4.1	Testování cytotoxicity pomocí bioanalytických metod	60
4.1.1	Bioluminiscenční analýza intracelulární koncentrace ATP	60
4.1.2	Fluorimetrické stanovení koncentrace glutathionu	62
4.1.3	Detekce intracelulární dehydrogenázové aktivity	64
4.2	Detekce cytotoxicity s využitím fluorescenční mikroskopie	66

4.3	Proteinová exprese HSP	68
5.	DISKUZE	69
6.	ZÁVĚR	77
7.	POUŽITÁ LITERATURA	78

SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK A GRAFŮ

Obrázek 1: Struktura mitochondrie	17
Obrázek 2: Dýchací řetězec	19
Obrázek 3: Struktura komplexu I	21
Obrázek 4: Katalytické jádro cytochrom c oxidázy	24
Obrázek 5: Chemická struktura adenosintrifosfátu	29
Obrázek 6: Bioluminiscenční reakce	31
Obrázek 7: Proces konstrukce trojrozměrné metalicko-organické rámové struktury z aminofunkcionalizovaného ligandu a iontů ceru	33
Obrázek 8: Funkční cyklus HSP70	41
Obrázek 9: Postup metody Western blot	45
Obrázek 10: Průběh analýzy <i>Simple Western</i>	46
Obrázek 11: Reakce monochlorobimanu s glutathionem	55
Obrázek 12: Princip WST-1 testu	56
Obrázek 13: Mikroskopická detekce vlivu vybraných látek na buňky SH-SY5Y	67
Tabulka 1: Přehled inhibitorů dýchacího řetězce	38
Tabulka 2: Vliv vybraných látek na exprese proteinů buněk SH-SY5Y	68
Graf 1: Vliv testovaných látek na koncentraci adenosintrifosfátu	61
Graf 2: Vliv testovaných látek na koncentraci glutathionu	63
Graf 3: Vliv testovaných látek na dehydrogenázovou aktivitu	65

SEZNAM ZKRATEK

ADP	adenosindifosfát
ANT	adeninnukleotidtranslokáza
Apaf-1	apoptotický aktivační faktor-1
APAP	acetaminofen
ATeam	ATP indikátor založený na epsilonové podjednotce pro analytická měření (<i>Adenosine 5'-Triphosphate indicator based on Epsilon subunit for Analytical Measurements</i>)
ATP	adenosintrifosfát
Bad	Bcl-2 asociovaný agonista buněčné smrti (<i>Bcl-2 Associated Agonist of Cell Death</i>)
Bcl-2	lymfom B-buněk 2 (<i>B-cell Lymphoma 2</i>)
BNC	binukleární centrum
BSA	hovězí sérový albumin
Ce-MOF	metalicko-organická rámová struktura na bázi ceru (<i>Cerium-based Metal-organic Framework</i>)
CisPt	cisplatina
CoQ	koenzym Q, ubichinon (<i>Coenzyme Q10</i>)
COX	cytochrom c oxidáza
DMEM/F-12	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium F-12</i>
DPBS	fosfátový pufr
ELISA	enzymová imunisorbentní analýza (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
ETC	elektronový transportní řetězec (<i>Electron Transport Chain</i>)
FAD	oxidovaný flavinadenindinukleotid
FADH ₂	redukováný flavinadenindinukleotid
Fe-S	klastry železa a síry
FITC	fluorescein-5-isothiokyanát
FMN	flavinmononukleotid
FRET	fluorescenční rezonanční přenos energie (<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>)

GSH	glutathion
HSF1	faktor tepelného šoku 1 (<i>Heat Shock Factor</i>)
HSP	proteiny teplotního šoku (<i>Heat Shock Proteins</i>)
IBM	vnitřní hraniční membrána (<i>Inner Boundary Membrane</i>)
IMM	vnitřní mitochondriální membrána (<i>Inner Mitochondrial Membrane</i>)
IMS	mezimembránový prostor (<i>Intermembrane Space</i>)
MCB	monochlorobiman
MEM	minimální esenciální médium
MICOS	mitochondriální kontaktní místo a systém organizující kristy (<i>Mitochondrial Contact Site and Cristae Organization System</i>)
mtDNA	mitochondriální deoxyribonukleová kyselina
NADH	redukovaný nikotinamidadenin dinukleotid
NBD	nukleotidová vazebná doména (<i>Nucleotide-Binding Domain</i>)
OMM	vnější mitochondriální membrána (<i>Outer Mitochondrial Membrane</i>)
OXPHOS	oxidativní fosforylace (<i>Oxidative Phosphorylation System</i>)
Q _i	chinonové redukční centrum (<i>Quinone Reduction Center</i>)
Q _o	hydrochinonové oxidační centrum (<i>Hydroquinone Oxidation Center</i>)
ROS	reaktivní formy kyslíku (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
SBD	substrátová vazebná doména (<i>Substrate-Binding Domain</i>)
SDH	sukcinátdehydrogenáza
STA	staurosporin
SW	Simple Western
WB	Western blot

ÚVOD

Ke správnému fungování buněk, resp. celého organismu, je zapotřebí energie. Výroba energie je složitý proces složený z mnoha dílčích reakcí. První fází je glykolýza, která probíhá v cytosolu, je anaerobní a nezávislá na mitochondriích. Druhou fází je Krebsův cyklus, který už probíhá v mitochondriích a je aerobní. Chemická energie uložená v sacharidech a tucích se přeměňuje na elektrochemický gradient přes vnitřní mitochondriální membránu pomocí komplexů elektronového transportního řetězce. Tento elektrochemický gradient funguje jako zásobárna energie, kterou ATP-syntáza využívá k přeměně adenosindifosfátu na ATP. Kromě své hlavní role v bioenergetice se ATP podílí na regulaci buněčného metabolismu a biochemický procesů. Dále je ATP potřebný pro stavbu proteinů, aminokyselin a aktivní transport iontů. Při oxidačním stresu buňky dochází ke změnám koncentrace ATP, proto se ATP používá jako indikátor buněčného poškození.

Proteiny HSP jsou přítomné ve všech živých organismech. Proteiny HSP působí jako molekulární chaperony a podílí se na skládání a rozbalování proteinů. Tím zajišťují udržování buněčné homeostázy. Proteiny HSP jsou exprimovány při buněčném stresu vyvolaném působením toxických látek a těžkých kovů, změnám pH nebo tepelným stresem. Proteiny HSP hrají důležitou roli při imunologické odpovědi organismu, mohou se také účastnit apoptotické buněčné smrti a podílí se na ochraně před cytotoxickým poškozením.

1. MITOCHONDRIE

Mitochondrie jsou organely vyskytující se v eukaryotických buňkách a mají dvě membrány (vnitřní a vnější). Jednou z hlavních rolí mitochondrií je syntéza adenosintrifosfátu (ATP) a regulace buněčného metabolismu. Také přispívají k buněčným stresovým reakcím, jako je apoptóza a autofagie a plní celou řadu dalších funkcí. Jejich ultrastruktura se značně liší mezi tkáněmi a organismy. Změny a remodelace vnitřních membránových struktur mitochondrií jsou zřejmé během apoptózy, autofagie, nekrózy a u mnoha lidských poruch (Zick *et al.*, 2009; Green *et al.*, 2011). Mezi takovéto poruchy patří např. mitochondriální myopatie, mitochondriální encefalomyopatie, laktátová acidóza a příhody podobné mrtvici, Kearnuv–Sayruv syndrom, Leighův syndrom nebo chronická progresivní externí oftalmoplegie (Ng *et al.*, 2016-a).

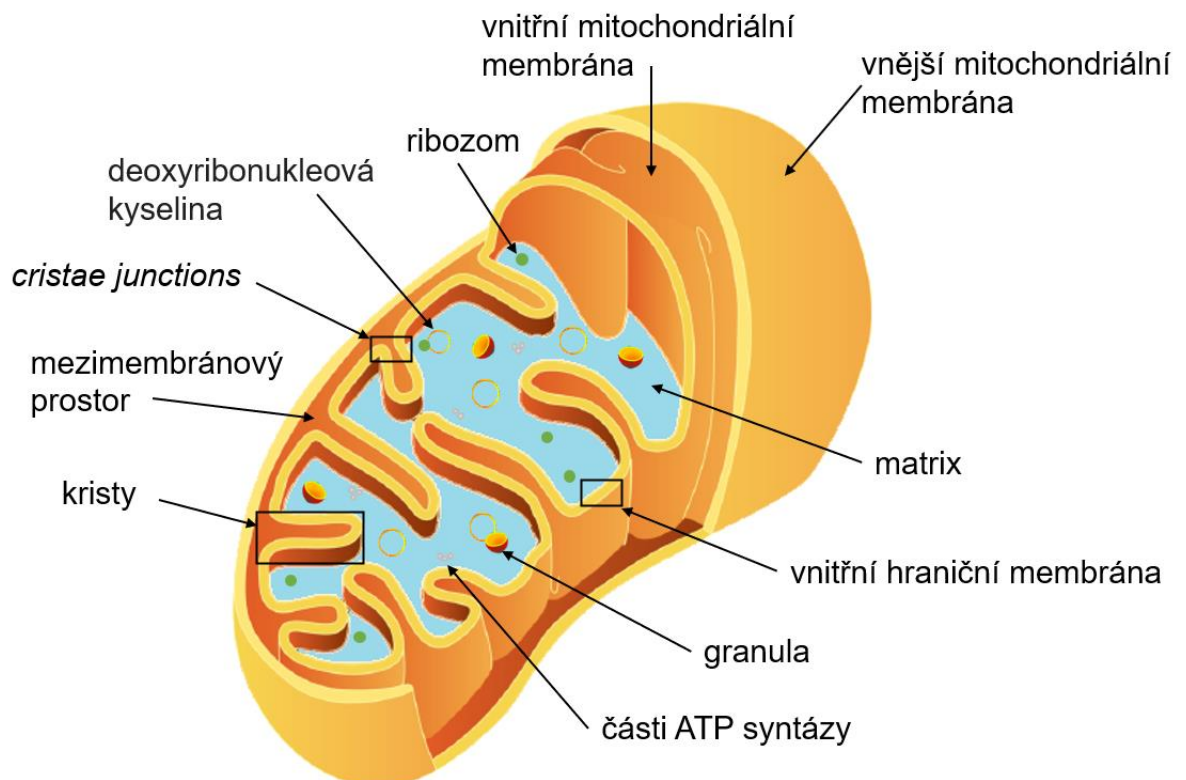
Mitochondrie pravděpodobně vznikly z alfa-proteobakterie pohlcené eukaryotickým progenitorem. Stejně jako jejich bakteriální předchůdce mají mitochondrie dvě samostatné a funkčně odlišné membrány. Jedná se o semiautonomní organely, které mají vlastní genetickou informaci. Mitochondriální deoxyribonukleová kyselina (mtDNA) je kruhová, organizovaná do oddělených nukleoidů v matrix a během evoluce byla redukována přenesením genu do jádra. Nejbližšími příbuznými enzymů modifikujících mtDNA, jako je mtDNA polymeráza, jsou bakteriofágové proteiny (Nunnari *et al.*, 2012).

V mitochondriích může docházet ke vzniku reaktivních forem kyslíku (ROS) v důsledku transportu elektronů, který řídí oxidativní syntézu ATP. Při nízkých hladinách ROS dochází k regulaci četných buněčných reakcí, ale při vysokých koncentracích ROS se přímo poškozují makromolekuly (proteiny, lipidy, sacharidy). Vlivem poškození těchto makromolekul dochází k narušení mitochondriálních funkcí. Narušené mitochondriální funkce v důsledku působení ROS mohou být reparovány dvěma mechanismy, jejich redistribucí a ředěním procesem štěpení a fúze, který distribuuje nově syntetizované složky, nebo selektivní eliminací poškozených mitochondrií makroautofagickým procesem, známým jako mitofágie. Životaschopnost mitochondrií je tedy udržována provázanými procesy biogeneze, dynamického štěpení a fúze a mitofágie. Poškození některého z nich je spojeno se špatnou funkcí a životaschopností buněk. Mitochondriální funkce s věkem klesá, což se dá pozorovat v různých parametrech, včetně poklesu ATP, změn v aktivitě transportu elektronů

a mitochondriálních enzymů, snížené respirační kapacity, zvýšené akumulaci mutací v mtDNA a ztrátě celkové mitochondriální hmoty (Webb *et al.*, 2020).

1.1 Struktura mitochondrií

Mitochondrie mají dvě membrány, které rozdělují organelu do čtyř rozdílných kompartmentů – vnější membrány (OMM), mezimembránového prostoru (IMS), vnitřní membrány (IMM) a matrix, z nichž každý plný svou funkci. Kromě typického uspořádání membrán se morfologie a distribuce organel výrazně liší mezi různými typy buněk, ale i mezi jednotlivými buňkami daného typu. Konvenční popis mitochondriální struktury, znázorněný na obrázku 1, je odvozený z velké části ze studií elektronové mikroskopie a charakterizuje mitochondrie jako kulovité nebo krátké tyčinkové struktury umístěné v různých částech cytoplazmy. Například mitochondrie ve fibroblastech jsou struktury dlouhé 1–10 μm s poměrně stálým průměrem ~ 700 nm, zatímco v hepatocytech jsou spíše kulovité nebo vejčité. V hladkém svalu cév jsou mitochondrie vejčitého nebo tyčinkovitého tvaru, ale v endotelu je tubulární mitochondriální síť (McCarron *et al.*, 2013).



Obrázek 1: **Struktura mitochondrie.** ATP (adenosintrifosfát) (upraveno dle Protasoni *et al.*, 2021).

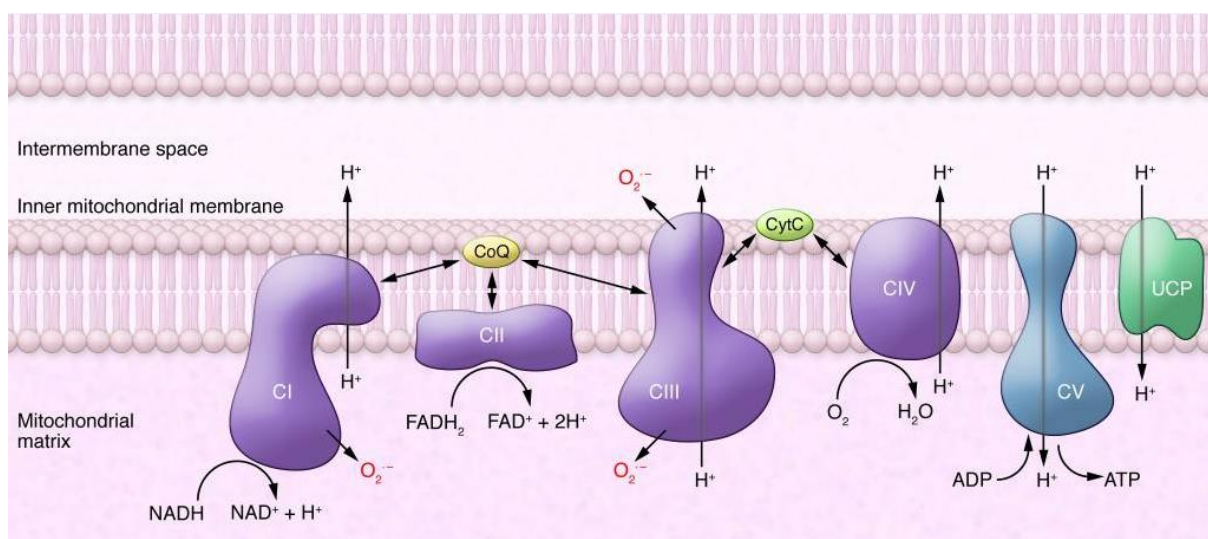
Membrány mitochondrií se výrazně liší složením lipidů, proteinů, permeabilitě a tvaru a jsou výsledkem endosymbiotického původu organely. OMM je svým složením lipidů více podobná membránám eukaryotických buněk, zatímco IMM se podobá bakteriálním membránám obsahujícím kardiolipin. IMM má vyšší poměr proteinů a lipidů a tvoří v matrix vysoce nahuštěné invaginace zvané kristy. Spolu s proteiny se v kristách nachází i mechanismus oxidativní fosforylace. Jedním z důvodů pro skládání IMM je zvětšení plochy pro výrobu energie. Část IMM, která probíhá současně s OMM, se nazývá vnitřní hraniční membrána (IBM) a s kristy je propojena úzkými trubkovými nebo štěrbinovitými strukturami *cristae junctions*. Membrány se také liší svojí permeabilitou. Zatímco OMM umožňuje průchod iontů a malých molekul přes iontové napěťově řízené kanály, přes IMM mohou volně procházet pouze voda, kyslík a oxid uhličitý. Tato selektivita umožňuje vytvoření elektrochemického gradientu, který tvoří základ pro produkci ATP a přísnou regulaci koncentrací dalších iontů, jako je vápník, převážně využívaný v buněčné signalizaci (Protasoni *et al.*, 2021).

Kristy jsou velmi variabilní. Mohou být různého tvaru v závislosti na typu buňky, tkáni, bioenergetickém stavu organely, osmotickém prostředí nebo patologickém stavu buňky. Morfologii krist určují i proteiny, např. prohibitiny nebo mitofilin, a byly pozorovány tubulární, lamelární, a dokonce trojúhelníkové struktury krist (Rabl *et al.*, 2009). Tubulární tvar tvoří krátké trubkovité invaginace vyčnívající dovnitř z mitochondriální IBM. V jiných buňkách tyto tubuly přesahují šířku matrix, a tím se dvakrát spojují s IBM. Kristy buněk nadledvin jsou často ve tvaru baňkovitých pupenů na vnitřní straně IBM. Pupy se mohou rozšířit a stanou se tubulovezikulárními kristami. Někdy se mohou jevit jako oddělené od IBM a vytvářet vezikuly v matrix (Griparic *et al.*, 2001).

V mitochondriích všech organismů je mitochondriální kontaktní místo a systém organizující kristy (MICOS). Jedná se o komplex složený ze dvou subkomplexů, jeden obsahuje podjednotky MIC10, MIC26, MIC27 a MIC13. Druhý obsahuje podjednotky MIC60, MIC19 a MIC25. Systém MICOS je hlavním prvkem morfogeneze IMM. Podjednotka obsahující MIC10 stabilizuje a tvaruje *crista junctions*. Podjednotka s MIC60 se rozprostírá přes IMS a spolupracuje se složkami OMM, jako je translokáza vnější membrány (Callegari *et al.*, 2019).

1.2 Dýchací řetězec

Mitochondriální dýchací řetězec na obrázku 2, známý také jako elektronový transportní řetězec (ETC), se skládá ze čtyř proteinových komplexů a dvou elektronových transportérů, ubichinonu (CoQ) a cytochromu c. Komplexy i transportéry jsou integrovány do IMM v těsné blízkosti matrix, ve které je umístěn Krebsův cyklus, jehož vstupním bodem je acetyl-koenzym A produkovaný glykolýzou nebo β -oxidací. Produkty Krebsova cyklu jsou nikotinamidadeninukleotid (NADH) a flavinadeninukleotid (FADH_2). Oba koenzymy jsou donory elektronů pro ETC. Tok elektronů je spojen s tvorbou protonového gradientu přes IMM a energie akumulovaná v protonovém gradientu je využívána ATP-syntázou (komplex V) k produkci ATP. Spojení produkce ATP s dýcháním je známé jako oxidativní fosforylace (OXPHOS) (Nolfi-Donagan *et al.*, 2020).



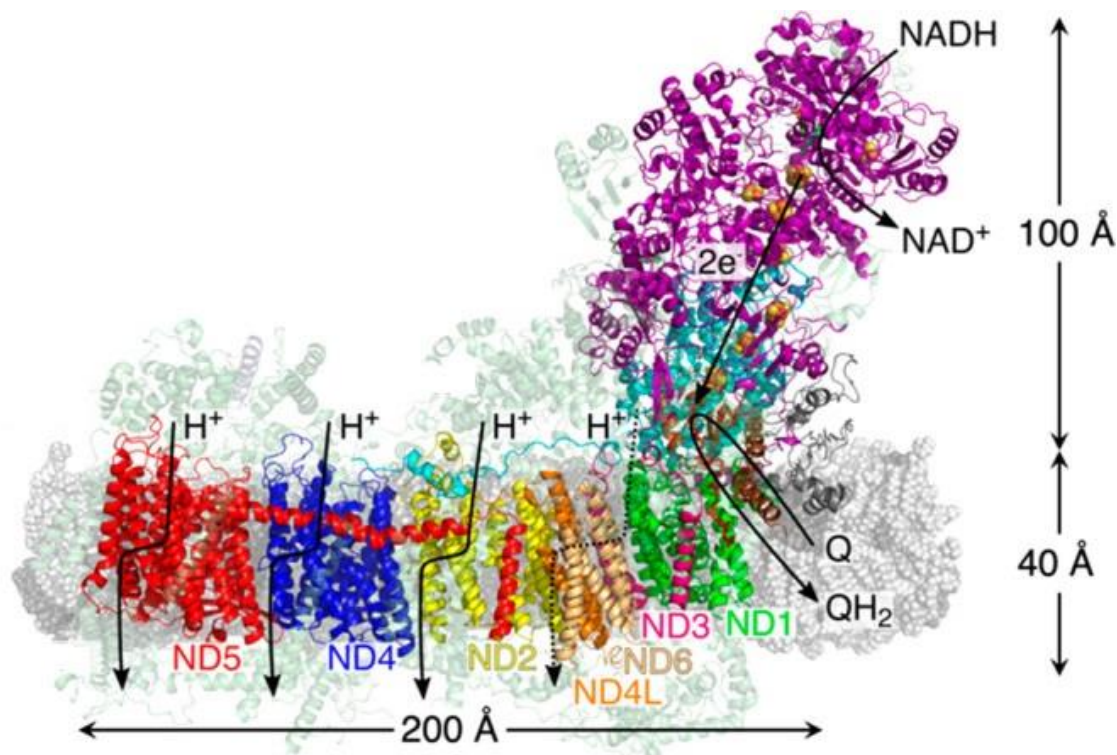
Obrázek 2: **Dýchací řetězec**. NADH (redukovaný nikotinamidadeninukleotid), NAD^+ (oxidovaný nikotinamidadeninukleotid), H^+ (proton), CI – CIV (komplex I – IV), CV (ATP-syntáza, komplex V), CoQ (koenzym Q, ubichinon), CytC (cytochrom c), ADP (adenosindifosfát), ATP (adenosintrifosfát), FADH_2 (redukovaný flavinadeninukleotid), FAD^+ (oxidovaný flavinadeninukleotid), O_2^- (Superoxid), UCP (uncoupling proteiny) (Bratic *et al.*, 2013).

1.2.1 Komplex I

Komplex I, také nazývaný NADH-ubichinon oxidoreduktáza nebo NADH dehydrogenáza, je největší a nejsložitější enzymový komplex v ETC. Velikost komplexu je přibližně 1 MDa. Hlavní rolí komplexu I je přenos elektronů z NADH na CoQ na IMM. Významně přispívá k tvorbě ROS a podílí se na patogenezi řady dědičných a degenerativních poruch. Eukaryotický komplex I je ve tvaru L a obsahuje dvě části, membránovou doménu zanořenou do IMM a hydrofilní doménu vyčnívající do matrix. U lidí a savců se komplex I, znázorněný na obrázku 3, skládá ze 14 centrálních podjednotek, které jsou středem enzymatické reakce a 31 vedlejších podjednotek, které jsou zapojeny do sestavení komplexu, jeho regulace a ochrany. Centrální podjednotky lze rozdělit do skupiny sedmi hydrofilních polypeptidů, které jsou kódovány jadernou DNA, a sedmi hydrofobních polypeptidů kódovaných mtDNA. Hydrofilní centrální podjednotky zahrnují všechny redoxně aktivní protetické skupiny, jeden flavinmononukleotid (FMN) a osm klastrů železa a síry (Fe-S) (Wirth *et al.*, 2016).

Substrát NADH se váže na podjednotku blízko skupiny FMN. Z jednoho NADH jsou předány komplexu I dva elektrony a přeneseny do molekuly FMN, která slouží jako první akceptor elektronů z NADH. Klastry Fe-S, které nesou označení N3, N1b, N4, N5, N6a a N6b, slouží jako cesta pro transport elektronů. Klastr N2 slouží jako konečný akceptor elektronů a katalyzuje přenos elektronů na molekulu CoQ. Přenosem elektronů na CoQ zároveň dochází k jeho redukci na ubichinol. Předpokládá se, že osmý klastr N1a lokalizovaný blízko FMN slouží jako úložiště elektronů, které má zabránit nadměrné produkci ROS (Larosa *et al.*, 2018).

Komplex I je protonová pumpa, která využívá přenosu elektronů k pumpování čtyř protonů přes membránovou doménu do IMS. Vzniklá protonová hybná síla je dále využívána k syntéze ATP pomocí ATP-syntázy a k aktivnímu transportu rozpuštěných látek proti jejich koncentračním gradientům. Proces translokace protonů je katalyzován antiporterovými podjednotkami v membránové doméně, které tvoří protonové kanály kolem skrytých nabitých zbytků v místech souvisejících se symetrií. Přenosu protonů v savčím komplexu I je zajištěn antiporterovými podjednotkami ND2, ND4 a ND5 a ND1, ND4L, ND6, ND3, které společně tvoří jednu protonovou dráhu (Röpke *et al.*, 2020).



Obrázek 3: **Struktura komplexu I.** Centrální podjednotky jsou zobrazeny plnými barvami, vedlejší podjednotky jsou průhlednými barvami. NADH (redukovaný nikotinamidadeninukleotid), NAD⁺ (oxidovaný nikotinamidadeninukleotid), e⁻ (elektron), Q (koenzym Q, ubichinon), QH₂ (ubichinol) (upraveno dle (Röpke *et al.*, 2020)).

1.2.2 Komplex II

Komplex II, také nazývaný sukcinátdehydrogenáza (SDH) nebo sukcinát-ubichinon-oxidoreduktáza, katalyzuje oxidaci sukcinátu na fumarát a přenáší dva elektrony. Je to jediný membránově vázaný enzym Krebsova cyklu a nepřispívá k tvorbě protonového gradientu. Komplex II je druhým vstupním bodem pro elektrony. Oxidovaný flavinadeninukleotid (FAD) se po přijetí elektronů ze sukcinátu redukuje na FADH₂, poté jsou elektrony přeneseny přes tři Fe-S klastry na CoQ. Přenosem elektronů na CoQ dochází k jeho redukcí na ubichinol (Sun *et al.*, 2005).

Savčí komplex II se skládá ze čtyř podjednotek, SDHA, SDHB, SDHC a SDHD, s přibližnou molekulovou hmotností 70, 30, 18 a 17 kDa. Jedná se tak o nejmenší komplex ETC. Hydrofilní hlavu SDH, vyčnívající do mitochondriální matrix, tvoří podjednotka SDHA s kovalentně vázaným FAD a podjednotka SDHB, která obsahuje tři klastry Fe–S. Podjednotka SDHC, velký protein vázající cytochrom b, a podjednotka

SDHD, malý protein vázající cytochrom b, tvoří hydrofobní membránovou kotvu a jsou místem vazby cytochromu b (Kovářová *et al.*, 2013).

1.2.3 Komplex III

Komplex III, také nazývaný cytochrom bc_1 komplex nebo ubichinol-cytochrom c-oxidoreduktáza, katalyzuje přenos dvou elektronů z ubichinolu na cytochrom c mechanismem protonmotivního Q cyklu, který je spojený s translokací protonů přes IMM. Komplex cytochromu bc_1 je homodimerní. U lidí je každý monomer tvořen 11 podjednotkami, třemi základními a osmi jaderně kódovanými nadpočetnými podjednotkami, které zajišťují stabilitu komplexu. Mezi základní podjednotky patří cytochrom b, obsahující vysokopotenciální hem (b562) a nízkopotenciální hem (b565) typu b, který je jako jediný kódovaný mtDNA, a cytochrom c_1 , obsahující jeden hem typu c, a Rieskeho protein, obsahující klastr [2Fe–2S]. Cytochrom c_1 a Rieskeho protein jsou jaderně kódovány. Na obou koncích cytochromu b jsou dvě vazebná místa pro CoQ zapuštěná do IMM, z nichž jedno je hydrochinonové oxidační centrum (Q_o) umístěné na cytoplazmatické straně. Na straně k mitochondriální matrix je umístěné chinonové redukční centrum (Q_i) (Ndi *et al.*, 2018).

Protonmotivní Q cyklus začíná oxidací ubichinolu v místě Q_o a uvolněním dvou protonů do IMS. Jeden elektron je postupně přenesen do Fe–S klastru v Rieskeho proteinu, na cytochrom c_1 a poté na cytochrom c, který se redukuje. Druhý elektron redukuje hem b565. Tento elektron je přenesen přes hem b562 na CoQ v místě Q_i , a dochází k redukci CoQ na stabilní semichinon. Ve druhém kole cyklu elektron vstupující do Fe–S klastru Rieskeho proteinu redukuje druhý cytochrom c a cytochrom c_1 . To je doprovázeno uvolněním dalších dvou protonů do IMS. Elektron vstupující do nízkopotenciálního hemu redukuje semichinon na ubichinol v místě Q_i . To je doprovázeno vycytáváním dvou protonů ze strany negativní matrix. Během Q cyklu dochází tedy k translokaci dvou protonů a dvou elektronů do IMS (Guillaud *et al.*, 2014).

Komplex III, stejně jako komplex I, přispívá v menší míře k tvorbě ROS. Superoxid se tvoří v centru oxidace ubichinolu v místě Q_o . Zvýšenou produkci ROS může způsobit inhibice komplexu III antimycinem A. Stejnou měrou může přispět i vysoký membránový potenciál, který zpomaluje přenos elektronů z b565 na b562, tím napomáhá k většímu množství redukovaného b565, který pak zvyšuje tvorbu superoxidu (Rottenberg *et al.*, 2009).

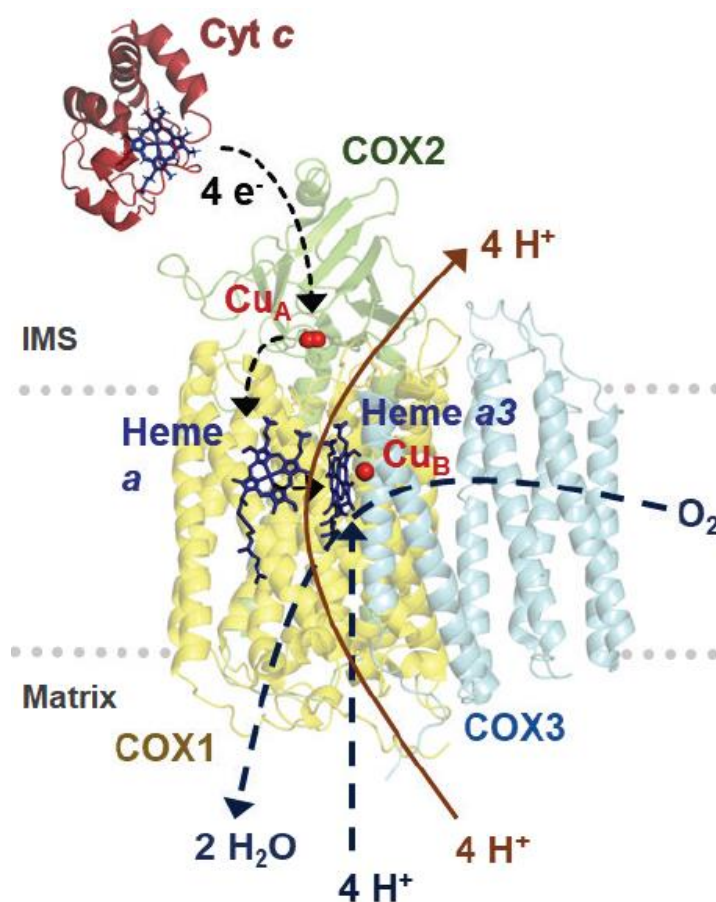
Koenzym Q neboli ubichinon, je lipofilní molekula přítomná ve všech tkáních a buňkách, která se nachází hlavně v IMM. Skládá se z redoxně aktivního benzochinonového kruhu a hydrofobního polyisoprenického řetězce různé délky u různých druhů. U lidí se nachází deset jednotek. CoQ je mobilní přenašeč elektronů, ale má i další funkce. Má antiapoptotickou funkci, je zapojen do biosyntézy pyrimidinů, buněčného růstu a diferenciaci, funkční modifikace mitochondriálních *uncoupling* proteinů a regulace metabolismu sulfidů. Navíc je ve své redukované formě jediným endogenně syntetizovaným antioxidantem rozpustným v tucích (Cerqua *et al.*, 2019).

1.2.4 Komplex IV

Komplex IV, známý také jako cytochrom c oxidáza (COX), je terminálním komplexem ETC a katalyzuje přenos elektronů z cytochromu c na kyslík, který se redukuje na vodu. Tato reakce je spojena s přenosem čtyř protonů přes IMM, což přispívá k elektrochemickému gradientu používanému pro syntézu ATP. Lidský COX je multimerní enzym složený ze 14 podjednotek. Podjednotky COX1, COX2 a COX3 na obrázku 4 tvoří katalytické jádro enzymu a jsou kódovány geny mtDNA. Zbývajících 11 podjednotek je kódováno jadernou DNA. Během biogeneze komplexu IV se do COX1 a COX2 zabudovaly dva redoxně aktivní hemy a (a , a_3) a 2 centra obsahující atomy mědi (Cu_A , Cu_B) (Hock *et al.*, 2020). Podjednotka COX1 je složená z dvanácti transmembránových α -helixů a tří katalytických center enzymu, hemu a binukleárního centra složeného z atomu hemu a_3 a Cu_B (BNC). Podjednotka COX2 se skládá ze dvou transmembránových α -helixů a bimetalického katalytického centra Cu_A (Cu^I/Cu^{II}), které se nachází v oblasti smyčky ve spodní části extramembránové domény COX2, na rozhraní COX1 a COX2. Podjednotka COX3 se skládá ze sedmi transmembránových α -helixů a stabilizuje katalytické centrum COX (Timón-Gómez *et al.*, 2018).

Hydrofilní doména COX2 zasahuje do IMS a váže rozpustný cytochrom c. Cu_A přijímá elektrony z rozpustného cytochromu c díky elektrostatickým interakcím uchovaných lysinových zbytků s karboxylovými skupinami hydrofilní části COX2. Z Cu_A proudí elektrony do hemu a v COX1, který přenáší elektrony do BNC, kde se O_2 redukuje na vodu. Nepolární kanál umožňuje difúzi kyslíku do katalytického centra enzymu COX. Adukt hem-kyslík vzniká vazbou O_2 do BNC a kyslíková vazba je okamžitě narušena. Současný přenos čtyř elektronů je zásadní jako preventivní opatření proti produkci ROS. Poté se BNC regeneruje čtyřmi redukčními kroky

katalytického cyklu. V každém kroku jsou jeden elektron z hemu a, a jeden proton z matrix translokovány do BNC, zatímco jeden proton je čerpán do IMS protonovým kanálem. Vazebná kinetika cytochromu c a O_2 je výrazně ovlivněna velikostí mitochondriálního membránového potenciálu a rozpřažení zvyšuje obrát enzymu. Komplexem IV je tedy čerpáno z matrix celkem osm protonů, čtyři jsou použity k vytvoření dvou molekul vody a další čtyři jsou přeneseny do IMS k vytvoření protonového gradientu. Tento proces spotřeby O_2 je známý jako mitochondriální dýchání (Čunátová *et al.*, 2020).



Obrázek 4: **Katalytické jádro cytochrom c oxidázy.** Cyt c (cytochrom c), IMS (mezimembránový prostor), COX1-3 (podjednotky cytochrom c oxidázy 1-3), $Cu_{A,B}$ (měďnatá centra A,B), O_2 (kyslík), H_2O (voda), H^+ (proton), e^- (elektron) (upraveno dle(Čunátová *et al.*, 2020).

Cytochrom c je ve vodě rozpustný hemoprotein nacházející se v IMS navázaný na IMM. To umožňuje přenos elektronů z komplexu III na komplex IV. Podílí se také na biosyntéze kofaktorů a lipidových signálních molekul a váže plyny, jako je oxid

uhelnatý, oxid dusnatý nebo kyslík. Jeho uvolnění z mitochondrií je signál pro zahájení apoptózy (Babbitt *et al.*, 2015). Cytochrom c obsahuje protoporfyrin IX a kovalentně vázaný hem. Během biosyntézy cytochromu c se tvoří thioetherové vazby reakcí mezi vinylovými skupinami hemu b a redukovanými cysteinovými zbytky v polypeptidu apocytochromu. Připojení kovalentního hemu zajišťuje stabilitu cytochromu c, bez níž je apocytochrom c v buňce rychle degradován. Přenos elektronů je zajištěn reverzibilní redukcí a oxidací iontů železa v cytochromu c (Chertkova *et al.*, 2017).

1.2.5 Komplex V

Komplex V, F_1F_0 ATP-syntáza, je membránově vázaný multipodjednotkový enzym, který využívá energii vytvořenou elektrochemickým gradientem k fosforylaci adenosindifosfátu (ADP) na ATP. Monomerní savčí ATP-syntáza je složená z 18 různých proteinových podjednotek. V mitochondriích tvoří monomerní komplexy dimery prostřednictvím interakcí mezi jejich membránovými doménami a dimery se sdružují v řadách na okrajích krist. ATP-syntáza se skládá ze dvou funkčních domén. Doména F_1 je umístěná v mitochondriální matrix a doména F_0 je ukotvená v IMM. Doména F_1 se skládá ze tří kopií podjednotek α a β , podjednotek γ , δ a ϵ , které tvoří centrální stopku komplexu a spojují hlavu domény F_1 s c-kruhem domény F_0 . Na třech rozhraní podjednotek α a β se nacházejí katalytická místa enzymu, kde vzniká ATP z ADP a anorganického fosfátu. Membránová doména F_0 se skládá z podjednotky c-kruhu, který pravděpodobně obsahuje osm kopií, a je v kontaktu s podjednotkou ATP6. Během syntézy ATP se c-kruh otáčí odhadovanou frekvencí až 300 Hz. Rotační energie je přenášena do domény F_1 centrální stopkou. Podjednotky b, d, F6 a protein udělující citlivost na oligomycin tvoří periferní stopku na jedné straně komplexu, která spojuje α a β podjednotky s ATP6. Podjednotky e, f, g, protein spojený s diabetem v tkáních citlivých na inzulín, 6,8 kDa lipoprotein a ATP8 (nebo A6L) jsou nadpočetné podjednotky (He *et al.*, 2017).

Mitochondriální membránový potenciál, vzniklý transportem elektronů, a koncentrace protonů v IMS generují protonmotivní sílu, která je zásadní pro syntézu ATP. Každá podjednotka c-kruhu je schopná vázat jeden proton v IMS, který interaguje s karboxylovou skupinou postranního řetězce glutamátu nebo kyseliny asparagové. Protonace podjednotek vyvolává rotaci c-kruhu, dokud nedojde ke konečné disociaci protonu na straně matrix. Rotace c-kruhu je podpořena kladným nábojem argininového zbytku v podjednotce a. Rotace c-kruhu vyvolává rotaci podjednotek γ a ϵ uvnitř

hexameru $\alpha_3\beta_3$ domény F_1 . Na vnější straně $\alpha_3\beta_3$ hexameru brání v rotaci periferní stopka. Výsledkem rotace γ podjednotky jsou tři různé konformace podjednotek β , což zajišťuje syntézu ATP. Podjednotka v těsné konformaci váže ATP velmi silně a její afinita k molekule je tak vysoká, že indukuje konverzi ADP a anorganického fosfátu na ATP. Podjednotka ve volné konformaci je schopna vázat ADP a anorganický fosfát, ale nemůže uvolnit nukleotidy. Podjednotka v otevřené konformaci umožňuje uvolnění syntetizovaného ATP (Protasoni *et al.*, 2021).

1.2.6 Superkomplexy dýchacího řetězce

Vývoj nativní gelové elektroforézy vedl k identifikaci mnoha obrovských (1,5-2 MDa) struktur obsahujících různé konfigurace komplexů I, III a IV nazývaných superkomplexy, které pravděpodobně umožňují efektivnější transport elektronů, zvyšují stabilitu komplexů a zmírňují produkci ROS. Funkce superkomplexů je stále předmětem řady studií. Složení a množství superkomplexů se může lišit mezi organismy a tkáněmi v závislosti na metabolických a fyziologických podmínkách a také na obsahu lipidů v IMM. Superkomplex obsahující jedinou jednotku komplexu I, dimer komplexu II a jednu jednotku komplexu IV se nazývá respirasom a je nejčastější pozorovanou strukturou v savčích mitochondriích. Respirasom obsahuje všechny struktury potřebné k přenosu elektronů z NADH na O_2 , a proto je považován za základní funkční jednotku superkomplexu. Všechny respirasomy mají membránové rameno komplexu I zakřivené kolem dimeru komplexu III s monomerním komplexem IV na špičce komplexu I (Caruana *et al.*, 2020).

1.3 Další úlohy mitochondrií v organismu

1.3.1 Apoptóza

Mitochondrie mají zásadní roli při apoptóze, což je typ programované buněčné smrti. Na rozdíl od nekrózy je apoptóza přísně regulovaná a závislá na energii ve formě ATP. Apoptóza má dvě možné cesty aktivace – vnitřní a vnější dráhy aktivace. Rodina proteinů lymfomu B-buněk 2 (Bcl-2), která je vázána na membránu mitochondrií, pevně reguluje aktivaci vnitřní dráhy. Antiapoptotickými členy jsou Bcl-2 a protein myeloidní buněčné linie-1, proapoptotickými členy jsou Bcl-2 asociovaný agonista buněčné smrti a Bcl-2 asociovaný X. Aktivace proapoptotických proteinů Bcl-2 může vést k aktivaci kaspázy 9, jejíž aktivace je důležitá pro zahájení efektorové fáze

apoptózy. Ve vnější dráze je přenos signálu zahájen vazbou tumor nekrotizujícího faktoru α , hlavního mediátoru ve vnější dráze, na jeho receptory. To vede aktivaci následných faktorů včetně kaspázy 8, která aktivuje kaspázu 3. Rychlé a závažné poškození mitochondrií může vyčerpat buněčný ATP a blokovat aktivaci kaspáz (Ren *et al.*, 2020).

1.3.2 Homeostáza vápníku

Mitochondriální regulace vápenatých iontů (Ca^{2+}) je klíčová pro bioenergetiku a buněčnou signalizaci. Import Ca^{2+} přes OMM probíhá prostřednictvím napěťově řízených iontových kanálů. Permeabilita IMM je přísnější, proto je přenos přes IMM do matrix zprostředkován pomocí vysoce selektivního kanálu pro Ca^{2+} zvaného mitochondriální Ca^{2+} uniporter. Jedná se o multimolekulární komplex skládající se z mitochondriálních proteinů pro příjem vápníku. Extruze Ca^{2+} je zprostředkována sodno-vápenato-lithným transportérem (Pathak *et al.*, 2018).

1.3.3 Syntéza hemu

Hem je porfyrin obsahující železo, nezbytný v řadě biologických procesů, jako je transport a skladování kyslíku, metabolismus léčiv a steroidů nebo přenos signálu. Také je součástí některých podjednotek elektronového transportního řetězce a je nezbytný pro buněčné dýchání. K syntéze hemu dochází jak v mitochondriích, tak v cytosolu. Kyselina 5-aminolevulová vzniká v mitochondriích kondenzací glycinu se sukcinylkoenzymem A za katalýzy 5-aminolevulinát syntázy. Kyselina 5-aminolevulová je exportována z mitochondrií do cytosolu, kde je pomocí čtyř enzymů přeměněna na koproporfyriinogen III. Ten je transportován zpět do mitochondrií, kde je za katalýzy koproporfyriinogenoxidázy, protoporfyriinogenoxidázy a ferrochelátázy přeměněn na protoporfyriin IX. Nakonec je do protoporfyriinu IX inkorporován iont železa za vzniku hemu (Medlock *et al.*, 2015).

1.3.4 Syntéza klastrů Fe-S

Klastry Fe-S jsou modulární kofaktory obsahující železo a anorganickou síru. Jsou ukotveny v polypeptidových skeletech proteinů, nejčastěji navázáním na atom síry cysteinu. V buňkách jsou potřebné pro mnoho procesů, jako je přenos elektronů, katalýza, regulace železa, oprava DNA nebo biogeneze ribozomů. Eukaryotní mitochondrie obsahují několik proteinů Fe-S, například akonitáza nebo ferredoxin.

Akonitáza vyžaduje pro aktivitu [4Fe-4S] kofaktor a je klíčovým enzymem v Krebsově cyklu v mitochondriích, kde reverzibilně přeměňuje citrát na isocitrát. Ferredoxiny obsahují [2Fe-2S] klastry, které získávají uvnitř mitochondrií a hrají zásadní roli v biogenezi Fe-S klastrů. Respirační proteinové komplexy I, II a III koordinují početné klastry Fe-S. Obě složky jsou však toxické, když nejsou uspořádané nebo jsou v nadbytku. Porucha syntézy klastrů vede k řadě onemocnění včetně neurodegenerativních poruch (Pandey *et al.*, 2015).

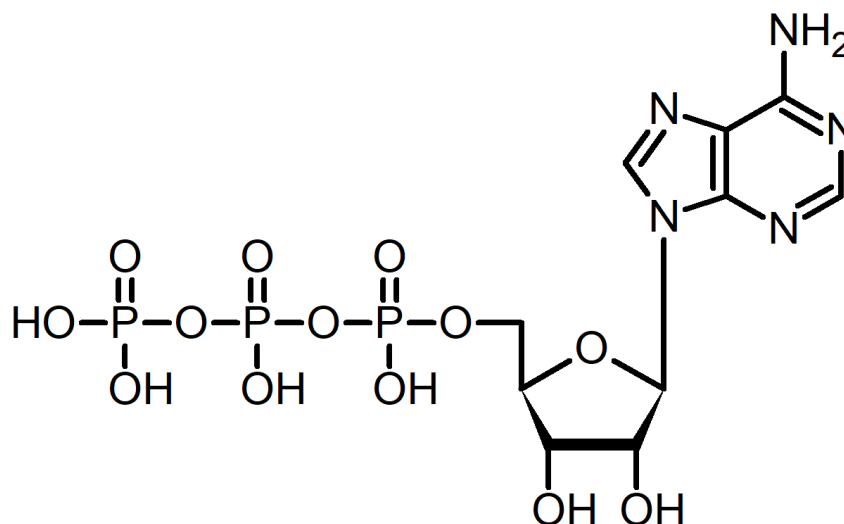
1.3.5 β -oxidace mastných kyselin

Mastné kyseliny jsou metabolizovány v mitochondriích pomocí β -oxidace, která poskytuje buňkám velké množství energie. Mastné kyseliny jsou transportovány krví jako neesterifikované mastné kyseliny vázané na lipoproteiny nebo sérový albumin. Do buňky se dostanou pasivní difúzí nebo prostřednictvím transportérů mastných kyselin. Do mitochondrie se dostávají jako acyl-koenzym A ester pomocí karnitinového transportního systému. β -oxidace probíhá čtyřmi enzymatickými reakcemi, dehydrogenací, hydratací, druhou dehydrogenací a thiolýzou. Konečnými produkty jsou acetyl-koenzym A, dva elektrony, které vstupují do OXPHOS a acyl-koenzym A ester zkrácený o dva atomy uhlíku. Výsledný zkrácený ester mastné kyseliny se vrací na začátek dráhy a je znovu oxidován, dokud nezůstanou pouze dvě molekuly acetyl-koenzymu A (Nsiah-Sefaa *et al.*, 2016).

1.4 Adenosintrifosfát

Adenosintrifosfát je důležitou biologickou molekulou ve všech živých organismech. V živých organismech je ATP produkován za přítomnosti enzymů, především v mitochondriích. Jedná se o nukleotid, který se skládá ze tří podjednotek, adeninové báze, 5 uhlíkatého ribózového cukru a trifosfátu (obrázek 5). Kombinace ribózy a adeninu tvoří adenosinovou složku ATP, zatímco trifosfátový konec tvoří reaktivní místo ATP. Díky tomu se může účastnit různých buněčných reakcí. Hlavní funkcí ATP je využití energie, která vzniká při hydrolýze ATP na ADP a anorganický fosfát. Tento cyklus ATP-ADP se nepřetržitě regeneruje a hraje zásadní roli v regulaci buněčného metabolismu a biochemických procesů. Dále je ATP potřebný pro stavbu proteinů, aminokyselin, aktivní transport iontů a jako elektrický signál synaptickém přenosu nervového systému. Kromě toho je ATP považován za indikátor životaschopnosti buněk a přítomnosti buněčného poškození. Protože se

vyskytuje ve všech živých buňkách, jeho koncentrace se rychle sníží, jakmile dojde k poškození buňky nebo k její smrti (Ng *et al.*, 2016-b).



Obrázek 5: Chemická struktura adenosintrifosfátu.

1.4.1 Role ATP při apoptóze

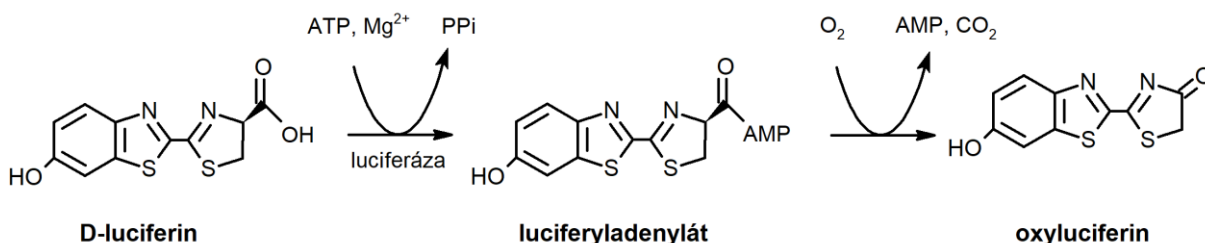
Apoptóza je vysoce regulovaný proces, který vyžaduje energii, protože zahrnuje řadu kroků závislých na intracelulárním ATP, jako je aktivace kaspáz, enzymatická hydrolýza makromolekul, kondenzace chromatinu, *blebbing* membrány buněk a tvorba apoptotických tělísek. Vyčerpání buněčného ATP chemickými látkami nebo jeho spotřebování při apoptóze způsobuje přepnutí mechanismu buněčné smrti z apoptózy na nekrózu. Také snížení intracelulární koncentrace ATP vyvolané inhibicí ATP-syntázy oligomycinem, glykolýzy nebo mitochondriálních respiračních aktivit, vede k potlačení aktivity kaspázy 3 a zvýšení nekrózy buněk (Miyoshi *et al.*, 2066). Stejně tak je ATP nutný pro tvorbu apoptozomu, komplexu cytochromu c, apoptotického aktivačního faktoru-1 a prokaspázy 9. Při apoptóze je nakonec intracelulární ATP vyčerpán, proto je udržování, i snižování intracelulární hladiny ATP systematicky regulováno během progrese apoptózy. Progrese apoptózy se mezi jednotlivými buňkami liší, dokonce i ve stejném typu buněk při použití identických podmínek. Proto je obtížné pochopit, jak se hladiny intracelulárního ATP v konkrétní buňce mění během apoptózy pomocí konvenčních biochemických analýz (Imamura *et al.*, 2020).

Syntéza mitochondriálního ATP vyžaduje transport ADP do mitochondrií, který je zprostředkován pomocí adeninnukleotidtranslokázy (ANT), která reguluje výměnu ADP a ATP a uvolňování cytochromu c z mitochondrií. Výměna ADP a ATP je závislá na přechodu ANT mezi dvěma konformačními stavy. Při c-stavu je hydrofilní smyčka vazebného místa ANT obrácena k cytosolu, zatímco v m-stavu je toto vazebné místo obráceno k matrix. Přechodem ANT do konformačního c-stavu dochází k uvolnění cytochromu c a apoptotické buněčné smrti. Naopak při přechodu do m-stavu dochází k zastavení transportu ADP, snížení hladiny ATP a následně k nekrotické buněčné smrti (Temkin *et al.*, 2006). Vyčerpáním buněčného ATP dojde k zastavení nebo přerušení apoptotického procesu. Pokud dojde k obnovení dostatečných hladin ATP, je buňka schopna obnovit pozastavený proces apoptózy. Ve studii Tetsuya Tatsumi, *et al.* (2003) navrhli, že za přítomnosti adekvátního množství glukózy může být produkce ATP udržována i během hypoxie nebo v přítomnosti mitochondriálního inhibitoru oligomycinu. Při hypoxii jsou buňky nuceny spoléhat na syntézu ATP pomocí glykolýzy, což způsobí zvýšení mitochondriální permeability a otevření pórů závislých na vápníku v IMS. Spouštěčem zvýšení mitochondriální permeability je translokace proapoptotického X proteinu asociovaného s Bcl-2, který tvoří selektivní kanály pro uvolnění cytochromu c z mitochondrií do cytosolu, tím dojde k rozpojení ETC, zástavě syntézy ATP a apoptóze (Tatsumi *et al.*, 2003).

1.5 Detekce koncentrace ATP

Obsah intracelulární ATP je hlavním indikátorem životaschopnosti buněk. Po smrti buňky je jako první zastavena syntéza ATP, přičemž jeho hydrolyza může pokračovat v řádech min, a proto intracelulární koncentrace ATP prudce klesne na nulovou hodnotu. Pro stanovení intracelulární koncentrace ATP existují různé metody, například enzymatické metody se spektrofotometrickou detekcí, radioaktivní nebo chromatografické metody. Jedním z nejpoužívanějších testů pro kvantitativní stanovení obsahu ATP je bioluminiscenční analýza, která se vyznačuje svojí vysokou rychlostí, citlivostí a specifitou. Molekula ATP je součástí reakce katalyzované enzymem luciferázou světlušek. Organický substrát D-luciferin je rychle oxidován v přítomnosti ATP a hořečnatých iontů molekulárním kyslíkem na oxyluciferin, adenosinmonofosfát a oxid uhličitý (obrázek 6). Zpočátku vzniká oxyluciferin v elektronicky excitovaném stavu a během jeho návratu do základního stavu je emitováno žlutozelené záření. Reakce zahrnuje tvorbu meziprojektu

luciferyladenylátu a uvolnění pyrofosfátu. Luciferyladenylát může být oxidován nejen na oxyluciferin, ale také na dehydroluciferyladenylát, který je vedlejším produktem bioluminiscenční reakce. Dehydroluciferyladenylát byl identifikován jako silný inhibitor luciferázy a významně ovlivňuje rychlost reakce zejména při vysokých koncentracích ATP (Wang *et al.*, 2019; Lomakina *et al.*, 2015).



Obrázek 6: **Bioluminiscenční reakce**. ATP (adenosintrifosfát), Mg²⁺ (hořečnaté ionty), PPi (pyrofosfát), O₂ (kyslík), AMP (adenosinmonofosfát), CO₂ (oxid uhličitý).

K měření bioluminiscence se využívají luminometry, které se začaly používat v 70. letech minulého století. Signál zaznamenaný luminometrem se udává v relativních jednotkách luminiscence a je úměrný počtu fotonů emitovaných vzorkem. Intenzita světla je přímo úměrná koncentraci ATP ve vzorku. Pro kvantitativní stanovení intracelulárního ATP se buňky lyzují, aby došlo k uvolnění ATP, lyzát se zavede do měřicí cely, poté se přidá činidlo ATP a změří se intenzita luminiscence. Pro výpočet koncentrace ATP v analyzovaném vzorku se využívá kalibrační křivka (Lomakina *et al.*, 2015). Výsledky bioluminiscenční analýzy závisí nejen na intracelulárních hladinách ATP, ale také na koncentraci substrátů, jako je D-luciferin a kyslík, nebo na koncentraci luciferázy, která je navíc ovlivněna pH. Další nevýhodou metody je, že hladina intracelulárního ATP by mohla být narušena v důsledku spotřeby ATP. Pozorování v reálném čase je problematické, protože slabá luminiscence luciferázy vyžaduje delší expoziční čas (Imamura *et al.*, 2009).

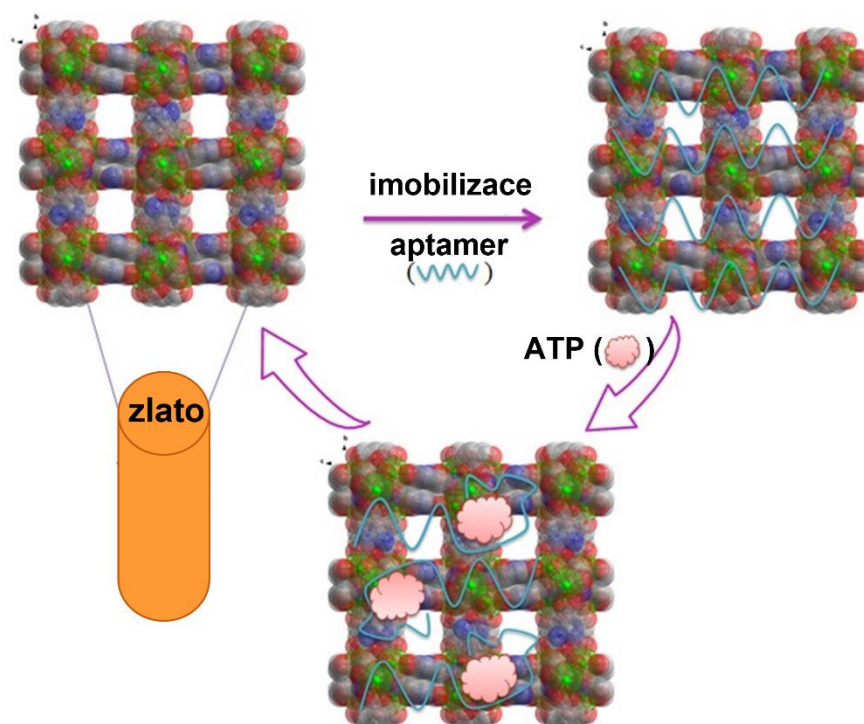
V roce 2009 vynalezl Hiromi Imamura a jeho tým metodu, kterou lze detekovat hladinu ATP uvnitř jednotlivých živých buněk. Metoda je založena na použití geneticky kódovaného indikátoru ATP na bázi fluorescenčního rezonančního přenosu energie (FRET) nazývaném ATP indikátor založený na epsilonové podjednotce pro analytická měření (ATeam). Indikátory ATeam využívají ϵ bakteriální podjednotku F₀F₁-ATP-syntázy, která je obklopená azurovými a žlutými fluorescenčními proteiny. Tyto proteiny jsou navázané buď na N-konec nebo C-konec podjednotky ϵ .

Bez navázání ATP je účinnost FRET nízká. Naopak při navázání ATP prochází podjednotka ϵ velkou konformační změnou, dojde k přiblížení fluorescenčních proteinů, což zvyšuje účinnost FRET. Podjednotka ϵ poskytuje senzoru ATP na bázi FRET několik výhod. Podjednotka ϵ se váže na ATP, ale nehydrolyzuje jej. Také má vysokou specifitu pro ATP na rozdíl od ostatních nukleotidů, jako je ADP, guanosintrifosfát, cytidintrifosfát nebo uridintrifosfát. Pomocí těchto indikátorů je možné detekovat koncentrace ATP v různých buněčných kompartmentech změnou aminokyselinových zbytků na rozhraní domény nebo nahrazením podjednotky ϵ podjednotkou jiného druhu. Lze také pozorovat dynamiku ATP v reálném čase v jednotlivých buňkách. Touto metodou bylo zjištěno, že koncentrace ATP v mitochondriální matrix jsou nižší než v cytoplazmě a jádře (Imamura *et al.*, 2009).

Další vyvinutou metodou je fluorescenční biosenzor pro detekci intracelulární koncentrace ATP na bázi malonyl-koenzym A syntetázy z *Rhodopseudomonas palustris*, která slouží jako proteinový *scaffold* a rozpoznávací prvek. K tomuto proteinu jsou kovalentně navázány dva 5-jodacetamidotetramethylrhodaminy, po navázání ATP dojde ke konformační změně, čímž dojde k emisi záření (fluorescenci). Malonyl-koenzym A syntetáza katalyzuje přeměnu malonátu a koenzymu A na adenosinmonofosfát, pyrofosfát a malonyl-koenzym A. Při vazbě ATP na rozhraní dvou domén dochází k významné konformační změně. C-koncová doména se otáčí směrem k N-koncové doméně a uzavírá štěrbinu aktivního místa. Zároveň dochází k tvorbě dimeru mezi dvěma tetramethylrhodaminy, které jsou navázány na malonyl-koenzym A syntetázu pomocí dvou cysteinových bodových mutací. Použití malonyl-koenzym A syntetázy je vhodné kvůli její vysoké selektivitě a afinitě k ATP, dobré stabilitě a vysoké míře exprese. Tato finální forma biosenzoru ATP zvyšuje až 3,7násobně intenzitu fluorescence s excitací při 553 nm a emisí při 575 nm. Lze tak detekovat mikromolární koncentrace ATP. Tento fluorescenční biosenzor má 67krát vyšší afinitu k ATP než k ADP. Schopnost biosenzoru monitorovat enzymatickou produkci nebo koncentraci ATP byla prokázána pomocí kinetických testů v ustáleném stavu, ve kterých je ATP produktem nebo substrátem. Metoda je vhodná pro řadu kinetických testů v reálném čase, které lze provádět za podmínek blízkých fyziologickému pH a iontové síle. Hlavní výhodou biosenzorů na bázi malonyl-koenzym A syntetázy je přidání pouze jednoho druhu činidla k monitorování analytu. Tím se minimalizuje možnost interference s dalšími přidanými činidly. Použití více činidel může být nevýhodou při použití enzymatických testů, včetně velmi využívané

bioluminiscenční analýzy s použitím luciferázy a luciferinu, nebo u metod založených na aptamerech v kombinaci s nanomateriály nebo ribozymy (Vancaenenbroeck *et al.*, 2015).

Jednou z hlavních detekčních technologií je elektrochemické biologické snímání, které je preferováno díky svému jednoduchému vybavení, vysoké selektivitě, rychlé odezvě, nízké ceně a širokým aplikacím. Pro detekci koncentrace ATP byla vyvinuta trojrozměrná metalicko-organická rámová struktura z aminofunkcionalizovaného ligandu a iontů ceru (Ce-MOF) prostřednictvím rychlé jedнокrokové syntézy. Proces konstrukce elektrochemického senzoru Ce-MOF zahrnuje tři kroky znázorněné na obrázku 7. Prvním krokem je modifikace holé zlaté elektrody pomocí Ce-MOF slabou kovalentní vazbou a elektrostatickými interakcemi. Poté je aptamer imobilizován na Ce-MOF prostřednictvím vodíkové vazby, stohování π - π a elektrostatických interakcí. Třetím krokem je specifická vazebná afinita mezi ATP a jeho aptamerem, která vede ke konformační změně aptamerových řetězců a silné elektrochemické impedanci v přítomnosti cílového ATP (Shi *et al.*, 2017).



Obrázek 7: **Proces konstrukce trojrozměrné metalicko-organické rámové struktury z aminofunkcionalizovaného ligandu a iontů ceru.** ATP (adenosintrifosfát) (upraveno dle Shi *et al.*, 2017).

S rostoucí koncentrací ATP se signál elektrochemické impedanční spektroskopie postupně zvyšuje. Biosenzor Ce-MOF vykazuje vysokou citlivost, selektivitu pro ATP, dobrou stabilitu a reprodukovatelnost. Tato metoda byla úspěšně použita při detekci ATP v lidském séru pacientů s rakovinou a má vysoký potenciál pro aplikaci v klinické diagnostice (Shi *et al.*, 2017).

1.6 Respirometrie

Respirometrie je citlivá kvantitativní metoda pro měření mitochondriální funkce, včetně OXPHOS, respirace a elektronového přenosu, v izolovaných mitochondriích, buněčných kulturách nebo ve vzorcích lidské tkáně. Respirometrie umožňuje měření desítek oxidačních cest v živých buňkách v reálném čase. Při použití inhibitorů specifických pro danou dráhu nebo použití redukčních systémů, jako jsou např. izolované mitochondrie nebo permeabilizované buňky, umožní identifikaci přesných míst dysfunkce (Hutter *et al.*, 2006). Respirometrie využívá oxygraf k měření rychlosti spotřeby nebo toku O_2 mitochondriemi. Oxygraf se skládá z uzavřené komory a kyslíkové elektrody Clarkova typu, která neustále monitoruje koncentraci O_2 v médiu. Elektroda se skládá ze zlaté nebo platinové katody a argentochloridové anody. Katoda a anoda jsou odděleny koncentrovaným vodným roztokem chloridu draselného. Tento elektrolyt je od analyzovaného vzorku oddělen polymerní membránou, která je propustná pouze pro O_2 . Když je mezi elektrody přivedeno napětí, O_2 difunduje z roztoku přes membránu ke katodě, kde se redukuje za vzniku hydroxidového iontu. Stříbro se oxiduje a na anodě se vysráží jako chlorid stříbrný. Proud produkovaný těmito reakcemi je úměrný koncentraci O_2 ve vzorku. Koncentrace O_2 , která klesá s tím, jak biologický vzorek spotřebovává O_2 , je vynesena do grafu v průběhu času. Hlavními nevýhodami kyslíkové elektrody je nestabilní signál a relativně vysoká hladina šumu přístroje. Přesto je stále levným a užitečným nástrojem pro hodnocení mitochondriální respirace (Ojuka *et al.*, 2016).

Jedním z přístrojů, které umožňují měření mitochondriální spotřeby O_2 s vysokou přesností, rozlišením a citlivostí, je oxygraf firmy Oroboros s vysokým rozlišením. Oxygraf Oroboros je stolní respirometr, který obsahuje dvě samostatné skleněné komůrky s injekčními porty. Injekčními porty lze přidávat substráty a inhibitory. Komůrky, obsahující vzorek (buňky, izolované mitochondrie), jsou vloženy do izolovaného měděného bloku. Ten je udržován při konstantní teplotě za pomoci elektronické regulace. Pro diagnostiku je zapotřebí pouze 200 až 2 miliony buněk.

Buněčné nebo izolované mitochondriální suspenze se kontinuálně míchají v respirometru. Koncentrace O_2 je neustále zaznamenávána polarografickými kyslíkovými senzory v každé komůrce, které umožňují paralelní měření. Rychlost spotřeby O_2 je vypočtena pomocí softwaru a vyjádřena jako v pikomolech za sekundu (pM/s) na počet buněk. Koncentrace O_2 je uváděna v mikromolech. Výhodou oxygrafu s vysokým rozlišením je snížený úniku O_2 z komor přístroje ve srovnání s tradičními polarografickými zařízeními s kyslíkovými elektrodami. Takže úbytek O_2 v komoře přímo souvisí se skutečnou biologickou spotřebou O_2 . Další výhodou je možnost měření v malém množství tkání, vysoká citlivost, nízká hladina šumu přístroje, přesná teplota a kontrola míchání a možnost provádět experimenty při vysokém zředění. Pomocí vhodného respiračního pufru je možné provádět sekvenční měření zahrnující titraci substrátů, inhibitorů a *uncoupling* proteinů v reálném čase (Djafarzadeh *et al.*, 2017; Lanza *et al.*, 2010). *Uncoupling* proteiny jsou transmembránové proteiny v IMM, které katalyzují transport protonů z IMS do mitochondriální matrix. To zapříčiní snížení elektrochemického gradientu a syntézy ATP. Místo ATP vzniká teplo (Woyda-Ploszczyca *et al.*, 2017).

Mitochondriální respirace je hodnocena sledováním několika respiračních stavů: ROUTINE, LEAK, OXPHOS a aktivita elektronového transportního systému. Respirační stav ROUTINE odpovídá klidové respiraci intaktních buněk v měřicím médiu v komůrce oxygrafu. Respirace LEAK se obvykle měří na začátku experimentu po přidání substrátu v nepřítomnosti ADP. LEAK je stav, při kterém nedochází k OXPHOS, ale protony pumpované přes respirační komplexy stále procházejí z matrix do IMS. Protože ATP-syntáza není během tohoto respiračního stavu aktivní, je tok O_2 minimální. LEAK vyjadřuje stav nejvyššího mitochondriálního membránového potenciálu na IMM při spotřebě O_2 a transportu protonů kvůli kompenzaci unikajících protonů z IMS do matrix nezávisle na ATP-syntáze. Respirační stav OXPHOS se měří po přidání ADP. Tím dojde k aktivaci ATP-syntázy a ke zvýšení spotřeby kyslíku. OXPHOS probíhá současně s transportem protonů do IMS. Dochází ke snížení mitochondriálního membránového potenciálu, zrychlí se transport protonů jednotlivými respiračními komplexy a zrychlí se tok elektronů v ETC. Respirace OXPHOS představuje maximální kapacitu mitochondrií sloužící ke spotřebě O_2 , když je oxidace substrátu spojena se syntézou ATP. Titrací inhibitoru ATP-syntázy dojde k navození dalšího stavu LEAK. Přidání nefyziologických *uncoupling* proteinů, jako je dinitrofenol, vyvolává maximální spotřebu O_2 nazývanou kapacita elektrontransportního systému.

Uncoupling proteiny jsou protonofory. Snadno přijímají protony a přenášejí je z IMS do matrix. Tím dojde ke snížení membránové potenciálu. V tomto respiračním stavu je možné zjistit maximální kapacitu komplexů I-IV pro transport protonů. Celková kapacita toku elektronů respiračním systémem je vyjádřena spotřebou O₂ (Ojuka *et al.*, 2016; Gnaiger *et al.*, 2009).

1.6.1 Inhibitory dýchacího řetězce

Inhibitory jsou známé pro všechny komplexy dýchacího řetězce se specifitou na konkrétní místa v daném komplexu (tabulka 1). Počet inhibitorů NADH-dehydrogenázy stále narůstá a je možné je rozdělit na přírodní a syntetické inhibitory. Rotenon, piericidin A, amytal nebo meperidin jsou nepostradatelnými pomocníky v experimentálních studiích. Rotenon je lipofilní přirozeně se vyskytující sloučenina. V minulosti byl široce používán jako pesticid a piscicid. Mechanismus účinku spočívá v inhibici přenosu elektronů z Fe-S center komplexu I na ubichinon pomocí vazby na vazebné místo ubichinonu. To vede k zastavení OXPHOS s omezenou syntézou ATP. Neúplný přenos elektronů na kyslík přispívá k tvorbě ROS. Rotenonem indukovaná produkce ROS s poškozením mitochondriálních složek může vést k apoptóze (Heinz *et al.*, 2017). Piericidin A je antibiotikum, které bylo poprvé izolováno z bakterie *Streptomyces mobaraensis* tvořící spory. Nyní ho lze syntetizovat chemicky. Struktura piericidinu A je podobná ubichinonu s krátkým řetězcem, proto se předpokládá, že se váže v místě redukce ubichinonu na ubichinon. Brání jak NADH-ubichinon oxidoreduktázové reakci, tak i reverznímu přenosu elektronů (Bridges *et al.*, 2020).

Specifické inhibitory komplexu II lze rozdělit do dvou skupin. První skupinou jsou inhibitory, které se strukturně podobají sukcinátu a vážou na jeho vazebné místo. Tato kovalentní vazba blokuje oxidaci sukcinátu na fumarát, dojde k přerušení přenosu elektronů v IMM a zástavě syntézy ATP. Inhibice komplexu II přispívá k tvorbě ROS. Do této skupiny patří například malonát nebo kyselina 3-nitropropionová. Druhou skupinou jsou inhibitory, které se vážou na vazebné místo ubichinonu, čímž se blokuje přenos elektronů. To způsobuje elektronový skluz a produkci superoxidu. Do této skupiny se řadí thenoyltrifluoracetonyl, atpeniny nebo analogy vitamínu E (α -tokoferylsukcinát) (Dröse, 2013).

Inhibitory komplexu III jsou rozděleny do celkem tří tříd na základě jejich specifity v jednotlivých místech komplexu III. Inhibitory I. třídy se vážou na Q_o centrum

a zamezují tak vazbě ubichinolu a jeho oxidaci na ubichinon. Do této třídy se řadí myxothiazol, stigmatellin nebo famoxadon. Inhibitory II. třídy se vážou na Q_i centrum. Nedochází k přenosu elektronů na Fe-S klastry, ani k redukci ubichinonu na ubichinol. Do této skupiny patří antimycin A nebo diuron. Inhibitory III. třídy se vážou na obě centra. Příkladem je 2-nonyl-4-hydroxychinolin-N-oxid. Myxothiazol je antimykotikum produkované myxobakterií *Myxococcus fulvus* a skládá se z aktivní methoxyakrylamidové skupiny a charakteristické dithiazolové skupiny. Myxothiazol se váže v Q_o centru a blokuje přenos elektronů na Rieske protein. Stigmatellin je další přírodní antimykotikum produkované myxobakterií *Stigmatella aurantica*. Jeho vazba v Q_o centru je závislá na přítomnosti Fe-S proteinu (Esser *et al.*, 2004). Antimycin A je jeden z prvních známých a nejúčinnějších inhibitorů mitochondriálního dýchacího řetězce. Antimycin je chemická sloučenina produkovaná bakterií *Streptomyces Kitazawensis*. Váže se na Q_i centrum komplexu III, čím dojde k inhibici oxidace ubichinolu a elektrony se nepřenášejí mezi cytochromem b a c. Důsledkem inhibice komplexu III je zvýšení produkce ROS a snížení hladin ATP (Ma *et al.*, 2011).

Známymi inhibitory cytochrom c oxidázy jsou kyanid, oxid dusnatý, oxid uhelnatý a sirovodík. Oxid dusnatý je účinným ireverzibilním inhibitorem komplexu IV. Po jeho odstranění se mitochondriální funkce vrátí do původního stavu. Oxid dusnatý se váže v binukleárním centru enzymu, kde se za fyziologických podmínek váže a zpracovává O_2 . Inhibice může probíhat dvěma cestami. Vazbou na Cu_B centrum vzniká dusitanový derivát oxidovaného enzymu. Vazbou na hem_{a3} vzniká stabilní nitrosylový derivát redukováného enzymu. Cesta, která převládá, závisí na reakčních podmínkách, koncentraci inhibitoru a fyziologických substrátů, cytochromu c a O_2 . Reverze inhibice je zvýšena v přítomnosti myoglobinu, hemoglobinu nebo redukováného glutathionu (Sarti *et al.*, 2012). Kyanid inhibuje aerobní metabolismus vazbou na binukleární hemové centrum cytochrom c oxidázy. Toxicita kyanidu je charakterizována histotoxickou hypoxií, při které jsou hladiny kyslíku normální, ale nelze ho využít k OXPHOS. Tím dojde k rychlému vyčerpání ATP (Leavesley *et al.*, 2010).

Oligomycin je nejznámějším inhibitorem ATP-syntázy. Je produkovaný bakterií *Streptomyces* a běžně se používá jako antibiotikum. Oligomycin se váže na c kruh F_0 domény, blokuje translokaci protonů a inhibuje syntézu ATP a OXPHOS (Patel *et al.*, 2020). N,N-dicyklohexylkarbodiimid je běžně používaným inhibitorem ATP-syntázy, který se kovalentně váže na karboxylovou kyselinu c kruhu domény F_0 a tvoří stabilní N-acyl močovinu. Tím zabraňuje otočení F_0 domény (Toei *et al.*, 2013).

Tabulka 1: **Přehled inhibitorů dýchacího řetězce.** TTFA (thenoyltrifluoraceton), DCCD (N,N-dicyklohexylkarbodiimid) (Heinz, *et al.*, 2017; Bridges *et al.*, 2020; Dröse, 2013; Esser *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2011; Sarti *et al.*, 2012; Leavesley *et al.*, 2010; Patel *et al.*, 2020; Toei *et al.*, 2013)

Cíl působení	Inhibitor	Molekulová hmotnost	Způsob působení
Komplex I	Rotenon	394,4 g/mol	inhibice přenosu elektronů z Fe-S center na ubichinon
	Piericidin A	415,6 g/mol	
	Amytal	226,3 g/mol	
Komplex II	Malonát	102,1 g/mol	vazba na vazebné místo sukcinátu blokuje oxidaci na fumarát
	TTFA	222,2 g/mol	inhibice přenosu elektronů z Fe-S center na ubichinon
	Atpenin A5	366,2 g/mol	
Komplex III	Myxothiazol	487,7 g/mol	inhibice přenosu elektronů z Fe-S center na ubichinon
	Stigmatellin	514,6 g/mol	
	Antimycin A	548,6 g/mol	inhibice přenosu elektronů mezi cytochromem b a c
Komplex IV	Kyanid	26,0 g/mol	vazba na binukleární centrum způsobuje kompletní inhibici
	Oxid uhelnatý	28,0 g/mol	
Komplex V	Oligomycin	791,1 g/mol	inhibice F ₀ domény
	DCCD	206,3 g/mol	

1.7 Proteiny teplotního šoku

Proteiny teplotního šoku (HSP) jsou fylogeneticky vysoce konzervované molekuly přítomné ve všech živých organismech. Mnoho členů HSP působí jako molekulární chaperony, jejichž hlavní funkcí je udržování buněčné homeostázy a řízení procesu skládání a rozbalování proteinů. Rovněž se podílejí na určování osudu chybně složených proteinů. Takto chybně složené proteiny jsou následně pomocí chaperonu znovu rozbaleny a složeny, popřípadě v procesu ubiquitinace označeny ubiquitinem a následně rozkládány v proteazomu či lyzozomu. Tímto mechanismem udržují správnou proteinovou strukturu a funkci. Také se podílí na regulaci genové exprese, replikaci DNA, transdukcii buněčných signálů, diferenciaci, apoptóze a buněčném přežití. Proteiny teplotního šoku byly poprvé objeveny jako skupina proteinů

indukovaných tepelným stresem. Nyní je známo, že jsou rychle exprimovány v reakci nejen na vysoké teploty, ale i UV záření, těžké kovy, ischemii, hypoxii, oxidační stres, remodelaci tkání, infekci, zánět nebo rakovinu (Mittal *et al.*, 2020; Thakur *et al.*, 2018). Poskytují tak ochranu buňkám před jejich poškozením. Zvýšená exprese HSP je závislá na několika po sobě jdoucích reakcích zahrnujících aktivaci faktoru tepelného šoku 1 (HSF1) indukovaného stresem. Signální dráhy aktivované v reakci na tepelný šok vedou k aktivaci specifických proteinkináz, které fosforylují HSF1. Aktivovaný HSF1 se váže na 5' promotorové sekvence genů HSP a iniciuje jejich transkripci za vzniku mediátorové ribonukleové kyseliny. Přesný mechanismus aktivaci však není dosud znám (Mittal *et al.*, 2020).

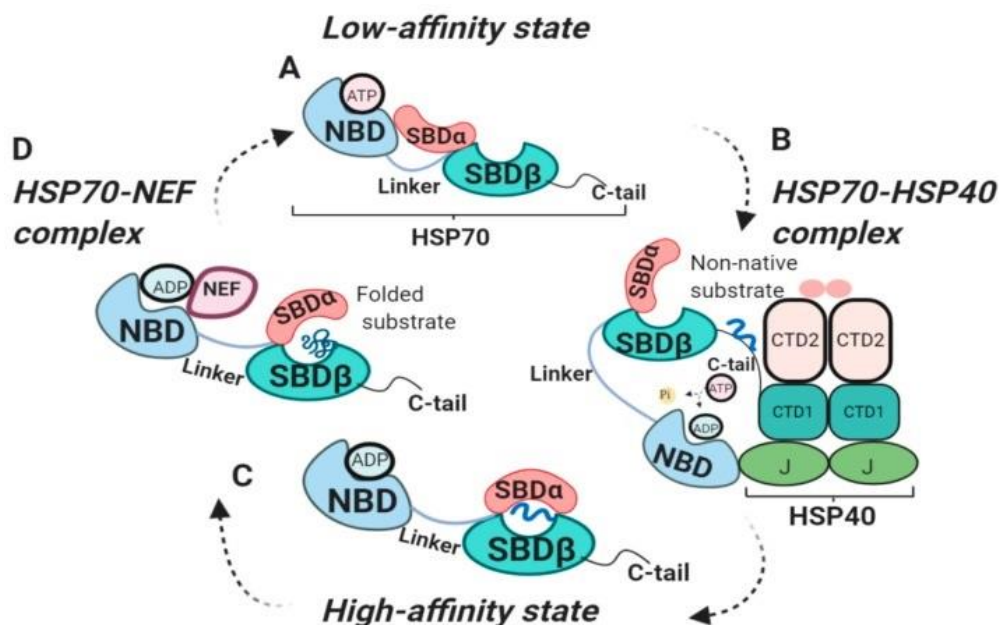
Většina HSP je exprimovaná intracelulárně. Některé HSP jsou však uvolňovány do extracelulárního prostředí buňky, zejména v reakci na stres. Z toho důvodu jsou považovány za biomarkery signalizující nebezpečí. Podněcují imunitní systém k reakci na převládající škodlivé podmínky v buňce. Například zvýšená sekrece HSP rakovinnými buňkami usnadňuje jejich zacílení NK buňkami. Proteiny teplotního šoku se podílejí na prozánětlivých i protizánětlivých reakcích. Jejich účinky na imunitní buňky závisí na druhu HSP a jejich koncentracích. Vzhledem k tomu, že jsou HSP vysoce konzervované, podílejí se nejen na imunitní modulaci, ale i na vývoji autoimunitních onemocnění. Některé HSP se podílejí na zpracování a prezentaci antigenu (Zininga *et al.*, 2018). Savčí HSP jsou rozděleny do šesti různých rodin podle molekulové hmotnosti: vysokomolekulární HSP (≥ 100 kDa), HSP90 (81-99 kDa), HSP70 (65-80 kDa), HSP60 (55-65 kDa), HSP40 (35-54 kDa), nízkomolekulární HSP (≤ 34 kDa). Každá rodina HSP má vzhledem ke své velikosti specifickou fyziologickou funkci a umístění uvnitř buňky (Thakur *et al.*, 2018).

1.7.1 Rodina HSP70

Hlavními molekulární chaperony jsou proteiny rodiny HSP70, které se vyskytují ve všech organismech. Mezi funkce HSP70 související se stresem patří skládání proteinů, zabránění agregaci proteinů, degradace proteinů, transport proteinů přes membrány, sestavení a rozložení proteinových komplexů. Protein HSP70 aktivuje jak vrozenou, tak adaptivní imunitu a působí jako silný imunomodulátor. Mnoho vědeckých experimentů naznačuje zásadní roli HSP70 u rakoviny. Je vysoce exprimován v maligních nádorech a slouží jako biomarker špatné prognózy. Proteiny HSP70 nikdy nefungují samostatně, ale ve spolupráci s řadou kochaperonů,

např. s J-proteinem (HSP40) a proteiny nukleotidového výměnného faktoru. Tyto kofaktory jsou klíčové, protože regulují vazbu HSP70 na proteiny ovlivněním interakce HSP70 s nukleotidy. Kochaperony, které jsou zapojeny do funkčního cyklu HSP70, tvoří vnitřní síť HSP70. Během svého funkčního cyklu a v rámci své vnitřní sítě HSP70 přímo interaguje s proteiny a vykonává svou chaperonovou funkci (Albakova *et al.*, 2020; Kumar *et al.*, 2016).

U lidí se vyskytuje 13 homologů HSP70 nacházejících se v cytosolu, jádře, lysozomech, endoplazmatickém retikulu a mitochondriích. Jsou jimi například HSP72, HSP70-5, HSP70-9, HSPA5 nebo HSPA8. Lidský HSP70 má dvě hlavní domény. N-terminální nukleotidová vazebná doména (NBD) váže ATP. Doména NBD se skládá ze čtyř subdomén, které jsou umístěny ve dvou lalocích. C-terminální substrátová vazebná doména (SBD) je potřebná pro vazbu peptidu. Skládá se z β -sendvičové subdomény s kanonickou drážkou vázající substrát, α -helikální subdomény a neuspořádané terminální oblasti. Spojení dvou hlavních domén zajišťuje krátká hydrofobní sekvence (Fernández- Fernández *et al.*, 2017). Proteiny HSP70 prochází několika konformačními změnami během svého ATPázového cyklu (obrázek 8). Vazba ATP na NBD indukuje otevřenou konformaci β subdomény a α subdomény SBD. V této konformaci je SBD v kontaktu s NBD a má nízkou afinitu k substrátu. Protein HSP40 váže substrát a dopravuje ho k HSP70. Vzniká komplex HSP70-HSP40-substrát a dochází k přenosu substrátu na SBD. Současně dochází k hydrolýze ATP, která je důležitá pro chaperonovou aktivitu HSP70. Rychlost hydrolýzy je limitujícím krokem v ATPázovém cyklu. V průběhu hydrolýzy dochází k rozsáhlým konformačním změnám. Ve stavu s vysokou afinitou k substrátu je ADP navázán na NBD, α subdoména SBD vytvoří víčko nad β subdoménou a substrát je pevně uzavřen uvnitř SBD. V dalším kroku dochází k vytěsnění ADP z NBD pomocí proteinů nukleotidového výměnného faktoru. Což umožní navázání nové molekuly ATP. Vazbou ATP dojde ke konformační změnám, vytvoří se otevřená konformace, dojde k uvolnění sbaleného proteinu a celý cyklus se opakuje (Albakova *et al.*, 2020).



Obrázek 8: **Funkční cyklus HSP70**. ATP (adenosintrifosfát), NBD (nukleotidová vazebná doména), SBD (substrátová vazebná doména), HSP (protein teplotního šoku), ADP (adenosindifosfát), Pi (anorganický fosfát), CTD (karboxylová terminální doména), J (J doména), NEF (proteiny nukleotidového výměnného faktoru) (upraveno dle Albakova *et al.*, 2020).

1.7.2 Rodina HSP60

Protein HSP60, známý také jako chaperonin, je jedním z hojně se vyskytujících proteinů v mitochondriích buněk. Protein HSP60 se za fyziologických podmínek vyskytuje také v cytosolu. Exprese HSP60 se zvyšuje u různých typů rakoviny a vyšší hladiny jsou spojeny s progresí nádoru. Proto je vhodný jako biomarker pro růst a progresi nádoru. Kromě své hlavní biologické funkce chaperonu, je schopen regulovat apoptózu prostřednictvím interakce s antiapoptotickými a proapoptotickými regulátory, jako je Bax, Bak, protein p21, protein p53 nebo survivin. Protein HSP60 také usnadňuje aktivaci prokaspázy-3 způsobem závislým na ATP. Mitochondriální HSP60 má antiapoptotické funkce. Nadměrně exprimovaný HSP60 je schopen potlačit apoptózu v kardiomyocytech zvýšením antiapoptotického Bcl-2 a Bcl-xL, snížením Bax a inhibicí prokaspázy-3. Potlačení exprese HSP60 vede k mitochondriální dysfunkci a následné apoptóze. Tento proces zahrnuje narušení komplexu HSP60-p53 v mitochondriích a dochází ke stabilizaci p53. Tím se zvyšuje exprese Bax a apoptóza závislá na Bax. V nádorových buňkách působí HSP60 jako regulátor

přechodu mitochondriální permeability asociací s cyklofilinem D. Deplece HSP60 indukuje přechod mitochondriální permeability, což vede k apoptóze. V cytosolu může mít HSP60 i proapoptotickou funkci. Prokaspáza-3 tvoří komplex s HSP60 a HSP10 v mitochondriích. Po indukci apoptózy staurosporinem se HSP uvolňují z mitochondrií do cytosolu. Cytosolický HSP60 stimuluje aktivaci prokaspázy-3 prostřednictvím cytochromu c a ATP (Huang *et al.*, 2020).

Funkční HSP60 vyžaduje kochaperon HSP10, který slouží jako kofaktor pro jeho vazbu na substrát a katalytickou aktivitu. Přesná struktura lidského HSP60 zůstává zatím nejasná. Po transportu do mitochondrií je HSP60 přeměněn na zralou formu s nižší molekulovou hmotností. Ve studii Ryuichi Ishida *et al.* (2018) zjistili, že HSP60 existuje jako stabilní heptamerový jednoduchý kruh v nepřítomnosti ATP. Po navázání ATP se HSP60 spojí s HSP10. Dojde ke spojení dvou jednoduchých kruhů komplexu HSP60-HSP10 a vzniká dvoukruhová struktura ve tvaru kosočtverce. Dochází k hydrolyze ATP, uvolní se HSP10 a ADP. To vede k disociaci dvojího kruhu na jednoduchý kruh HSP60 a celý cyklus se opakuje (Ishida *et al.*, 2018).

1.7.3 Rodina HSP27

Protein HSP27, také známý jako HSPB1, je molekulární chaperon patřící do rodiny nízkomolekulárních HSP. Protein HSP27 je nezávislý na ATP. Jeho hlavní úlohou je zachytit a uložit stresem vyvolané chybně složené polypeptidy, aby se zabránilo jejich agregaci a nepřímo podpořilo jejich opětovné sbalení nebo proteolytická degradace. Kromě své chaperonové funkce se podílí na termotoleranci, inhibici apoptózy, na buněčném růstu a diferenciaci nebo přenosu signálu. Také je známý pro své antioxidační vlastnosti. Zájem o HSP27 se v posledních letech zvedl, protože jeho zvýšená exprese se vyskytuje u řady onemocnění, včetně rakoviny a neurodegenerativních onemocnění (Arrigo, 2017). Monomer HSP27 se skládá ze tří domén: vysoce konzervované C-terminální domény (α -krystalinová doména) obsahující sedm β -řetězců uspořádaných do dvou listů, N-terminální domény a nekonzervované flexibilní domény, která tvoří C-terminální část proteinů. Proteiny HSP27 jsou schopné tvořit oligomery s vysokou molekulovou hmotností složené z více než 20 podjednotek. Tyto oligomery jsou velmi nestabilní a snadno podléhají reverzibilní asociaci a disociaci. Protein HSP27 vykazuje intenzivní fosforylaci, která moduluje jeho aktivitu v reakci na různé podněty. Fosforylace probíhá na serinových místech N-terminální domény pomocí proteinkinázy 2 aktivované

proteinkinázou aktivovanou mitogenem. Fosforylace těchto míst vede ke konformačním změnám, které indukují disociaci oligomerů HSPB1. Kromě schopnosti tvořit homooligomery, může HSP27 interagovat s jinými nízkomolekulárními HSP a vytvářet heterooligomery s odlišnými vlastnostmi (Muranova *et al.*, 2020).

Zajímavou funkcí HSP27 je schopnost zvýšit odolnost buněk proti oxidačnímu stresu. Exprese HSP27 souvisí s hladinami ROS a oxidu dusnatého. V buňkách vystavených oxidačnímu stresu snižuje HSP27 peroxidaci lipidů, oxidaci proteinů a narušení struktury F-aktinu. Také pomáhá udržet mitochondriální membránový potenciál, což umožňuje stresovým buňkám syntézu ATP. Antioxidační aktivita HSP27 závisí na intracelulárních koncentracích redukovaného glutathionu. Zvýšená exprese HSP27 snižuje intracelulární koncentrace železa a inhibuje tak Fentonovu reakci, a tedy vznik toxického hydroxylového radikálu. Antiapoptotická aktivita HSP27 vyplývá z jeho schopnosti molekulárního chaperonu. Je schopný vázat proapoptické molekuly, jako je Smac (*Second mitochondria-derived activator of caspase*), kaspázu-3, 9 nebo cytochrom c, čímž dochází k inaktivaci těchto molekul. Potlačené translokace Bid do mitochondrií souvisí s inhibicí uvolňování cytochromu c z mitochondrií. Fosforylovaný HSP27 je schopen se navázat na adaptorový protein související se smrtí 6. Tím dochází k inhibici vnější dráhy apoptózy (Arrigo *et al.*, 2007).

1.7.4 Vazba HSP na apoptotický aktivační faktor-1

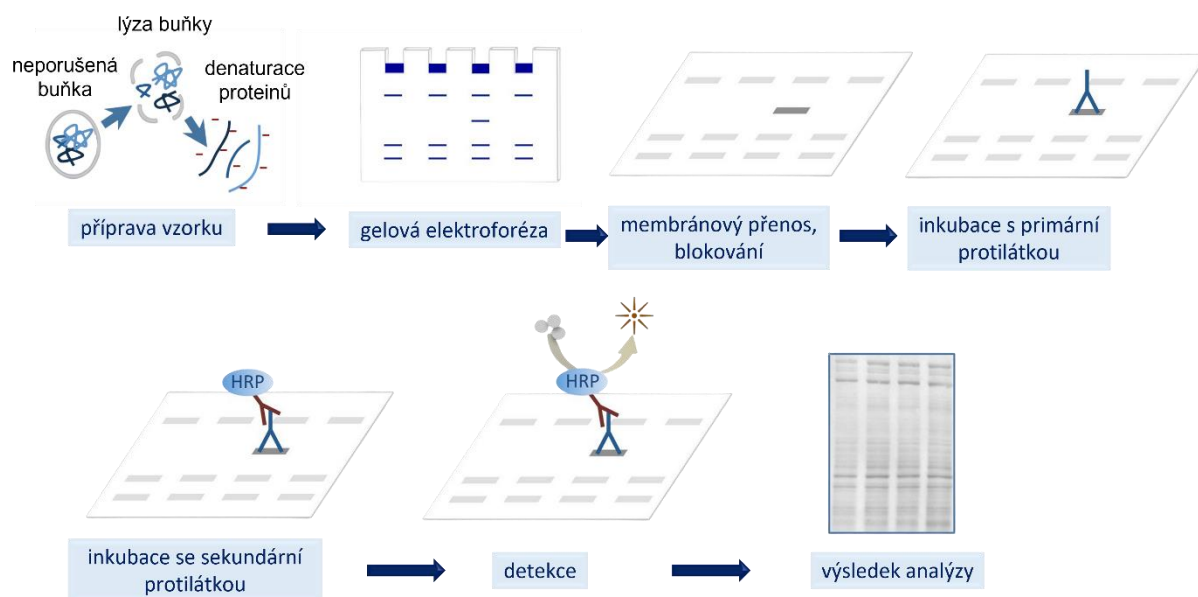
Tvorba apoptozomu, který je důležitým krokem ve vnitřní dráze apoptózy, je modulována mnoha buněčnými proteiny. Proteiny tepelného šoku mají antiapoptotické funkce. Jsou schopni přímo interferovat s apoptotickým aktivačním faktorem-1 (Apaf-1), a tím regulovat tvorbu apoptozomu. Chrání tedy buňky před apoptózou. Protein HSP90 se může přímo vázat na C-terminální doménu Apaf-1. Tím inhibuje oligomeraci Apaf-1 zprostředkovanou cytochromem c. Interakce s Apaf-1 je regulována fosforylací Hsp90 závislou na leukemogenních kinázách. Oproti tomu HSP70 přímo interaguje s N-terminální kaspázovou aktivační doménou Apaf-1 a inhibuje vazbu prokaspázy-9 a tvorbu apoptozomu. Molekulární mechanismy antiapoptotických funkcí HSP nejsou omezeny na přímé interakce s Apaf-1. Například HSP27 se neváže na Apaf-1 přímo, ale soutěží s ním o vazbu na cytochrom c uvolněný z mitochondrie. Což vede k inhibici tvorby apoptozomu a aktivaci kaspáz (Shakeri *et al.*, 2017).

1.7.5 Detekce HSP proteinů

1.7.5.1 Western blot

Western blot (WB), nebo také nazývaný imunoblot, je kvantitativní analytická metoda používaná k detekci specifického proteinu v komplexní směsi proteinů izolovaných z buněk. Směs proteinů se separuje pomocí gelové elektroforézy na základě molekulové hmotnosti, izoelektrického bodu nebo elektrického náboje. Následně jsou proteiny přeneseny z gelu na povrch membrány. Membrána je poté inkubována s primárními protilátkami specifickými pro daný protein a následně se sekundárními protilátkami. Postup metody WB je znázorněn na obrázku 9. Příprava vzorku před zahájením samotné WB analýzy je velmi důležitá pro přesnou interpretaci výsledků. Směs proteinů je nutné izolovat z buněk nebo tkání při nízké teplotě (4 °C) s využitím sonikace nebo dalších metod v závislosti na typu buněk. Také musí být zvolen optimální lyzační pufr, který usnadní správnou solubilizaci proteinů a zabrání jejich denaturaci. Nejběžnějším typem elektroforézy, který se používá ve spojení s WB, je elektroforéza na polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným, který je silný aniontový detergent. Protože proteiny ve vzorku nemají stejný elektrický náboj, je směs ošetřena dodecylsulfátem sodným, tak se proteiny denaturují a negativně nabíjejí, což umožňuje separaci proteinů na základě jejich molekulové hmotnosti. Po připojení napětí se pohybují proteiny různými rychlostmi ke kladně nabitě elektrodě. Ve výsledku jsou proteiny na gelu rozděleny do pásů. Součástí každého testu by měly být markery molekulové hmotnosti, které se používají ke stanovení molekulové hmotnosti cílového proteinu. Po elektroforéze jsou proteiny přeneseny na membránu vyrobenou z nitrocelulózy, polyvinylidendifluoridu, aktivovaného papíru nebo nylonu. Nejběžnějším postupem pro přenos proteinů je elektroblotting, jehož hlavní předností je rychlost a úplnost přenosu (Jensen, 2012). Před přidáním protilátek je potřeba blokovat povrch membrány. Tím se zabrání nespecifické vazbě protilátek na povrch membrány. Pro blokování těchto nespecifických míst se membrána umístí do roztoku, který obsahuje hovězí albumin nebo odtučněné sušené mléko. Blokování výrazně snižuje šum pozadí a odstraňuje falešné pozitivitu. Pro zviditelnění daného proteinu je nutné použít specifické protilátky. Po navázání primární protilátky a promytí se přidává sekundární protilátka značená enzymem, např. křenovou peroxidázou nebo alkalickou fosfatázou. Lze také použít sekundární protilátku značenou radioizotopem nebo fluoroforem. Nejpoužívanější detekcí je kolorimetrická, chemiluminiscenční

a fluorescenční detekce. Pro kvantifikaci výsledných pruhů se používá denzitometrický software (Bass *et al.*, 2017).

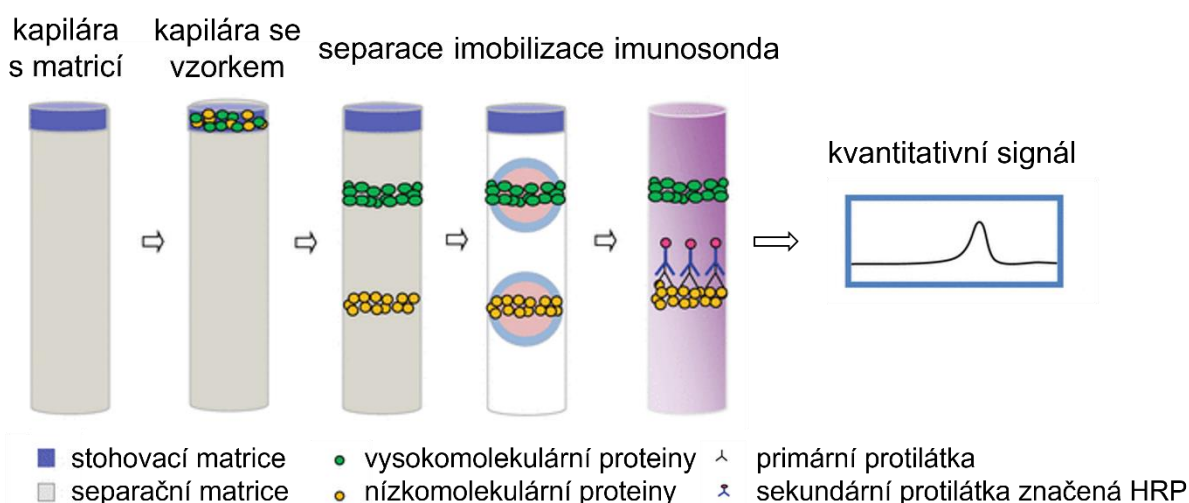


Obrázek 9: **Postup metody Western blot.** HRP (křenová peroxidáza) (upraveno dle Bass *et al.*, 2017).

1.7.5.2 Simple Western

Ačkoliv je WB nejrozšířenější metodou pro detekci proteinů, může mít ve srovnání s jinými metodami řadu problémů. Mezi ně patří špatná reprodukovatelnost, nepřesná kvantifikace, nespolehlivost a dlouhá doba trvání analýzy. Při použití metody *Simple Western* (SW) dochází k eliminaci těchto problémů. *Simple Western* je plně automatizovaná metoda od nanášení vzorku, přes separaci proteinů, zavádění detekčních sond, promývání, detekci a kvantitativní analýzu dat. Při analýze SW není potřeba použití gelu pro separaci proteinů a následného přenosu proteinů z gelu na membránu. Proteiny se oddělují v kapilárách, když migrují přes stohovací a separační matici (obrázek 10). Separované proteiny jsou imobilizovány na kapilární stěnu prostřednictvím patentované fotoaktivované záchytné chemie. Cílové proteiny jsou poté identifikovány primární protilátkou a následnou imunodetekcí pomocí sekundární protilátky konjugované s křenovou peroxidázou a chemiluminiscenčního substrátu. V rámci jednoho experimentu lze provést zároveň analýzu několika vzorků během 3-5 hod. Data z analýzy se zpracovávají automaticky pomocí softwaru. Data

jsou zobrazena pomocí pruhů, které jsou podobné tradičním výsledkům WB. Kvantitativní výsledky, jako je molekulová hmotnost, plocha intenzity signálu, % plochy intenzity signálu a signál šumu pro každý detekovaný protein, jsou uvedeny v tabulce výsledků. Analýza pomocí SW značně snižuje variabilitu způsobenou manuálními procesy ve WB. Data jsou semikvantitativní s dobrou reprodukovatelností. Protože není vyžadován přenos proteinů z gelu na membránu, eliminují se nesrovnalosti způsobené přenosem proteinů a výrazně se zlepšila celková kvantifikace (Nguyen *et al.*, 201; Chen *et al.*, 2013).



Obrázek 10: **Průběh analýzy Simple Western.** HRP (křenuvová peroxidáza) (upraveno dle Harris *et al.*, 2015)).

1.7.5.3 ELISA

Enzymová imunosorbční analýza (ELISA) je velmi používaná analytická metoda pro stanovení specifických proteinů v daném vzorku. Využívá specifické vazby proteinu (antigenu) a protilátky. Nejčastěji používanými enzymy jsou alkalická fosfatáza, glukózaoxidáza, křenuvová peroxidáza nebo β -galaktosidáza. Analýza se běžně provádí v mikrotitračních destičkách. Po vazbě protilátky na antigen se vytvoří imunokomplex, který je kvantifikován konjugátem (enzymaticky značená protilátka). Konjugát katalyzuje přeměnu přidaného substrátu na barevný nebo fluorescenční produkt. Stanovení je buď spektrofotometricky nebo fluorimetricky podle použitého substrátu. Koncentrace produktu je úměrná koncentraci proteinu ve vzorku. Klíčovým krokem metody ELISA je přímá nebo nepřímá detekce antigenu přilnutím specifické

protilátky nebo imobilizaci antigenu na stěnu jamky (Gan *et al.*, 2013). Metoda má řadu variant, každá má své výhody i omezení. Při přímé metodě ELISA je primární protilátka přímo konjugována s enzymem. Tato varianta je vhodná pro stanovení množství antigenu s vysokou molekulovou hmotností. Druhou variantou je nepřímá ELISA, při které se na antigen navážou specifické protilátky a následně se vážou sekundární protilátky konjugované s enzymem. Při sendvičové metodě ELISA jsou jamky potaženy protilátkou k vazbě požadovaného antigenu. Po blokování nespecifických vazebných míst pomocí hovězího sérového albuminu se vzorek obsahující antigen nanese na destičku. Po inkubaci a promytí dochází k odstranění nenavázaných antigenů. Po přidání sekundární protilátky s navázaným enzymem, které se vážou na vzniklý imunokomplex, se přidá substrát a měří zbarvení. Metoda ELISA při kompetitivním uspořádání probíhá tak, že je protilátka navázána na stěnu destičky a antigen ze vzorku soutěží s antigenem značeným enzymem o vazebná místa protilátky. Po promytí jamek a přidání substrátu umožňuje výsledné zbarvení kvantifikovat koncentraci. Mezi koncentrací analytu a intenzitou výsledného zbarvení je nepřímý poměr. Díky využití mikrotitračních destiček má ELISA vyšší kapacitu vzorků a dá se snadno automatizovat. Na rozdíl od WB může být použita pro stanovení proteinu s nativní strukturou (Aydin, 2015).

2. CÍLE PRÁCE

- 1) Optimalizovat přípravu biologického materiálu a luminiscenční metody pro detekci koncentrace ATP v buňkách.
- 2) Zavedené metody využít k detekci intracelulární koncentrace ATP po působení modelových sloučenin na buňkách.
- 3) K popisu změn energetického metabolismu u testovaných buněk po inkubaci s modelovými toxickými látkami využít některou z následujících metod (WST-1, metoda MCB, *Simple Western*)

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Pomůcky a přístroje

- Analytické váhy (Mettler Toledo, Německo)
- Automatické pipety Finnpipette (ThermoFisher Scientific Inc., USA)
- Automatický pipetor Accujet-Pro (BrandTech Scientific, Německo)
- Biohazard box SafeFAST Elite (Faster, Itálie)
- Centrifuga Mikro 22 R (Hettich, Německo)
- Centrifuga Rotina 420 R (Hettich, Německo)
- CO₂ inkubátor (PHCbi, Japonsko)
- Destičky pro konfokální mikroskopii, 8jamkové (SPL Life Sciences, Jižní Korea)
- Filtry (póry 2,7 μm; Whatman, UK)
- Invertovaný mikroskop Nikon Eclipse Ts2 (Nikon, Japonsko)
- Kultivační lahve NUNC T75 s filtrem (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)
- Lednice s mrazákem -20 °C (Liebherr, Česká republika)
- Mikroskop Nikon Eclipse 80i (Nikon, Japonsko)
- Mikrotitrační destičky, 6 a 96jamkové, (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)
- Mikrozkuhavky, objem 0,5; 1,5; 2,5 a 5 mL (Eppendorf, Německo)
- Multisizer 4e Coulter Cell Analyzer (Beckman Coulter, USA).
- Protein Simple Wes (Biotechne, USA)
- Spektrofotometr a spektrofluorimetr Spark (Tecan, Rakousko)
- Třepačky, vortexy (Reax top Heidolph, Německo, IKA Švédsko)
- Vodní lázeň Isotemp GPD10 (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)
- Výrobník ledu (EVERmed, Itálie)

Software

- Compass Software (Biotechne, USA)
- Microsoft Office – Word, Excel (Microsoft, USA)
- Nikon NIS-Elements (Nikon, Japonsko)
- OriginPro 9.0.0. (OriginLab, USA)
- i-control 1.6 (Tecan, Rakousko)

3.2 Seznam použitých chemikálií

- Anti-HSP90, anti-HSP70, anti-HSP60, anti-HSP27 (Novus Biological, USA)
- Anti- β -aktin protilátky (Sigma-Aldrich, USA)
- *ATP Determination Kit* (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)
- *Brilliant Blue G-250* (Sigma-Aldrich, USA)
- *Cell proliferation reagent WST-1* (Roche, Německo)
- Cisplatina, CisPt ($\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$; Mr = 300,1 g/mol; Sigma Aldrich, USA)
- Deionizovaná voda (Lonza, Belgie)
- *Dulbecco's Modified Eagle's Medium F-12 (1:1)* (Sigma Aldrich, USA)
- Minimální esenciální médium, MEM (Sigma-Aldrich, USA)
- Faloidin značeny fluorochromem FITC (Mr = 1252,44; Sigma Aldrich, USA)
- Fluorescenční sonda Hoechst 33258 (Mr = 623,96; Sigma Aldrich, USA)
- Fluorescenční sonda monochlorobiman, MCB (Sigma Aldrich, USA)
- Fosfátový pufr, DPBS 10x (pH 7,4; GIBCO, USA)
- Hovězí sérový albumin, BSA (Sigma-Aldrich, USA)
- Chlorid kademnatý, CdCl_2 , (Mr = 183,3 g/mol; Sigma Aldrich, USA)
- Inhibitor proteáz a fosfatáz MS-SAFE (Sigma-Aldrich, USA)
- Acetaminofen, APAP (Mr = 151,16 g/mol; Sigma Aldrich, USA)
- Pierce IP Lysis pufr (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)
- Staurosporin, STA (Mr = 466,53 g/mol; Sigma-Aldrich, USA)
- Triton X-100 (Mr = 647 g/mol; Sigma Aldrich, USA)
- Penicilin/streptomycin, P/S (Gibco, USA)
- HEPES pufr (Gibco, USA)
- Pyruvát sodný, PYR (Gibco, USA)
- L-glutamin (Gibco, USA)
- Neesenciální aminokyseliny, NAA (Gibco, USA)
- 1,4-dithiothreitol, DTT (Biotechne, USA)
- 10x vzorkový pufr (Biotechne, USA)
- Biotinylovaný marker (Biotechne, USA)
- Fluorescenční Master Mix (Biotechne, USA)
- Luminol-S (Biotechne, USA)
- Peroxid (Biotechne, USA)

- Promývací pufr (Biotechne, USA)
- Ředící pufr protilátky (Biotechne, USA)
- Sekundární protilátka značená křenovou peroxidázou králíčí, myší (Biotechne, USA)
- Streptavidin-křenová peroxidáza, streptavidin-HRP (Biotechne, USA)
- Formaldehyd, CH₂O (Mr = 30,03 g/mol; Erba Lachema, Česká republika)

Biologický materiál

- Buněčná linie lidského adenokarcinomu, A549 (ATCC, USA)
- Buněčná linie lidského neuroblastomu, SH-SY5Y (ATCC, USA)

3.3 Příprava roztoků

Kultivační médium pro buněčnou linii SH-SY5Y – Kultivační médium DMEM/F12 (1:1) s fenolovou červení jsme obohatili 15% (v/v) fetálním bovinním sérem, 2 mM glutaminem, 50 µg/mL penicilinu, 50 µg/mL streptomycinu a 1% neesenciálními aminokyselinami.

Kultivační médium pro buněčnou linii A549 – Kultivační médium MEM s fenolovou červení jsme obohatili 10% (v/v) fetálním bovinním sérem, 1 mM pyruvátém, 50 µg/mL penicilinu, 50 µg/mL streptomycinu a 10 mM HEPES pufrém.

Zásobní roztok CisPt (1 mM) – Navážku 0,0015 g CisPt jsme rozpustili v 5 mL deionizované vody. Roztok jsme skladovali v lednici při 4 °C

Zásobní roztok CdCl₂ (20 mM) – Navážku 0,0183 g CdCl₂ jsme rozpustili v 5 mL deionizované vody. Roztok jsme skladovali v lednici při 4 °C.

Pracovní roztok APAP (10 mM) – Navážku 0,0048 g APAP jsme rozpustili ve 2 mL kultivačního média. Pracovní roztok byl připravován vždy čerstvý.

Zásobní roztok STA (10 mM) – Navážku 0,04665 g staurosporinu jsme rozpustili v 10 mL deionizované vody. Roztok jsme skladovali v mrazáku při -20 °C.

Fosfátový pufr (DPBS, 1x) – Ke 45 mL deionizované vody jsme přidali 5 mL zásobního fosfátového pufru (DPBS, 10x). Takto připravený pufr jsme uchovávali v lednici při 4 °C maximálně 14 dní.

Zásobní roztok monochlorobimanu (MCB) – Navážku 5 mg monochlorobimanu jsme rozpustili v 2,206 mL dimethylsulfoxidu.

Pracovní roztok monochlorobimanu – Pro přípravu pracovního roztoku jsme k 2440 mL DPBS 1x přidali 60 µL zásobního roztoku fluorescenční sondy MCB o koncentraci 10 mM. Pracovní roztok MCB jsme připravovali vždy čerstvý.

Standardní reakční roztok pro detekci ATP – Pro přípravu 10 mL reakčního roztoku jsme použili 8,9 mL deionizované vody, 0,5 mL 20X reakčního pufru, 0,1 mL 0,1M DTT, 0,5 mL 10 mM D-luciferinu a 2,5 µL zásobního roztoku luciferázy (5 mg/mL). Objemy reagensů jsme si upravili podle požadovaného množství reakčního roztoku v závislosti na počtu vzorků. Reakční roztok byl vždy připravován těsně před měřením a ve tmě.

Zásobní roztok Faloidin-FITC – Zásobní roztok jsme připravili rozpuštěním Faloidinu-FITC v DPBS 1x. Roztok byl uchováván v mrazáku při -20 °C.

Pracovní roztok Hoechst 33258 (2 µmol/L) – K 95,8 µL DPBS 1x jsme přidali 4,2 µL zásobního roztoku Hoechst 33258 (c = 1000 µmol/L). Pracovní roztok se připravoval vždy čerstvý těsně před měřením.

Pracovní roztok formaldehydu (3,7 %) – K 1800 µL DPBS 1x jsme přidali 200 µL zásobního roztoku formaldehydu (37 %). Pracovní roztok se připravoval vždy čerstvý těsně před měřením.

Příprava roztoku triton X-100 (0,1 %) – K 1998 µL DPBS 1x jsme přidali 2 µL zásobního roztoku tritonu X-100 (100 %). Pracovní roztok se připravoval vždy čerstvý těsně před měřením.

Pracovní Pierce IP lyzační roztok – Přidali jsme 10 µL zásobního roztoku MS-SAFE inhibitorů proteáz a fosfatáz do 390 µL Pierce IP lyzačního pufru.

Činidlo dle Bradfordové – Navážili jsme 50 mg *Brilliant Blue G-250* a rozpustili v 25 mL 95% ethanolu a 50 mL 85% H₃PO₄. Roztok jsme následně doplnili na celkový objem 500 mL deionizovanou vodou a 2x přefiltrovali. Roztok jsme skladovali při 4 °C v temnu.

Zásobní roztok hovězího sérového albuminu (BSA) (10 mg/mL) – V 1 mL deionizované vody jsme rozpustili 10 mg BSA.

3.4 Kultivace buněk SH-SY5Y

Buněčnou linii SH-SY5Y jsme kultivovali v kultivačním médiu DMEM/F-12 (1:1). Do kultivačních lahví jsme nasazovali 350 tisíc buněk do 10 mL kultivačního média, a poté jsme buňky kultivovali v inkubátoru při 37 °C a 5 % CO₂. Každé 3 až 4 dny jsme měnili kultivační médium za čerstvé. Po dosažení konfluence 75-85 % jsme provedli pasážování buněk. Celkové množství buněk jsme počítali pomocí analyzátoru Multisizer 4e Coulter Cell Analyzer (Beckman Coulter, USA). Buněčnou suspenzi jsme následně ředili kultivačním médiem podle potřeby použití při experimentech a buňky nasadili do 6jamkových, 96jamkových destiček nebo do 8jamkové destičky pro konfokální mikroskopii.

3.5 Kultivace buněk A549

Buněčnou linii A549 jsme kultivovali v minimálním esenciálním médiu MEM. Do kultivačních lahví jsme nasazovali 100 tisíc buněk do 10 mL kultivačního média. Poté jsme buňky kultivovali v inkubátoru při 37 °C a 5 % CO₂. Každé 3 až 4 dny jsme měnili kultivační médium za čerstvé. Po dosažení konfluence 70-90 % jsme provedli pasážování buněk. Celkové množství buněk jsme počítali pomocí analyzátoru Multisizer 4e Coulter Cell Analyzer (Beckman Coulter, USA). Buněčnou suspenzi jsme následně ředili kultivačním médiem podle potřeby použití při experimentech a buňky nasadili do 96jamkových destiček.

3.6 Testování cytotoxicity pomocí bioanalytických metod

K testování cytotoxicity u buněčných linií SH-SY5Y a A549 jsme použili vybrané toxické sloučeniny jako cisplatinu (CisPt; 5 a 50 μM), chlorid kademnatý (CdCl₂; 25 a 100 μM), acetaminofen (APAP; 1 a 10 mM) a staurosporin (STA; 0,1 a 1 μM). Buňky SH-SY5Y a A549 jsme do 96jamkové mikrotitrační destičky nasadili v počtu 2x10⁴ a 5x10³ na jamku. Vliv toxických sloučenin byl sledován s využitím různých bioanalytických metod v časovém intervalu 24 a 48 hod. Pro detekci koncentrace ATP jsme použili bioluminiscenční analýzu, při které je reakce katalyzována luciferázou světlušek za přítomnosti D-luciferinu. Buněčnou viabilitu neboli životaschopnost jsme hodnotili WST-1 testem. Intracelulární koncentraci glutathionu jsme měřili pomocí fluorimetrické detekce monochlorobimanu.

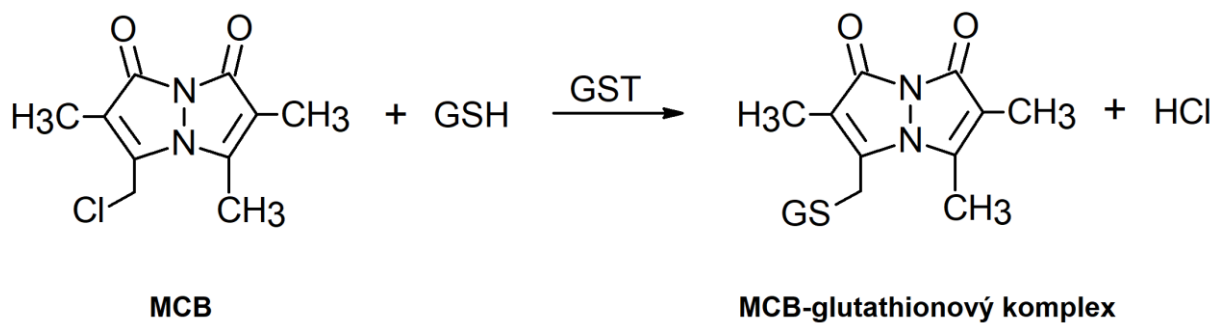
3.6.1 Bioluminiscenční analýza intracelulární koncentrace ATP

Bioluminiscenční analýza je díky své vysoké citlivosti, specifitě a rychlosti jednou z nejpoužívanějších metod pro kvantitativní stanovení celkové koncentrace ATP. Při reakci se organický substrát D-luciferin rychle oxiduje v přítomnosti ATP a hořčnatých iontů molekulárním kyslíkem na oxyluciferin, adenosinmonofosfát a oxid uhličitý. Reakce je katalyzována enzymem luciferázou světlušek. Zpočátku se oxyluciferin tvoří v elektronicky excitovaném stavu a během jeho přenosu do základního stavu je emitováno světelné kvantum (Lomakina *et al.*, 2015).

Z jednotlivých jamek jsme odsáli médium a přidali 100 μL ledové deionizované vody. Tím došlo k lýze buněk, která probíhala na ledu 5 min. Od tohoto kroku celá práce probíhala na ledu, aby nedocházelo k degradaci izolovaných proteinů. Poté jsme destičku centrifugovali 5 min při 4800 rpm a teplotě 4 $^{\circ}\text{C}$. Dále jsme si připravili kalibrační řadu o koncentracích 100 000 nM, 50 000 nM, 5 000 nM, 1 000 nM, 500 nM, 100 nM a 10 nM. Pro kalibrační řadu jsme zvolili zásobní roztok ATP o koncentraci 5 mM. Do 96jamkové destičky jsme pipetovali vždy 10 μL kalibračního standardu nebo vzorku a na závěr přidali 90 μL standardního reakčního pufru, který jsme připravovali těsně před měřením v souladu s komerčním návodem. Poté jsme měřili intenzitu luminiscence při vlnové délce 550 nm pomocí spektrofluorimetru SPARK (Tecan, Rakousko). Z naměřených dat v čase 0 jsme vyhodnocovali koncentrace ATP v jednotlivých vzorcích.

3.6.2 Fluorimetrické stanovení koncentrace glutathionu

Pro zjištění intracelulární koncentrace glutathionu (GSH) se využívají metody založené na principu fluorimetrie, které se vyznačují svou vysokou senzitivitou a specifitou. Do skupiny fluorescenčních sond pro detekci glutathionu patří monochlorobimany (MCB), které snadno pronikají buněčnou membránou do buněk. Navázáním MCB na glutathion vzniká fluorescenční produkt (MCB-glutathionový komplex), který lze měřit fluorimetricky (obrázek 11). Tato reakce je katalyzována glutathion-S-transferázou (Kamencic *et al.*, 2000; Čapek *et al.*, 2017).

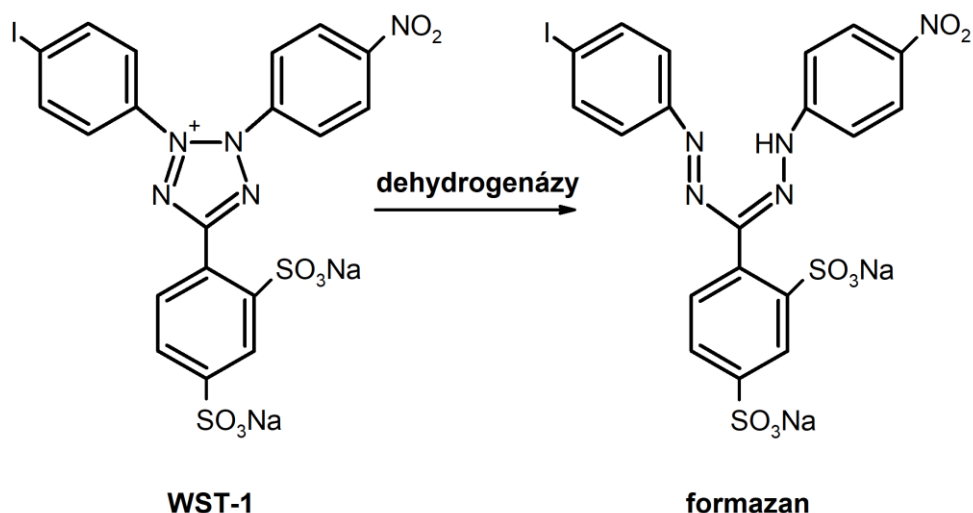


Obrázek 11: **Reakce monochlorobimanu s glutathionem.** MCB (monochlorobimano), GSH (glutathion), GST (glutathion-S-transferáza).

Do každé jamky jsme přidali 20 μ L pracovního roztoku MCB na jamku. Poté jsme měřili intenzitu fluorescence pomocí spektrofluorimetru SPARK (Tecan, Rakousko) při 37 °C. Excitační vlnová délka byla 394 nm a emisní vlnová délka 490 nm. Intracelulární koncentraci glutathionu jsme následně vyjádřili v procentech vztažených ke kontrolním buňkám (kontrolní buňky = 100 %).

3.6.3 Detekce intracelulární dehydrogenázové aktivity

K hodnocení buněčné viability, proliferace a cytotoxicity se široce využívá WST-1 test. Principem měření je redukce růžové tetrazoliové soli WST-1 (2-(4-jodofenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-(2,4-disulfofenyl)-2H-tetrazolium, monosodná sůl na žlutý formazan, který je rozpustný ve vodě (obrázek 12). Reakce je katalyzována mitochondriálními dehydrogenázami. Množství vzniklého formazanu je přímo úměrné počtu metabolicky aktivních látek. Absorbance formazanu je měřena spektrofotometricky při 440 nm (Yin *et al.*, 2013).



Obrázek 12: Princip WST-1 testu.

Do každé jamky jsme přidali 10 μL WST-1 činidla. Po přidání činidla jsme měřili absorbanci v čase 0 a 60 min při vlnové délce 440 nm pomocí spektrofluorimetru SPARK (Tecan, Rakousko) při 37 °C. Při vyhodnocení jsme odečítali absorbanci v čase 0 od absorbance v 60 min. Změnu absorbance jsme vyjádřili v procentech vztažených ke kontrolním buňkám (kontrolní buňky = 100 %).

3.7 Detekce cytotoxicity s využitím fluorescenční mikroskopie

K mikroskopické detekci cytotoxicity buněčné linie SH-SY5Y v časovém intervalu 24 hod jsme použili vybrané toxické sloučeniny jako CisPt (5 μM), CdCl_2 (25 a 100 μM), APAP (1 mM) a STA (0,1 μM). Buňky jsme nasadili do 8jamkové destičky pro konfokální mikroskopii v počtu 25×10^3 na jamku. Pro hodnocení cytotoxicity jsme použili fluorescenční sondu Hoechst 33258, pomocí které vizualizujeme jádro díky její preferenční vazbě na oblasti v buněčné DNA bohaté na adenin a thymin. Dále jsme použili fluorescenčně značený faloidin (faloidin-FITC), který nám umožňuje pozorovat změny buněčného cytoskeletu svou vazbou na aktinová vlákna.

3.7.1 Vizualizace aktinových vláken

Faloidin je toxin izolovaný z jedovatých hub *Amanita phalloides*, který se s vysokou specificitou váže na F-aktin a zabraňuje depolymerizaci filamentu. Přímá konjugace fluoroforů na faloidin z něj činí vhodný nástroj pro vizualizaci aktinových vláken.

Využívá se na značení fixovaných buněk, protože toxin má nízkou permeabilitu pro buněčné membrány živých buněk (Mazloom-Farsibaf *et al.*, 2021).

Před fixací jsme buňky promyli roztokem DPBS 1x a poté buňky jsme fixovali pomocí 200 μ L 3,7% formaldehydu. Poté jsme formaldehyd odtáhli a k buňkám jsme přidali roztok tritonu X-100. Po 15min inkubaci při 37 °C jsme buňky promyli roztokem DPBS vytemperovaným na 37 °C. Přidali jsme 200 μ L pracovního roztoku faloidinu a nechali jsme buňky inkubovat po dobu 40 min při laboratorní teplotě ve tmě. Nakonec jsme přidali krycí sklíčko. Zeleně obarvená aktinová vlákna jsme pozorovali fluorescenčním mikroskopem Eclipse 80i (Nikon, Japonsko). Excitační vlnová délka byla 485 nm a emisní vlnová délka 518 nm.

3.7.2 Vizualizace buněčného jádra

Sonda Hoechst 33258 je jedním z nejpoužívanějších barviv specifických pro DNA, které při navázání na DNA emitují pod ultrafialovým světlem modrou fluorescenci. Hoechst 33258 vykazuje specifickou vazbu na sekvence DNA bohaté na adenin a thymin. Jednou z hlavních výhod sondy je snadná kombinace s dalšími fluorescenčními barvivy (Martin *et al.*, 2005).

K buňkám jsme do 200 μ L média přidali 10 μ L pracovního roztoku Hoechst 33258 vytemperovaného na 37 °C. Po inkubaci jsme buňky promyli roztokem DPBS, a nakonec překryli krycím sklíčkem. Modře obarvená buněčná jádra jsme pozorovali fluorescenčním mikroskopem Eclipse 80i (Nikon, Japonsko). Excitační vlnová délka byla 352 nm a emisní vlnová délka 461 nm.

3.8 Proteinová exprese HSP

K testování změn proteinové exprese buněčné linie SH-SY5Y jsme použili vybrané toxické sloučeniny jako CisPt (5 μ M), CdCl₂ (25 a 100 μ M), APAP (1 mM) a STA (0,1 μ M). Buňky pro analýzu jsme nasadili do 6jamkové destičky v počtu 1,5x10⁶ na jamku. Buňky jsme inkubovali 24 hod s příslušnými toxickými sloučeninami.

3.8.1 Příprava proteinového lyzátu buněk

Aby bylo možné analyzovat expresi proteinů, je nutné nejdřív proteiny izolovat z buňky. Velmi oblíbenou metodou pro izolaci proteinů je lýza buněk pomocí pufrů, které obsahují různé detergenty k narušení integrity buněčných membrán. Do lyzačních pufrů se obvykle přidávají inhibitory proteáz a fosfatáz, které by jinak

mohli degradovat izolované proteiny. Při práci s proteiny je potřeba pracovat při nízké teplotě (4 °C), aby nedocházelo k jejich denaturaci (Tan *et al.*, 2009).

Buňky jsme lyzovali za použití komerčně dostupného Pierce IP lyzačního pufru a celá práce probíhala na ledu. Z jednotlivých jamek jsme odsáli supernatant do 2 mL mikrozkušavek a centrifugovali při 4 °C, 5 000g, 5 min. Po stočení vzorku jsme z mikrozkušavek odstranili supernatant. Buňky přisedlé v jamkách destičky jsme omyli 500 µL sterilním DPBS 1x a opět přepipetovali do příslušné mikrozkušavky na již stočené buňky. Centrifugovali jsme při 4 °C, 5 000g, 5 min. K opláchnutým buňkám jsme přidali 390 µL Pierce IP pufru s 10 µL inhibitorů a buňky roztokem omyli. Roztok jsme opět přepipetovali do příslušné mikrozkušavky a promíchali na vortexu. Nakonec jsme vzorky centrifugovali při 4 °C, 13 000g, 10 min a odsáli supernatant, který obsahoval námi izolované proteiny, do nové mikrozkušavky.

3.8.2 Stanovení koncentrace proteinů metodou dle Bradfordové

Metoda stanovení koncentrace proteinů dle Bradfordové je založená na kolorimetrickém stanovení celkového obsahu proteinů ve vzorku. Principem je vazba barviva *Coomassie Brilliant Blue G-250* na bazické aminokyseliny (arginin, lysin a histidin) v kyselém prostředí, což vede ke změně barvy z hnědé na modrou (Valipour *et al.*, 2015).

Zásobního roztoku BSA o koncentraci 10 mg/mL jsme si naředili na roztok o koncentraci 1 mg/mL, ze kterého jsme si připravili kalibrační řadu standardů o koncentracích 100, 250, 500 µg/mL. Z roztoku o koncentraci 100 µg/mL jsme si připravili zbytek kalibrační řady o koncentracích 10, 50, 70 µg/mL. Proteinové lyzáty z SH-SY5Y buněk jsme si naředili 25x, 50x a 100x. Do 96jamkové mikrotitrační destičky jsme pipetovali v tripletu 10 µL kalibračního standardu nebo vzorku a na závěr jsme přidali 300 µL činidla dle Bradfordové, které jsme předem vytemperovali na laboratorní teplotu a uchovávali ve tmě. Následně jsme měřili absorbanci v čase 10 min při vlnové délce 595 nm pomocí spektrofluorimetru SPARK (Tecan, Rakousko) při 37 °C. Koncentraci jednotlivých proteinových lyzátů jsme vypočítali z rovnice získané ze změřených hodnot kalibračních standardů.

3.8.3 Stanovení vybraných proteinů metodou Simple Western

Metoda SW kombinuje kapilární elektroforézu a WB k identifikaci a kvantifikaci proteinů. Proteiny se oddělují v kapilárách na základě molekulové hmotnosti a následně imobilizují UV zářením. Poté se naváží primární protilátky a následně sekundární protilátky konjugované s křenovou peroxidázou. Chemiluminiscenční substrát je za katalýzy křenovou peroxidázou přeměněn na detekovatelný produkt. Výsledky jsou prezentovány ve formě grafu i ve formě virtuálního gelu (Harris *et al.*, 2015).

Na stanovení exprese proteinů metodou SW jsme použili proteinové lyzáty buněk SH-SY5Y, ve kterých byla předem změřena koncentrace proteinů dle Bradfordové (viz kapitoly 3.8.1 a 3.8.2). Pro analýzu jsme používali komerčně dostupný 12-230 kDa Wes Separation Modul. Metodu SW jsme prováděli podle pokynů výrobce a práce probíhala na ledu. V prvním kroku jsme si naředili deionizovanou vodou vzorkový pufr (10x) na pracovní roztok (1x). Vzorky jsme si pomocí tohoto pracovního roztoku naředili na výslednou koncentraci 0,4 g/mL. K takto naředěným vzorkům jsme přidali 10 μ L Master Mixu a promíchali na vortexu. Vzorky spolu s biotinylovaným markerem jsme inkubovali v termobloku předehřátém na 95 °C po dobu 5 min. V dalším kroku jsme si naředili primární protilátky. Použili jsme primární protilátky anti-HSP90 (1:200; myší), anti-HSP70 (1:50; králíčí), anti-HSP60 (1:500; králíčí), anti-HSP27 (1:10; králíčí), a anti- β -aktin (1:500; králíčí). β -aktin nám posloužil jako referenční gen. Všechny vzorky, primární a sekundární protilátky a reagentie jsme napipetovali do destičky, kterou jsme následně centrifugovali (2500g, 5 min), abychom odstranili případné bubliny. Následně jsme vložili destičku do přístroje Protein Simple Wes (Biotechne, USA), vložili kapiláry a nastavili analýzu v Compass software (Biotechne, USA), kterou jsme hned spustili. Výsledky jsme vyjádřili jako poměr plochy píků stanovovaných proteinů a plochy píku β -aktinu.

3.9 Statistická analýza naměřených dat

Analýzu rozdílnosti naměřených hodnot jsme provedli v rámci vícečetného porovnání pomocí statistického testu ANOVA (1-W) a post-testu Tukey. Všechna data v práci jsou uvedena jako průměr \pm SD nebo průměr \pm SEM. Hladina významnosti $p = 0,05$ (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

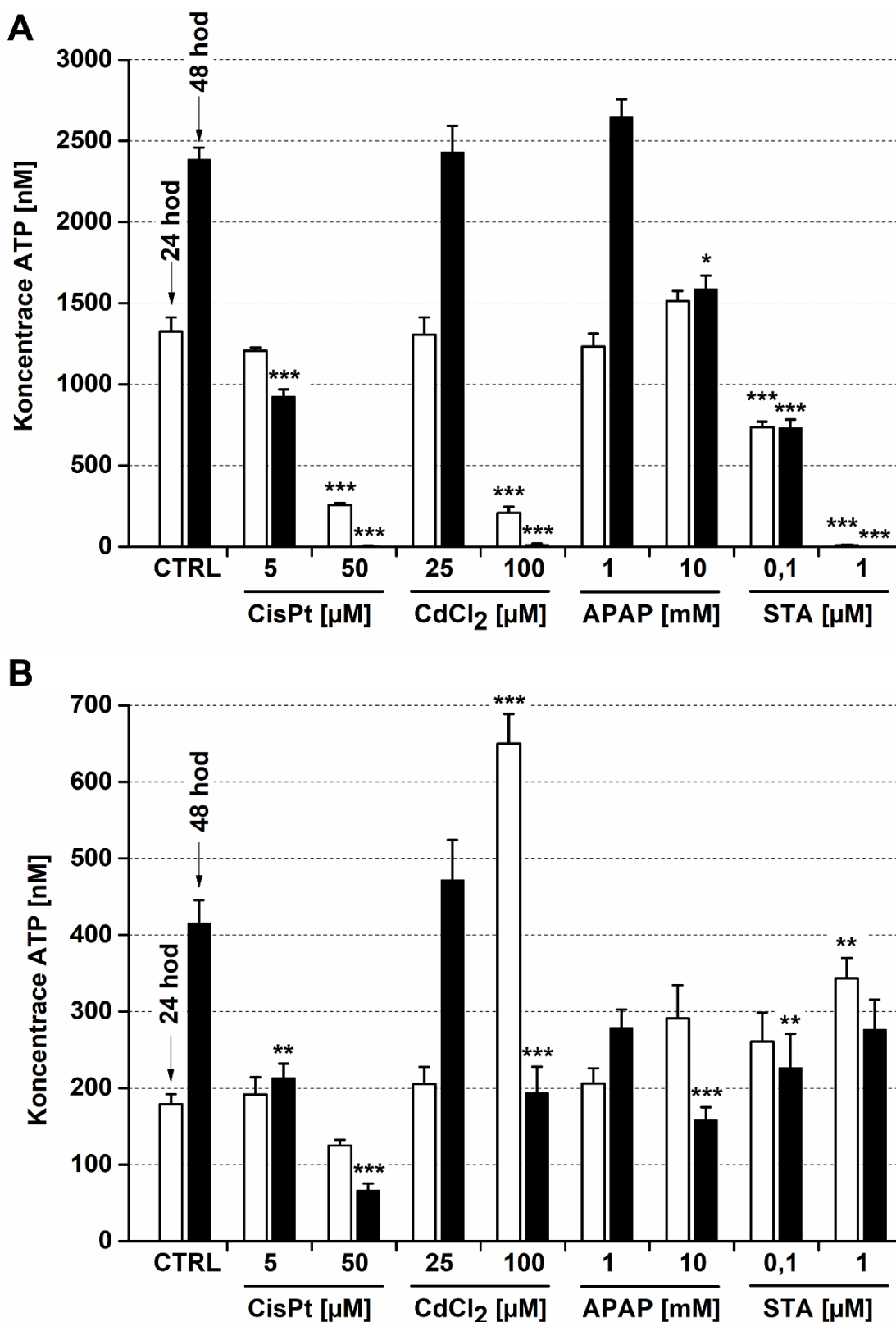
4. VÝSLEDKY

4.1 Testování cytotoxicity pomocí bioanalytických metod

4.1.1 Bioluminiscenční analýza intracelulární koncentrace ATP

Ke stanovení intracelulární koncentrace ATP po expozici buněk SH-SY5Y a A549 modelovými toxickými sloučeninami v časových intervalech 24 a 48 hod jsme použili bioluminiscenční analýzu. V porovnání s kontrolními buňkami pozorujeme po 48 hod inkubace s 5 μM CisPt u obou buněčných linií výrazné snížení intracelulární koncentrace ATP (graf 1A, B). U buněk SH-SY5Y inkubovaných s 50 μM CisPt, 100 μM CdCl₂ a 1 μM STA detekujeme po 24 hod signifikantní pokles intracelulární koncentrace ATP, který se v čase prohlubuje. U buněk SH-SY5Y inkubovaných s 0,1 μM STA po dobu 24 a 48 hod pozorujeme taktéž významné snížení intracelulární koncentrace ATP.

Ve srovnání s kontrolními buňkami pozorujeme po 48 hod inkubace buněk A549 s 50 μM CisPt šestinásobné snížení intracelulární koncentrace ATP. Po inkubaci buněk A549 se 100 μM CdCl₂ detekujeme téměř čtyřnásobné zvýšení intracelulární koncentrace ATP po 24 hod, naopak po 48 hod detekujeme snížení intracelulární koncentrace ATP. U buněk A549 inkubovaných 48 hod s 10 mM APAP a 0,1 μM STA pozorujeme výrazný pokles intracelulární koncentrace ATP. Po 24 hod inkubace buněk A549 s 1 μM STA pozorujeme dvojnásobné zvýšení intracelulární koncentrace ATP v porovnání s kontrolními buňkami.

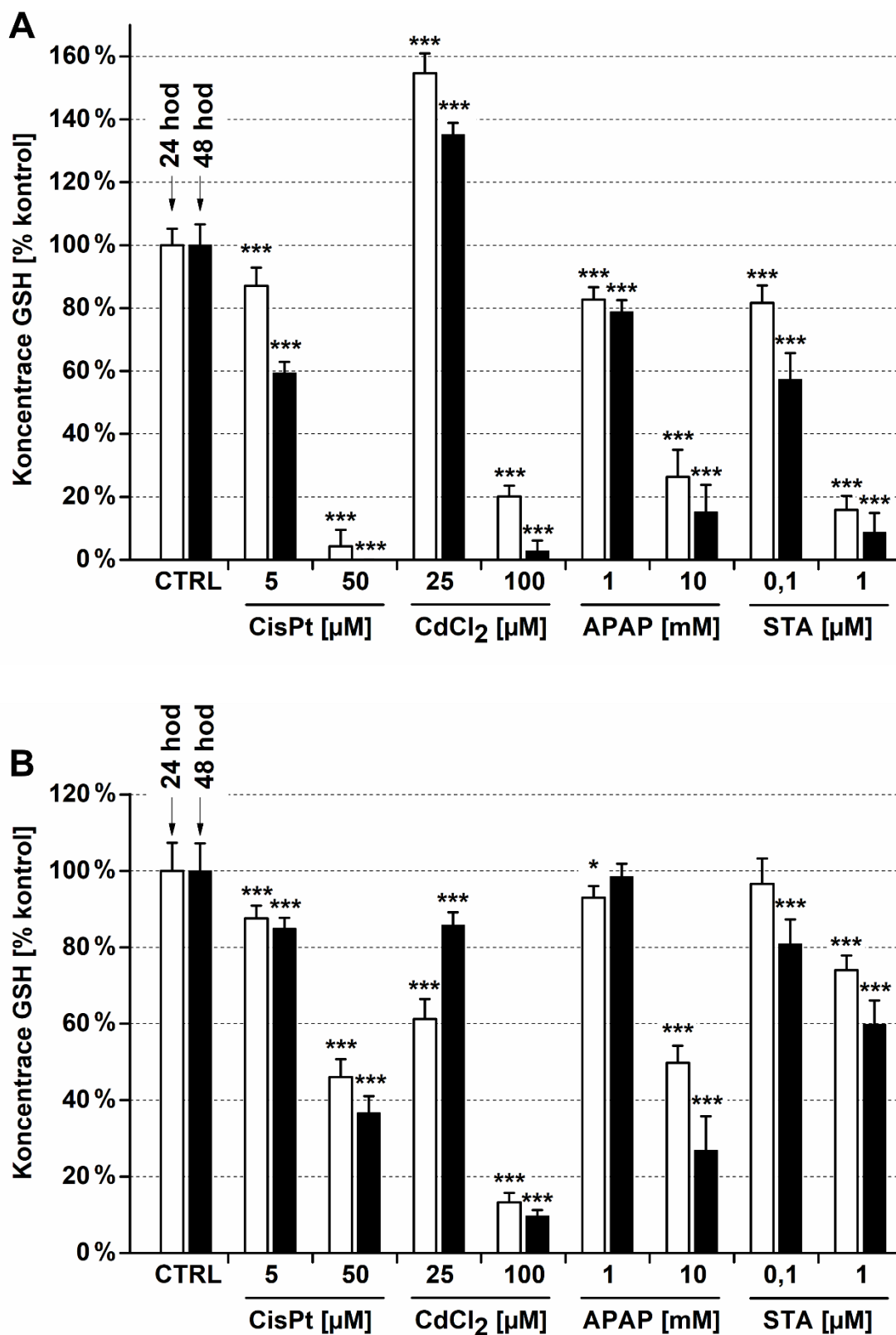


Graf 1: Vliv testovaných látek na koncentraci adenosintrifosfátu. **A)** SH-SY5Y buňky, **B)** A549 buňky. CTRL (= kontrolní buňky); CisPt (= cisplatina; 5 a 50 μM); CdCl₂ (25 a 100 μM); APAP (= acetaminofen; 1 a 10 mM); STA (= staurosporin; 0,1 a 1 μM); 24 a 48 hod. Průměr \pm SEM (n = 7-9; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$, vs. CTRL v daný časový interval).

4.1.2 Fluorimetrické stanovení koncentrace glutathionu

Ke fluorimetrickému stanovení intracelulární koncentrace GSH u buněk SH-SY5Y a A549 v časových intervalech 24 a 48 hod jsme použili fluorescenční sondu MCB. Po inkubaci buněk SH-SY5Y s 50 μM CisPt pozorujeme v porovnání s kontrolními buňkami signifikantní snížení koncentrace GSH o 96 % již po 24 hod inkubace, a po 48 hod inkubace buněk s testovanou látkou jsme již intracelulární GSH nedetekujeme (graf 2A). U buněk SH-SY5Y inkubovaných s 25 μM CdCl_2 pozorujeme v porovnání s kontrolními buňkami signifikantní zvýšení koncentrace GSH o 55 % po 24 hod a o 35 % po 48 hod. Po 24 hod inkubace buněk SH-SY5Y se 100 μM CdCl_2 , 10 mM APAP a 1 μM STA detekujeme taktéž výraznou depleci koncentrace GSH, která se v čase prohlubuje.

U buněk A549 inkubovaných s 50 μM CisPt, 100 μM CdCl_2 a 10 mM APAP 24 hod pozorujeme signifikantní depleci intracelulární koncentrace GSH, která se v čase zvyšuje (graf 2B). Po 24 hod inkubace buněk A549 s 25 μM CdCl_2 detekujeme v porovnání s kontrolními buňkami snížení intracelulární koncentrace GSH, nicméně po 48 hod inkubace v porovnání s 24hod inkubací buněk s 25 μM CdCl_2 pozorujeme vyšší intracelulární koncentraci GSH o 25 %. U buněk A549 inkubovaných s 5 μM CisPt a 1 μM STA taktéž detekujeme pokles intracelulární koncentrace GSH v obou časových intervalech.

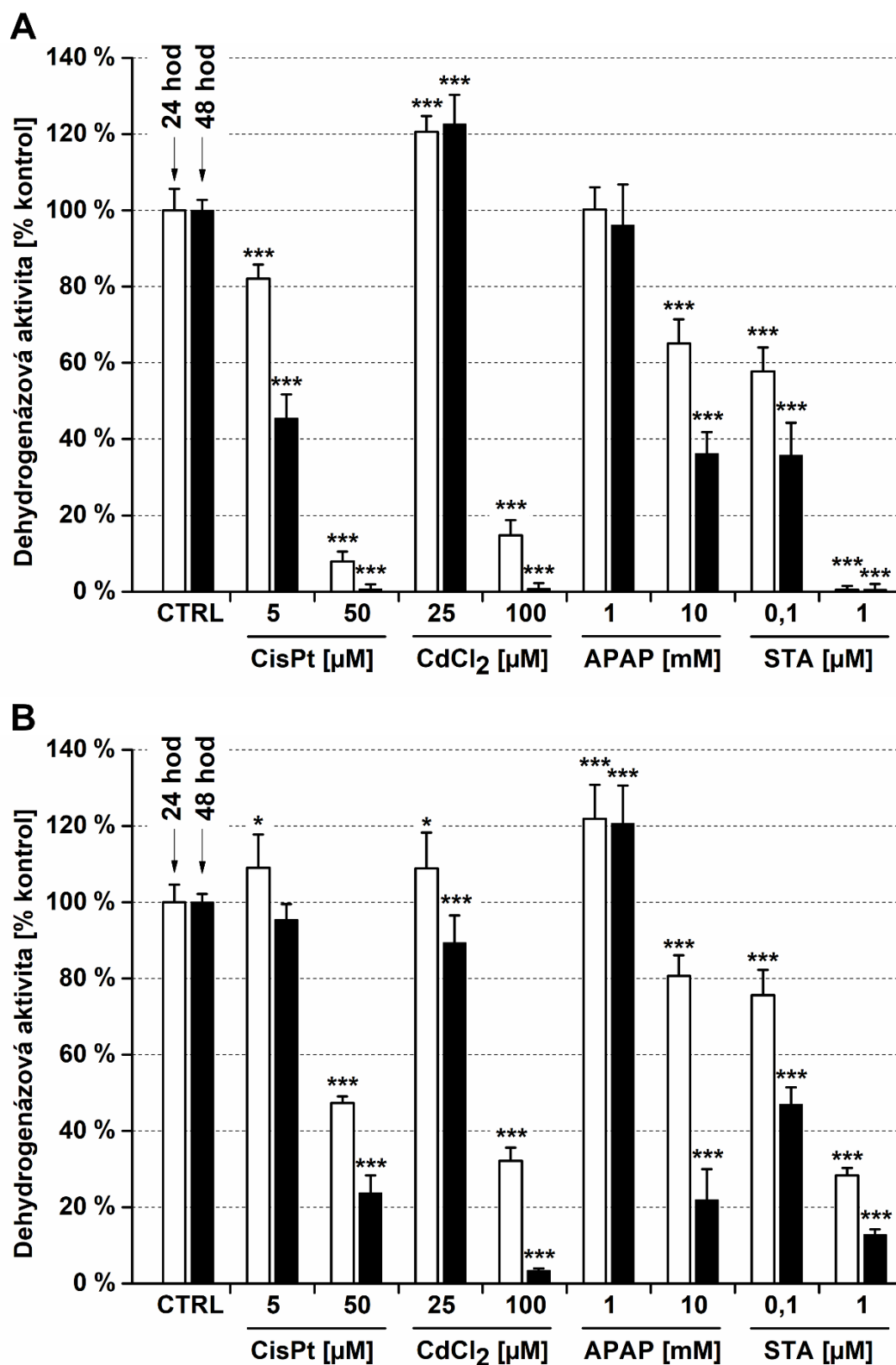


Graf 2: Vliv testovaných látek na koncentraci glutathionu. **A)** SH-SY5Y buňky, **B)** A549 buňky. CTRL (= kontrolní buňky); CisPt (= cisplatina; 5 a 50 μM); CdCl₂ (25 a 100 μM); APAP (= acetaminofen; 1 a 10 mM); STA (= staurosporin; 0,1 a 1 μM); 24 a 48 hod. Intracelulární koncentrace glutathionu vyjádřena jako % kontrolních buněk (= 100%); průměr \pm SD ($n = 10-18$; *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$, vs. CTRL v daný časový interval).

4.1.3 Detekce intracelulární dehydrogenázové aktivity

S použitím WST-1 testu jsme detekovali intracelulární dehydrogenázovou aktivitu buněk SH-SY5Y a A549 v časových intervalech 24 a 48 hod WST-1 testem. Detekovali jsme viabilitu buněk po expozici buněk modelovým toxickým látkám a hodnotili jsme jejich vliv v závislosti na jejich koncentraci a době inkubace. Z grafu 3A je patrné, že po 24 hod inkubace buněk SH-SY5Y s 50 μM CisPt a 100 μM CdCl_2 došlo k výrazné redukci dehydrogenázové aktivity, a po 48 hod inkubace buněk s testovanou látkou jsme již dehydrogenázovou aktivitu nedetekovali. Po inkubaci buněk SH-SY5Y s 25 μM CdCl_2 pozorujeme v porovnání s kontrolními buňkami signifikantní zvýšení dehydrogenázové aktivity o 21 % po 24 hod a o 23 % po 48 hod. U buněk SH-SY5Y inkubovaných s 1 μM STA jsme nedetekovali dehydrogenázovou aktivitu v žádném časovém intervalu. Po inkubaci buněk SH-SY5Y s 5 μM CisPt, 10 mM APAP a 0,1 μM STA pozorujeme také pokles dehydrogenázové aktivity v obou časových intervalech.

Po inkubaci buněk A549 s 50 μM CisPt, 100 μM CdCl_2 a 1 μM STA pozorujeme signifikantní pokles dehydrogenázové aktivity o více než 50 % v porovnání s kontrolními buňkami v obou časových intervalech (graf 3B). U buněk A549 inkubovaných s 1 mM APAP detekujeme v porovnání s kontrolními buňkami signifikantní nárůst dehydrogenázové aktivity o 22 % po 24hod inkubaci a o 21 % po 48hod inkubaci. Po 24 hod inkubace buněk A549 s 10 mM APAP a 0,1 μM STA zaznamenáváme pokles intracelulární dehydrogenázové aktivity, který se po 48 hod inkubace s toxickými látkami dále prohlubuje.

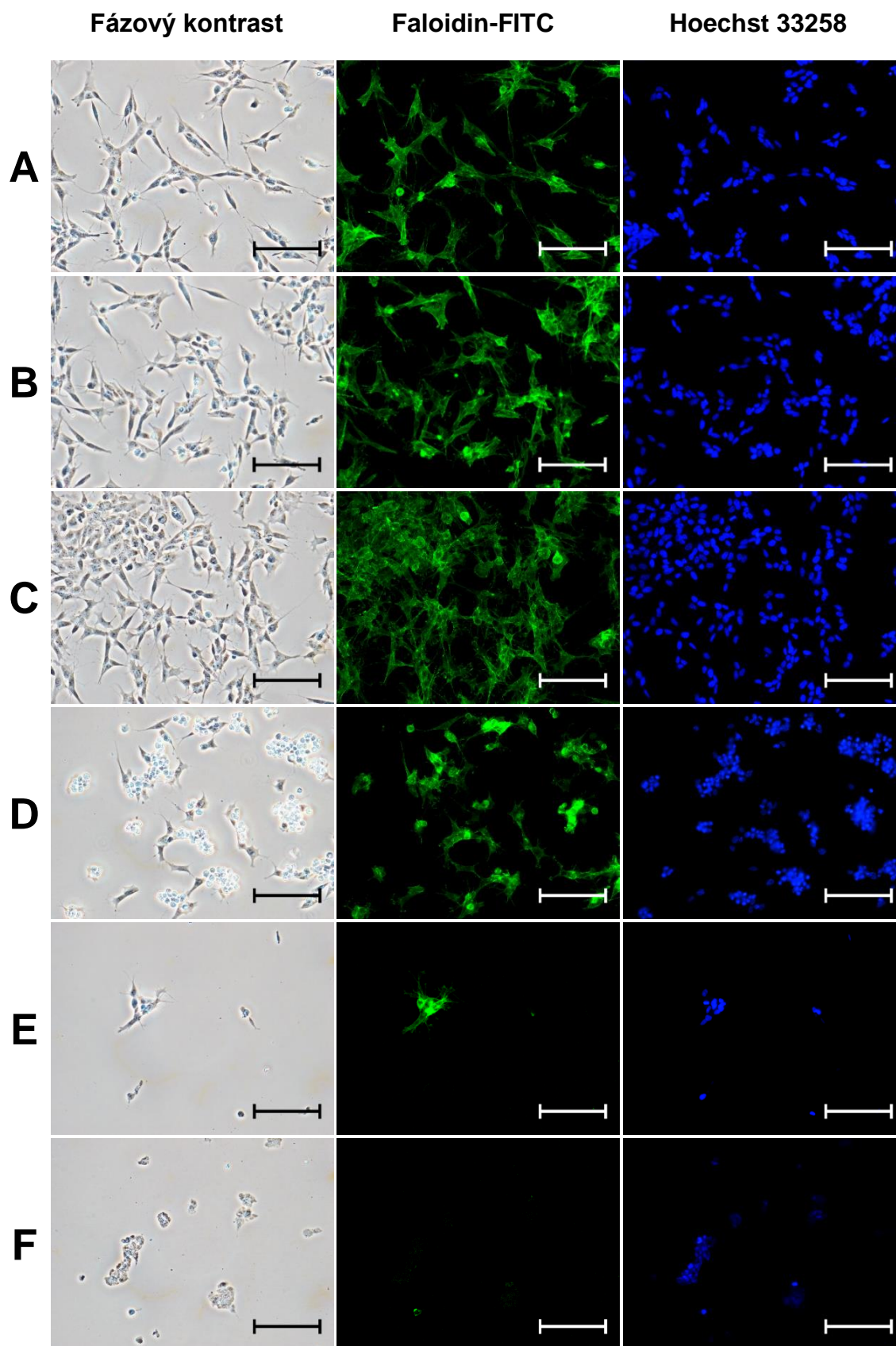


Graf 3: Vliv testovaných látek na dehydrogenázovou aktivitu. **A**) SH-SY5Y buňky, **B**) A549 buňky. CTRL (= kontrolní buňky); CisPt (= cisplatina; 5 a 50 μM); CdCl₂ (25 a 100 μM); APAP (= acetaminofen; 1 a 10 mM); STA (= staurosporin; 0,1 a 1 μM); 24 a 48 hod. Intracelulární dehydrogenázová aktivita vyjádřena jako % kontrolních buněk (= 100%); průměr \pm SD (n = 10-18; *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$, vs. CTRL v daný časový interval).

4.2 Detekce cytotoxicity s využitím fluorescenční mikroskopie

Pro posouzení morfologických změn buněk po 24hod inkubaci s testovanými látkami jsme zvolili buňky SH-SY5Y. Pro mikroskopickou analýzu jsme použili fluorescenční sondu Hoechst 33258, díky které jsme vizualizovali buněčná jádra, a fluorescenčně značený faloidin (faloidin-FITC), který nám umožnil vizualizovat aktinová vlákna.

Změny v morfologii buněk můžeme pozorovat po inkubaci buněk s 100 μM CdCl_2 (obrázek 13). U buněk se snížil jejich počet ve srovnání s kontrolními buňkami. Dochází ke zmenšení jader a kondenzaci chromatinu. Pomocí vizualizace buněčného cytoskeletu vidíme změnu tvaru buněk a ve fázovém kontrastu tzv. *blebbing* membrány buněk. U buněk inkubovaných s 25 μM CdCl_2 pozorujeme zmenšení buněk, změnu buněčného cytoskeletu, kondenzaci chromatinu a zvýšení počtu buněk. Toto zjištění koreluje s našimi výsledky WST-1 testu, kde jsme detekovali zvýšenou dehydrogenázovou aktivitu (graf 3A). U buněk inkubovaných s 1 mM APAP pozorujeme výrazné snížení jejich počtu, zmenšení jader a změnu tvaru buněk. Po inkubaci buněk s 0,1 μM STA dochází k výraznému snížení počtu buněk, zmenšení jader a vzniku apoptotických tělísek.



Obrázek 13: **Mikroskopická detekce vlivu vybraných látek na buňky SH-SY5Y.** Inkubace 24 hod. První sloupec: fázový kontrast; druhý sloupec: sonda faloidin-FITC; třetí sloupec: sonda Hoechst 33258. A) kontrolní buňky; B) cisplatina (5 μM); C) CdCl_2 (25 μM); D) CdCl_2 (100 μM); E) acetaminofen (1 mM); F) staurosporin (0,1 μM). Zvětšení 200x. Měřítka 100 μm .

4.3 Proteinová exprese HSP

Expresi proteinů jsme analyzovali pomocí metody *Simple Western*. K testování změn proteinové exprese jsme použili buňky SH-SY5Y inkubované 24 hod s vybranými toxickými sloučeninami. Po lyzi buněk jsme stanovili koncentraci proteinů metodou dle Bradfordové a pro analýzu metodou SW jsme lyzáty buněk SH-SY5Y naředili na výslednou koncentraci 0,4 mg/mL proteinů ve vzorku. Hodnotili jsme expresi proteinů HSP90, HSP70, HSP60, HSP27 a naměřené hodnoty jsme vztahovali k referenčnímu proteinu β -aktinu. Výsledky uvedené v tabulce 2 jsou prezentovány jako podíl plochy píku proteinu zájmu ku ploše píku referenčního proteinu β -aktinu.

V porovnání s kontrolními buňkami pozorujeme snížení exprese HSP90 po inkubaci buněk se všemi testovanými látkami. U buněk inkubovaných s 5 μ M CisPt a 100 μ M CdCl₂ detekujeme zvýšení exprese HSP70 a u buněk inkubovaných s 25 μ M CdCl₂ snížení exprese HSP70. Po inkubaci buněk s 5 μ M CisPt, 1 mM APAP, 100 μ M CdCl₂ a 0,1 μ M STA pozorujeme zvýšení exprese HSP60 a snížení exprese HSP60 u buněk inkubovaných s 25 μ M CdCl₂. U buněk inkubovaných s 5 μ M CisPt, 1 mM APAP, 100 μ M CdCl₂ a 0,1 μ M STA detekujeme snížení exprese HSP27 a u buněk inkubovaných s 25 μ M CdCl₂ zvýšení exprese HSP27.

Tabulka 2: **Vliv vybraných látek na exprese proteinů buněk SH-SY5Y.** CTRL (= kontrolní buňky); CisPt (= cisplatina); APAP (= acetaminofen); STA (= staurosporin); 24 hod. Výsledky prezentované jako podíl plochy píku proteinu ku ploše píku β -aktinu; LOD (= pod limitem detekce, výška píku menší než 1000 chemiluminiscenčních jednotek).

Toxické látky	HSP90	HSP70	HSP60	HSP27
CTRL	23,05	0,98	6,45	87,89
5 μM CisPt	11,21	1,47	6,51	87,70
1 mM APAP	10,88	< LOD	9,54	82,28
25 μM CdCl₂	7,58	0,41	6,37	93,49
100 μM CdCl₂	5,53	2,26	7,91	71,12
0,1 μM STA	4,18	< LOD	6,87	79,47

5. DISKUZE

Metabolismus buněk může být ovlivněn různými látkami, např. CisPt, CdCl₂, APAP nebo STA, které jsme využili v naší práci jako modelové toxické látky. Pro stanovení buněčné toxicity jsme zvolili buněčnou linii lidského neuroblastomu SH-SY5Y, která je široce používanou linií ve studiích cytotoxicity, oxidačního stresu a neurodegenerativních onemocnění (Krishna *et al.*, 2014; Arciello *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2007). Jako druhou buněčnou linii jsme použili buňky lidského adenokarcinomu plic A549, které se hojně využívají při studiích léčby rakoviny plic (Yin *et al.*, 2004; Seong *et al.*, 2014).

První testovanou toxickou látkou byla CisPt, která je jedním z nepoužívanějších chemoterapeutik. Atom Pt se kovalentně váže na sedmý dusík purinů a vznikají DNA adukty. Nejprve dochází ke zvýšené expresi proteinu p53, a poté k inhibici replikace a transkripce, zástavě buněčného cyklu a k aktivaci reparačních drah. To, jak buňky reagují na poškození DNA vyvolané CisPt, hraje hlavní roli v konečném rozhodnutí, jestli dojde k indukci apoptózy nebo přežití buňky (Yimit *et al.*, 2019).

Druhous testovanou toxickou látkou byl CdCl₂. Po expozici kadmia dochází ke zvýšené produkci ROS, což způsobuje oxidační stres, který má za následek poškození DNA, proteinů nebo fosfolipidů buněčných membrán. Oxidační stres dále způsobuje mitochondriální dysfunkci, narušuje oxidativní fosforylaci, snižuje syntézu ATP a mitochondriální membránový potenciál. Tento toxický kov nepříznivě ovlivňuje proliferaci a diferenciaci buněk, čímž přispívá k jejich apoptóze a nekróze (Genchi *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2021).

Třetí testovanou toxickou látkou byl APAP. Acetaminofen je jedním z nejčastěji používaných analgetik a antipyretik. Využívá se jako modelový hepatotoxin ke studiu mechanismů chemického poškození buněk. Vysoké dávky APAP mohou způsobit depleci GSH, která může být spojena se zvyšujícím se oxidačním stresem, který vede k mitochondriální dysfunkci, poruše syntézy ATP, a nakonec k buněčné smrti (Yoon *et al.*, 2016; Moyer *et al.*, 2011).

Poslední testovanou toxickou látkou byl STA. Staurosporin, bakteriální alkaloid, je považován za silný inhibitor proteinkináz v buňkách. Používá se jako induktor apoptózy v různých buněčných liniích. Staurosporin indukuje uvolnění cytochromu c z mitochondrií, ztrátu mitochondriálního membránového potenciálu, aktivaci kaspáz

a akumulaci ROS, což v konečném důsledku může vést k apoptotické smrti (Gil *et al.*, 2003; Feng *et al.*, 2002).

Adenosintrifosfát je základním zdrojem energie ve všech živých organismech. Vedle jeho hlavní role v bioenergetice buňky se podílí na regulaci buněčné smrti a přenosu nervových vzruchů v synapsi. Stanovení koncentrace ATP se mimo jiné používá k hodnocení míry proliferace buněk a cytotoxicity. Koncentrace ATP se rychle snižuje při poškození buňky nebo její smrti (Yang *et al.*, 2002). Mezi programované typy buněčné smrti patří např. apoptóza. Jedná se o vysoce regulovaný proces zahrnující řadu kroků závislých na ATP, např. aktivaci kaspáz, enzymatickou hydrolyzu makromolekul, kondenzaci chromatinu, *blebbing* membrány buněk a tvorbu apoptotických tělísek. Intracelulární koncentrace ATP určuje, zda buňka vstoupí do apoptotické nebo nekrotické smrti (Zamaraeva *et al.*, 2005). Vzhledem ke změnám koncentrace ATP při oxidačním stresu jsme se rozhodli detekovat koncentrace ATP po vystavení buněk toxickým sloučeninám.

V naší diplomové práci jsme se zaměřili na optimalizaci přípravy biologického materiálu a bioluminiscenční analýzy pro detekci intracelulární koncentrace ATP v buňkách po působení modelových toxických sloučenin. Bioluminiscenční analýza, při které dochází k redukci substrátu D-luciferinu na oxyluciferin za katalýzy luciferázy světlušek, je nejpoužívanější metodou díky své vysoké senzitivitě a specifitě (Yang *et al.*, 2002).

U buněk SH-SY5Y a A549 jsme pozorovali již u koncentrace 5 μM CisPt snížení intracelulární koncentrace ATP po 48hod inkubaci. Koncentrace ATP nadále klesala v čase po inkubaci buněk s 50 μM CisPt. Buňky SH-SY5Y byly citlivější na zvyšující se koncentraci CisPt než buňky A549. Toto zjištění se shoduje s výsledky studie (An *et al.* 2016), kde autoři prokázali snížení koncentrace ATP pomocí luminiscenční metody po inkubaci trojrozměrných sféroidních buněčných linií SH-SY5Y a A549 s 50-250 μM CisPt po dobu 24, 96 a 168 hod. Dále naše výsledky korelují se studií Huang *et al.* (2003), ve které autoři detekovali snížení koncentrace ATP v čase pomocí fosfor-31 nukleární magnetické rezonance u buněk A549 inkubovaných s 30 μM CisPt 24 a 48 hod.

U buněk SH-SY5Y jsme po inkubaci s 25 μM CdCl_2 nezaznamenali výrazné rozdíly v koncentraci ATP v žádném časovém intervalu. Avšak po inkubaci buněk SH-SY5Y se 100 μM CdCl_2 jsme detekovali signifikantní pokles intracelulární koncentrace ATP v obou časových intervalech. Naše výsledky nekorelují s výsledky

studie López *et al.* (2006), ve které autoři použili krysí kortikální neurony inkubované 24 hod s 100 nM-100 μM CdCl_2 . Pomocí bioluminiscenční analýzy zaznamenali výrazné snížení intracelulární koncentrace ATP již při 10 μM CdCl_2 . Rozdíly mohou být způsobeny použitím jiných typů buněk. U buněk A549 inkubovaných se 100 μM CdCl_2 jsme zaznamenali signifikantní nárůst koncentrace ATP po 24 hod, ale po 48hod inkubaci se koncentrace ATP výrazně snížila. Naše výsledky nekorelují s výsledky studie Kimura *et al.* (2019), kde autoři detekovali s využitím bioluminiscenční analýzy snížení koncentrace ATP závislé na různé koncentraci CdCl_2 (10-80 μM) u buněk A549.

Po inkubaci buněk SH-SY5Y s 1 a 10 mM APAP jsme nezaznamenali výrazný účinek látky na změnu koncentrace ATP v žádném z časových intervalů. U buněčné linie A549 jsme pozorovali snížení koncentrace ATP až u 10 mM APAP po 48hod inkubaci. Ve studii Mannerstrom *et al.* (2006) sledovali vliv různých koncentrací APAP (1-10 mM) na buňky SH-SY5Y a HepG2. S využitím bioluminiscenční analýzy detekovali zvýšenou koncentraci ATP po 24hod inkubaci buněk SH-SY5Y s 1 mM APAP, ostatní koncentrace neměli žádný účinek. Naopak u buněk HepG2 se koncentrace ATP snížila po 24hod inkubaci s 10 mM APAP.

U buněk SH-SY5Y inkubovaných s 0,1 a 1 μM STA jsme detekovali signifikantní pokles intracelulární koncentrace ATP v závislosti na dávce a časovém intervalu. Toto zjištění koreluje s výsledky studie Yuste *et al.* (2002), kde s využitím bioluminiscenční analýzy zaznamenali stejně klesající trend koncentrace ATP u buněk SH-SY5Y inkubovaných s 100 a 500 nM STA 24 hod. Snížená koncentrace ATP indukuje zvýšenou cytotoxicitu. U buněk A549 jsme po 48hod inkubaci s 0,1 μM STA pozorovali pokles intracelulární koncentrace ATP. Po 24hod inkubaci buněk A549 s 1 μM STA jsme zaznamenali nárůst koncentrace ATP, která v čase začala klesat.

Pro popis změn metabolismu buněk jsme zvolili další metody, např. stanovení GSH, WST-1 test, fluorescenční mikroskopii a metodu *Simple Western* pro analýzu proteinové exprese.

V naší diplomové práci jsme koncentraci GSH stanovovali fluorimetricky s využitím optimalizovaného MCB testu (Čapek *et al.*, 2017). Deplece GSH je časným charakteristickým znakem progresu buněčné smrti v reakci na různé apoptotické stimuly v mnoha typech buněk (Franco *et al.*, 2009).

U obou buněčných linií inkubovaných s 5 a 50 μM CisPt 24 a 48 hod jsme detekovali signifikantní depleci intracelulární koncentrace GSH v závislosti na dávce

testované látky a čase inkubace. Buňky SH-SY5Y vykazovaly vyšší citlivost na působení toxické látky než buňky A549. Naše výsledky korelují se studií (Altun *et al.*, 2010), ve které autoři detekovali s použitím kolorimetrické analýzy depleci koncentrace GSH u buněk SH-SY5Y inkubovaných s 7,5 μM CisPt 24 hod. V souladu s našimi výsledky je také studie Lan *et al.*, (2018), kde autoři použili buňky A549 inkubované s 10 $\mu\text{g/mL}$ CisPt 48 hod a imunohistochemickou analýzu.

Buňky SH-SY5Y jsme inkubovali s 25 a 100 μM CdCl_2 po dobu 24 a 48 hod. Zatímco po inkubaci buněk s 25 μM CdCl_2 došlo k výraznému zvýšení koncentrace GSH v obou časových intervalech, u 100 μM CdCl_2 jsme detekovali signifikantní depleci. Naše výsledky nekorelují se studií Bovio *et al.* (2021), ve které autoři použili buňky SH-SY5Y inkubované s 10 a 20 μM CdCl_2 24 hod. Pokles koncentrace GSH detekovali spektrofotometricky pomocí Ellmanova činidla již při 10 μM CdCl_2 , zatímco v našich experimentech jsme koncentrace GSH detekovali pomocí MCB testu. U buněk A549 inkubovaných s 25 μM CdCl_2 24 hod jsme zaznamenali snížení koncentrace GSH v porovnání s kontrolními buňkami, nicméně po 48hod inkubaci v porovnání s 24hod inkubací buněk s 25 μM CdCl_2 jsme pozorovali vyšší intracelulární koncentraci GSH o 25 %. A po inkubaci buněk A549 s 100 μM CdCl_2 jsme zaznamenali pokles koncentrace GSH v závislosti čase inkubace. Toto zjištění koreluje s výsledky studie Sauvageau *et al.* (2013), ve které autoři spektrofluorimetricky s využitím *o*-ftalaldehydu detekovali snížení koncentrace GSH u buněk A549 inkubovaných s 20 μM CdCl_2 v časovém intervalu 24 hod.

Po 24 a 48 hod inkubace obou buněčných liniích s 1 a 10 mM APAP jsme pozorovali snížení intracelulární koncentrace GSH v závislosti na dávce testované látky a čase inkubace. Naše výsledky se shodují se studií Gai *et al.* (2020), kde autoři s využitím spektrofotometrie detekovali pokles intracelulární koncentrace GSH u buněk A549 inkubovaných s 160 μM APAP v časovém intervalu 24 hod.

U obou buněčných linií inkubovaných s 0,1 a 1 μM STA jsme taktéž zaznamenali depleci koncentrace GSH v závislosti na dávce testované látky a čase inkubace. Buňky SH-SY5Y vykazovaly vyšší citlivost na působení toxické látky než buňky A549. Toto zjištění koreluje s výsledky studie Posadas *et al.* (2007), kde autoři zaznamenali spektrofotometricky pomocí Ellmanova činidla snížení koncentrace GSH po inkubaci buněk SH-SY5Y s 500 nM STA v časovém intervalu 18 hod.

K hodnocení buněčné viability buněk SH-SY5Y a A549 po působení modelových toxických látek jsme použili WST-1 test, který je rychlejší a citlivější než MTT test.

Použití MTT testu převažuje ve studiích nad WST-1 testem (Bovio *et al.*, 2021; Scarcello *et al.*, 2020; Donzelli *et al.*, 2004).

Obě buněčné linie SH-SY5Y a A549 jsme inkubovali s 5 a 50 μM CisPt v časovém intervalu 24 a 48 hod. Pozorovali jsme snížení buněčné viability způsobem závislým na dávce testované látky a časovém intervalu. Buňky SH-SY5Y vykazovali výraznější citlivost na působení CisPt než buňky A549. Stejně klesající trend buněčné viability zaznamenali pomocí MTT testu ve studii Donzelli *et al.* (2004), kde inkubovali buňky SH-SY5Y s 10-200 μM CisPt po dobu 24 hod. A taktéž ve studii Horibe *et al.* (2015) pomocí WST-1 testu u buněk A549 inkubovaných s 0,06, 1, 4, 16, 64 a 256 μM CisPt po 72 hod.

Buňky SH-SY5Y jsme inkubovali s 25 a 100 μM CdCl₂ po dobu 24 a 48 hod. Zatímco po inkubaci buněk s 25 μM CdCl₂ došlo ke zvýšení buněčné viability buněk v obou časových intervalech, u 100 μM CdCl₂ jsme detekovali výrazné snížení viability buněk. Naše výsledky jsou v rozporu se studií Bovio *et al.* (2021), ve které autoři u buněk SH-SY5Y inkubovaných s 1-200 μM CdCl₂ zaznamenali MTT testem snížení buněčné viability v závislosti na koncentraci CdCl₂ po 24 hod inkubace. Snížení viability buněk zaznamenali pomocí MTT testu, zatímco my jsme pro stanovení použili WST-1 test. Po inkubaci buněk A549 s 25 a 100 μM CdCl₂ jsme zaznamenali snížení viability buněk v závislosti na dávce a čase inkubace. Toto zjištění koreluje s výsledky studie Kimura *et al.* (2019), kde detekovali testem WST-8 taktéž snížení viability v závislosti na koncentraci CdCl₂ u buněk A549 inkubovaných s 10-80 μM CdCl₂ v časovém intervalu 24 hod.

Buňky SH-SY5Y jsme inkubovali s 1 a 10 mM APAP po dobu 24 a 48 hod. Snížení viability buněk jsme pozorovali až po inkubaci s 10 mM APAP. Naše výsledky jsou podpořeny studií Posadas *et al.* (2012), ve které autoři inkubovali buňky SH-SY5Y s 1 a 2 mM APAP 24, 48 a 72 hod. Snížení buněčné viability zaznamenali pomocí MTT testu až po inkubaci buněk s 2 mM APAP ve všech časových intervalech. V obou časových intervalech jsme u buněk A549 inkubovaných s 1 mM APAP pozorovali signifikantní zvýšení buněčné viability, ale při koncentraci 10 mM APAP došlo k jejímu výraznému snížení. Ve studii Lee *et al.* (2019) detekovali snížení buněčné viability v závislosti na čase inkubace a koncentraci APAP, i přestože autoři použili stejné buňky, test, koncentrace APAP a časové intervaly.

Obě buněčné linie jsme inkubovali s 0,1 a 1 μM STA po dobu 24 a 48 hod. Zaznamenali jsme snížení buněčné viability v závislosti na dávce STA a časovém

intervalu. Buňky SH-SY5Y byly výrazně citlivější na působení STA než buňky A549. Naše výsledky korelují s výsledky studie López *et al.* (2000), ve které zaznamenali pokles buněčné viability v čase s využitím MTT testu u buněk SH-SY5Y inkubovaných s 100 mM STA v 3-12 hod. Dále jsou naše výsledky v souladu se studií Wang *et al.* (2009), kde se snížila viabilita buněk způsobem závislým na koncentraci STA a čase inkubace. Autoři použili také MTT test a inkubovali buňky A549 s 1-10 nM STA v časovém intervalu 6, 12 a 24 hod.

K posouzení morfologických změn buněk SH-SY5Y po působení modelových toxických látek 24 hod pomocí fluorescenční mikroskopie jsme použili sondu Hoechst 33258 pro vizualizaci jader a fluorescenčně značený faloidin pro vizualizaci cytoskeletu.

Při pozorování buněk SH-SY5Y inkubovaných s 5 μM CisPt jsme nezaznamenali významné změny ve tvaru buňky, jen u některých jader byla vidět mírná kondenzace chromatinu. Naše výsledky korelují se studií Rathinam *et al.* (2015), ve které autoři použili fluorescenčně značený faloidin a sondu DAPI, kterou použili k vizualizaci buněčného cytoskeletu a jader buněk SH-SY5Y inkubovaných 24 hod s 5 μM CisPt.

U buněk SH-SY5Y inkubovaných s 25 μM CdCl₂ jsme pozorovali zvýšení počtu buněk, změnu buněčného cytoskeletu a kondenzaci chromatinu. Avšak po inkubaci s 100 μM CdCl₂ se výrazně snížil jejich počet. U buněk jsme pozorovali zmenšení jader, kondenzaci chromatinu a *blebbing* membrány buněk. Naše výsledky se shodují se studií Zhang *et al.* (2017), kde autoři použili buňky SH-SY5Y inkubované 24 hod s 10 a 20 μM CdCl₂. S využitím barvení DAPI pozorovali výraznou kondenzaci chromatinu. Dále naše výsledky korelují se studií Kim *et al.* (2013), ve které autoři s využitím barvení DAPI detekovali fragmentaci a kondenzaci jader u buněk SH-SY5Y inkubovaných s 25 μM CdCl₂ v časovém intervalu 12 hod.

U buněk SH-SY5Y inkubovaných s 1 mM APAP došlo k výraznému snížení jejich počtu, zmenšení jader a změnám tvaru buňky. Naše výsledky korelují se studií Bharathi *et al.* (2020), kde autoři použili barvení DAPI k vizualizaci buněčného jádra u buněk HepG2 inkubovaných s 20 mM APAP v časovém intervalu 24 hod.

Po inkubaci buněk SH-SY5Y s 0,1 μM STA jsme pozorovali signifikantní snížení jejich počtu, zmenšení jader a vznik apoptotických tělísek. Toto zjištění koreluje s výsledky studie Prego *et al.* (2006), ve které autoři použili sondu Hoechst 33258 a buňky SH-SY5Y inkubované s 25 nM STA po dobu 12 hod. Ve studii Kitamura *et al.*

(2003) pozorovali změny buněčného cytoskeletu pomocí faloidinu u buněk SH-SY5Y inkubovaných s 1 μM STA po 1 hod.

V naší diplomové práci jsme se rozhodli sledovat změnu exprese proteinů HSP90, HSP70, HSP60 a HSP27, které se mohou účastnit apoptózy a podílet se na ochraně před cytotoxickým poškozením (Qu *et al.*, 2015). K analýze proteinové exprese jsme použili metodu *Simple Western*, která nám umožnila semikvantitativní hodnocení exprese proteinů. Buňky SH-SY5Y jsme inkubovali 24 hod s 5 μM CisPt, 25 a 100 μM CdCl₂, 1 mM APAP a 0,1 μM STA. Vzhledem k tomu, že existuje málo studií zabývajících se expresí HSP proteinů na buňkách SH-SY5Y po působení námi použitých toxických látek, jsou dále diskutovány studie i na jiných buněčných liniích.

Protein HSP90 je nadměrně exprimován v rakovinných buňkách a podporuje progresi nádoru stabilizací onkogenních proteinů. Po inkubaci buněk SH-SY5Y se všemi modelovými toxickými látkami jsme detekovali snížení exprese HSP90. Naše výsledky korelují se studií Yang *et al.* (2021), ve které autoři použili buňky lidského osteosarkomu HSO a U2OS, které inkubovali s 12 μM CisPt po dobu 24 hod a k analýze proteinové exprese použili metodu Western blot.

Protein HSP70 inhibuje mitochondriální uvolňování cytochromu c a potlačuje tak apoptózu vyvolanou působením toxických látek. U buněk SH-SY5Y inkubovaných s 5 μM CisPt jsme detekovali zvýšení exprese HSP70. Naše výsledky korelují se studií Yang *et al.* (2012), kde autoři s využitím metody Western blot detekovali mírně zvýšenou expresi HSP70 u buněk rakoviny vaječníku OV2008 inkubovaných s 10 μM CisPt v časovém intervalu 24 hod. Stejně výsledky popsali také ve studii Tang *et al.* (2018), ve které autoři inkubovali buněčnou linii osteosarkomu MG63 s 5-50 μM CisPt po dobu 48 hod. U buněk SH-SY5Y inkubovaných s 100 μM CdCl₂ jsme detekovali zvýšení exprese HSP70 a u buněk inkubovaných s 25 μM CdCl₂ snížení exprese HSP70. Toto zjištění nekoreluje se studií Forcella *et al.* (2020), ve které u buněk SH-SY5Y inkubovaných s 10 a 20 μM CdCl₂ po dobu 48 hod detekovali zvýšenou expresi HSP70 v závislosti na dávce testované látky pomocí metody Western blot.

Zvýšená exprese HSP60 může nejen podporovat účinné skládání proteinů při stresu buňky, ale také vykazovat antiapoptotické účinky. Po inkubaci buněk SH-SY5Y s 5 μM CisPt, 1 mM APAP a 0,1 μM STA jsme zaznamenali zvýšení exprese HSP60. Naše výsledky korelují se studií Chen *et al.* (2021), kde autoři s využitím metody Western blot zaznamenali zvýšení exprese HSP60 po inkubaci buněčné linie rakoviny prsu MCF7 s 10-80 μM CisPt po dobu 48 hod. Po inkubaci buněk SH-SY5Y

s 100 μM CdCl_2 jsme pozorovali zvýšení exprese HSP60 a snížení exprese HSP60 u buněk inkubovaných s 25 μM CdCl_2 . Ve studii Cannino *et al.* (2008) s využitím Western blot analýzy detekovali snížení exprese HSP60 po inkubaci buněčné linie rakoviny prsu MDA-MB231 s 5 μM CdCl_2 24 hod, zatímco po inkubaci s 50 μM CdCl_2 zaznamenali zvýšení exprese HSP60. Toto zjištění potvrzuje naše výsledky, že až při vyšších koncentracích CdCl_2 dochází k zvýšení exprese HSP60.

Protein HSP27 chrání buňku před oxidačním poškozením, agregací proteinů a apoptózou. Antiapoptotické účinky HSP27 mohou zvýšit odolnost rakovinových buněk. U buněk SH-SY5Y inkubovaných s 100 μM CdCl_2 jsme zaznamenali snížení exprese HSP27, naopak u buněk inkubovaných s 25 μM CdCl_2 zvýšení exprese HSP27. Snížení exprese HSP27 zaznamenali s využitím Western blotu i ve studii Alvarez-Olmedo *et al.* (2017). Buňky HeLa inkubovali s 100 μM CdCl_2 po dobu 3-24 hod. U buněk SH-SY5Y inkubovaných s 5 μM CisPt, 1 mM APAP a 0,1 μM STA jsme detekovali snížení exprese HSP27. Výsledky nekorelují se studií Lu *et al.* (2016), při které autoři detekovali zvýšené hladiny HSP27 pomocí Western blot analýzy u buněk rakoviny vaječníku OV2008 inkubovaných s 5-40 μM CisPt v časovém intervalu 48 hod.

6. ZÁVĚR

Cílem diplomové práce byla optimalizace přípravy buněčného materiálu a luminiscenční metody pro detekci koncentrace ATP a zavedené metody použít k detekci intracelulární koncentrace ATP po působení modelových toxických látek v buňkách. K doplnění popisu změn energetického metabolismu u testovaných buněk po inkubaci s modelovými látkami jsme použili bioanalytické a mikroskopické metody. Dále jsme s využitím metody *Simple Western* stanovovali změnu exprese HSP proteinů. K testování jsme použili buněčnou linii lidského neuroblastomu SH-SY5Y a buněčnou linii lidského adenokarcinomu A549, které jsme inkubovali s 5 a 50 μM CisPt, 25 a 100 μM CdCl₂, 1 a 10 mM APAP a 0,1 a 1 μM STA ve dvou časových intervalech.

U buněk SH-SY5Y jsme zaznamenali největší cytotoxicitu u 50 μM CisPt, 100 CdCl₂ a 1 μM STA. U buněk A549 jsme detekovali největší cytotoxicitu také u 50 μM CisPt, 100 CdCl₂ a 1 μM STA. Ale i 10 mM APAP vykazoval výraznou cytotoxicitu. Buňky SH-SY5Y vykazovaly oproti buňkám A549 vyšší citlivost na testované látky.

V poslední části práce jsme stanovovali změnu exprese proteinů HSP90, HSP70, HSP60 a HSP27 po působení modelových toxických látek u buněk SH-SY5Y v inkubačním intervalu 24 hod. Žádné významné změny v expresi HSP proteinů nebyly detekovány.

Závěrem lze shrnout, že poklesu intracelulární koncentrace ATP předchází snížení dehydrogenázové aktivity a snížení intracelulární koncentrace GSH. Sledování exprese HSP proteinů se nepotvrdilo jako vhodný marker buněčného poškození.

7. POUŽITÁ LITERATURA

1. ALBAKOVA, Z., G. A. ARMEEV, L. M. KANEVSKIY, *et al.* HSP70 Multi-Functionality in Cancer. *Cells*. 2020, **9**, 1-26.
2. ALTUN, Z. S., D. GÜNEŞ, S. AKTAŞ, *et al.* Protective Effects of Acetyl-L-Carnitine on Cisplatin Cytotoxicity and Oxidative Stress in Neuroblastoma. *Neurochemical Research*. 2010, **35**, 437-443.
3. ALVAREZ-OLMEDO, D. G., V. S. BIAGGIO, G. A. KOUMBADINGA, *et al.* Recombinant heat shock protein 27 (HSP27/HSPB1) protects against cadmium-induced oxidative stress and toxicity in human cervical cancer cells. *Cell Stress and Chaperones*. 2017, **22**, 357-369.
4. AN, Seong S. A., O. W. SEO, J. LEE, *et al.* Real-time monitoring of cisplatin cytotoxicity on three-dimensional spheroid tumor cells. *Drug Design, Development and Therapy*. 2016, **10**, 2155-2165.
5. ARCIELLO, M., G. ROTILIO a L. ROSSI. Copper-dependent toxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells involves mitochondrial damage. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005, **327**, 454-459.
6. ARRIGO, A. Mammalian HspB1 (Hsp27) is a molecular sensor linked to the physiology and environment of the cell. *Cell Stress and Chaperones*. 2017, **22**, 517-529.
7. ARRIGO, A., S. SIMON, B. GIBERT, *et al.* Hsp27 (HspB1) and α B-crystallin (HspB5) as therapeutic targets. *FEBS Letters*. 2007, **581**, 3665-3674.
8. AYDIN, S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*. 2015, **72**, 4-15.
9. BABBITT, S. E., M. C. SUTHERLAND, B. S. FRANCISCO, *et al.* Mitochondrial cytochrome c biogenesis: no longer an enigma. *Trends in Biochemical Sciences*. 2015, **40**, 446-455.
10. BASS, J. J., D. J. WILKINSON, D. RANKIN, *et al.* An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*. 2017, **27**(1), 4-25.
11. BHARATHI, M. J. a P. ARULSELVAN. Protective effects of NAT-CLWTM on acetaminophen-induced oxidative stress-mediated apoptosis in hepatic HepG2 cells. *Australian Journal of Science and Technology*. 2020, **4**, 207-214.

12. BOVIO, F., P. MELCHIORETTO, M. FORCELLA, *et al.* Cadmium promotes glycolysis upregulation and glutamine dependency in human neuronal cells. *Neurochemistry International*. 2021, **149**, 1-11.
13. BRATIC, A. a N. LARSSON. The role of mitochondria in aging. *Journal of Clinical Investigation*. 2013, **123**, 951-957.
14. BRIDGES, H. R., J. G. FEDOR, J. N. BLAZA, *et al.* Structure of inhibitor-bound mammalian complex I. *Nature Communications*. 2020, **11**, 1-11.
15. CALLEGARI, S., T. MÜLLER, C. SCHULZ, *et al.* A MICOS–TIM22 Association Promotes Carrier Import into Human Mitochondria. *Journal of Molecular Biology*. 2019, **431**, 2835-2851.
16. CANNINO, G., E. FERRUGGIA, C. LUPARELLO, *et al.* Effects of cadmium chloride on some mitochondria-related activity and gene expression of human MDA-MB231 breast tumor cells. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2008, **102**, 1668-1676.
17. CARUANA, N. J. a D. A. STROUD. The road to the structure of the mitochondrial respiratory chain supercomplex. *Biochemical Society Transactions*. 2020, **48**, 621-629.
18. CERQUA, C., A. CASARIN, F. PIERREL, *et al.* Vitamin K2 cannot substitute Coenzyme Q10 as electron carrier in the mitochondrial respiratory chain of mammalian cells. *Scientific Reports*. 2019, **9**, 1-7.
19. ČAPEK, J., M. HAUSCHKE, L. BRŮČKOVÁ, *et al.* Comparison of glutathione levels measured using optimized monochlorobimane assay with those from ortho-phthalaldehyde assay in intact cells. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 2017, **88**, 40-45.
20. ČUNÁTOVÁ, K., D. PAJUELO REGUERA, J. HOUŠTĚK, *et al.* Role of cytochrome c oxidase nuclear-encoded subunits in health and disease. *Physiological Research*. 2020, **69**, 947-965.
21. DJAFARZADEH, S. a S. M. J. High-resolution Respirometry to Assess Mitochondrial Function in Permeabilized and Intact Cells. *Journal of Visualized Experiments*. 2017, **120**, 1-11.
22. DONZELLI, E., M. CARFÌ, M. MILOSO, *et al.* Neurotoxicity of Platinum Compounds: Comparison of the Effects of Cisplatin and Oxaliplatin on) the Human Neuroblastoma Cell Line SH-SY5Y. *Journal of Neuro-Oncology*. 2004, **67**, 65-73.

23. DRÖSE, S. Differential effects of complex II on mitochondrial ROS production and their relation to cardioprotective pre- and postconditioning. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2013, **1827**, 578-587.
24. ESSER, L., B. QUINN, Y. LI, *et al.* Crystallographic Studies of Quinol Oxidation Site Inhibitors: A Modified Classification of Inhibitors for the Cytochrome bc 1 Complex. *Journal of Molecular Biology*. 2004, **341**, 281-302.
25. FENG, G. a N. KAPLOWITZ. Mechanism of staurosporine-induced apoptosis in murine hepatocytes. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2002, **282**, G825-G834.
26. FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M. R., M. GRAGERA, L. OCHOA-IBARROLA, *et al.* Hsp70 – a master regulator in protein degradation. *FEBS Letters*. 2017, **591**, 2648-2660.
27. FORCELLA, M., P. LAU, M. OLDANI, *et al.* Neuronal specific and non-specific responses to cadmium possibly involved in neurodegeneration: A toxicogenomics study in a human neuronal cell model. *NeuroToxicology*. 2020, **76**, 162-173.
28. FRANCO, R. a J. A. CIDLOWSKI. Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant. *Cell Death & Differentiation*. 2009, **16**, 1303-1314.
29. GAI, C., M. YU, Z. LI, *et al.* Acetaminophen sensitizing erastin-induced ferroptosis via modulation of Nrf2/heme oxygenase-1 signaling pathway in non-small-cell lung cancer. *Journal of Cellular Physiology*. 2020, **235**, 3329-3339.
30. GAN, S. D. a K. R. PATEL. Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Investigative Dermatology*. 2013, **133**, 1-3.
31. GENCHI, G., M. S. SINICROPI, G. LAURIA, *et al.* The Effects of Cadmium Toxicity. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2020, **17**, 1-24.
32. GIL, J., S. ALMEIDA, C. R. OLIVEIRA, *et al.* Cytosolic and mitochondrial ROS in staurosporine-induced retinal cell apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine*. 2003, **35**, 1500-1514.
33. GNAIGER, E. Capacity of oxidative phosphorylation in human skeletal muscle. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2009, **41**, 1837-1845.

34. GREEN, D. R., L. GALLUZZI a G. KROEMER. Mitochondria and the Autophagy–Inflammation–Cell Death Axis in Organismal Aging. *Science*. 2011, **333**, 1109-1112.
35. GRIPARIC, L. a A. M. VAN DER BLIEK. The Many Shapes of Mitochondrial Membranes. *Traffic*. 2001, **2**, 235-244.
36. GUILLAUD, F., S. DRÖSE, A. KOWALD, *et al.* Superoxide production by cytochrome bc1 complex: A mathematical model. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2014, **1837**, 1643-1652.
37. HARRIS, V. M. Protein Detection by Simple Western™ Analysis. KURIEN, Biji T. a R. Hal SCOFIELD, ed. *Western Blotting*. New York, NY: Springer New York, 2015, s. 465-468. *Methods in Molecular Biology*. ISBN 978-1-4939-2693-0.
38. HE, J., H. C. FORD, J. CARROLL, *et al.* Persistence of the mitochondrial permeability transition in the absence of subunit c of human ATP synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017, **114**, 3409-3414.
39. HEINZ, S., A. FREYBERGER, B. LAWRENZ, *et al.* Mechanistic Investigations of the Mitochondrial Complex I Inhibitor Rotenone in the Context of Pharmacological and Safety Evaluation. *Scientific Reports*. 2017, **7**, 1-13.
40. HOCK, D. H., B. RELJIC, C. ANG, *et al.* HIGD2A is Required for Assembly of the COX3 Module of Human Mitochondrial Complex IV. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2020, **19**, 1145-1160.
41. HORIBE, S., A. MATSUDA, T. TANAHASHI, *et al.* Cisplatin resistance in human lung cancer cells is linked with dysregulation of cell cycle associated proteins. *Life Sciences*. 2015, **124**, 31-40.
42. HUANG, Y. a C. YEH. Functional Compartmentalization of HSP60-Survivin Interaction between Mitochondria and Cytosol in Cancer Cells. *Cells*. 2020, **9**, 1-12.
43. HUANG, Z., Y. TONG, J. WANG, *et al.* NMR studies of the relationship between the changes of membrane lipids and the cisplatin-resistance of A549/DDP cells. *Cancer Cell International*. 2003, **3**, 1-8.
44. HUTTER, E., H. UNTERLUGGAUER, A. GAREDEW, *et al.* High-resolution respirometry—a modern tool in aging research. *Experimental Gerontology*. 2006, **41**(1), 103-109.

45. CHEN, H., D. ZHANG, Z. ZHANG, *et al.* SIRT3-mediated mitochondrial unfolded protein response weakens breast cancer sensitivity to cisplatin. *Genes & Genomics*. 2021, **43**, 1433-1444.
46. CHEN, J., M. R. HELDMAN, M. A. HERRMANN, *et al.* Absolute quantitation of endogenous proteins with precision and accuracy using a capillary Western system. *Analytical Biochemistry*. 2013, **442**, 97-103.
47. CHERTKOVA, R. V., N. A. BRAZHE, T. V. BRYANTSEVA, *et al.* New insight into the mechanism of mitochondrial cytochrome c function. *PLOS ONE*. 2017, **12**, 1-20.
48. IMAMURA, H., K. P. HUYNH NHAT, H. TOGAWA, *et al.* Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009, **106**, 15651-15656.
49. IMAMURA, H., S. SAKAMOTO, T. YOSHIDA, *et al.* Single-cell dynamics of pannexin-1-facilitated programmed ATP loss during apoptosis. *ELife*. 2020, **9**, 1-20.
50. ISHIDA, R., T. OKAMOTO, F. MOTOJIMA, *et al.* Physicochemical Properties of the Mammalian Molecular Chaperone HSP60. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018, **19**, 1-16.
51. JENSEN, E. C. The Basics of Western Blotting. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*. 2012, **295**, 369-371.
52. KAMENCIC, H., A. LYON, P. G. PATERSON, *et al.* Monochlorobimane Fluorometric Method to Measure Tissue Glutathione. *Analytical Biochemistry*. 2000, **286**, 35-37.
53. KIM, S., H. CHEON, S. KIM, *et al.* Cadmium induces neuronal cell death through reactive oxygen species activated by GADD153. *BMC Cell Biology*. 2013, **14**, 1-9.
54. KIMURA, K., Y. NAKANO, T. SUGIZAKI, *et al.* Protective effect of polaprezinc on cadmium-induced injury of lung epithelium. *Metallomics*. 2019, **11**, 1310-1320.
55. KITAMURA, Y., D. TSUCHIYA, K. TAKATA, *et al.* Possible involvement of Wiskott–Aldrich syndrome protein family in aberrant neuronal sprouting in Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*. 2003, **346**, 149-152.

56. KOVÁŘOVÁ, N., T. MRÁČEK, H. NŮSKOVÁ, *et al.* High Molecular Weight Forms of Mammalian Respiratory Chain Complex II. *PLoS ONE*. 2013, **8**, 1-13.
57. KRISHNA, A., M. BIRYUKOV, C. TREFOIS, *et al.* Systems genomics evaluation of the SH-SY5Y neuroblastoma cell line as a model for Parkinson's disease. *BMC Genomics*. 2014, **15**, 1-21.
58. KUMAR, S., J. STOKES, U. P. SINGH, *et al.* Targeting Hsp70: A possible therapy for cancer. *Cancer Letters*. 2016, **374**, 156-166.
59. LAN, D., L. WANG, R. HE, *et al.* Exogenous glutathione contributes to cisplatin resistance in lung cancer A549 cells. *American journal of translational research*. 2018, **10**, 1295-1309.
60. LANZA, I. R. a K. S. NAIR. Mitochondrial metabolic function assessed in vivo and in vitro. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. 2010, **13**, 511-517.
61. LAROSA, V. a C. REMACLE. Insights into the respiratory chain and oxidative stress. *Bioscience Reports*. 2018, **38**, 1-14.
62. LEAVESLEY, H. B., L. LI, S. MUKHOPADHYAY, *et al.* Nitrite-Mediated Antagonism of Cyanide Inhibition of Cytochrome c Oxidase in Dopamine Neurons. *Toxicological Sciences*. 2010, **115**, 569-576.
63. LEE, M. K., S. J. KANG, M. PONCZ, *et al.* Resveratrol protects SH-SY5Y neuroblastoma cells from apoptosis induced by dopamine. *Experimental & Molecular Medicine*. 2007, **39**, 376-384.
64. LEE, S., J. S. PARK a K. KIM. Improving Combination Cancer Therapy by Acetaminophen and Romidepsin in Non-small Cell Lung Cancer Cells. *Biomedical Science Letters*. 2019, **25**, 293-301.
65. LOMAKINA, G. Y., Y. A. MODESTOVA a N. N. UGAROVA. Bioluminescence assay for cell viability. *Biochemistry (Moscow)*. 2015, **80**, 701-713.
66. LÓPEZ, E. a I. FERRER. Staurosporine- and H-7-induced cell death in-SH-SY5Y neuroblastoma cells is associated with caspase-2 and caspase-3 activation, but not with activation of the FAS/FAS-L-caspase-8 signaling pathway. *Molecular Brain Research*. 2000, **85**, 61-67.
67. LÓPEZ, E., C. ARCE, M.J. OSET-GASQUE, *et al.* Cadmium induces reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in cortical neurons in culture. *Free Radical Biology and Medicine*. 2006, **40**, 940-951.

68. LU, H., C. SUN, T. ZHOU, *et al.* HSP27 Knockdown Increases Cytoplasmic p21 and Cisplatin Sensitivity in Ovarian Carcinoma Cells. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*. 2016, **23**, 119-128.
69. MA, X., M. JIN, Y. CAI, *et al.* Mitochondrial Electron Transport Chain Complex III Is Required for Antimycin A to Inhibit Autophagy. *Chemistry & Biology*. 2011, **18**, 1474-1481.
70. MANNERSTRÖM, M., T. TOIMELA, T. YLIKOMI, *et al.* The combined use of human neural and liver cell lines and mouse hepatocytes improves the predictability of the neurotoxicity of selected drugs. *Toxicology Letters*. 2006, **165**, 195-202.
71. MARTIN, R. M., H. LEONHARDT a M. C. CARDOSO. DNA labeling in living cells. *Cytometry Part A*. 2005, **67A**, 45-52.
72. MAZLOOM-FARSIBAF, H., F. FARZAM, M. FAZEL, *et al.* Comparing lifeact and phalloidin for super-resolution imaging of actin in fixed cells. *PLOS ONE*. 2021, **16**, 1-13.
73. MCCARRON, J. G., C. WILSON, M. E. SANDISON, *et al.* From Structure to Function: Mitochondrial Morphology, Motion and Shaping in Vascular Smooth Muscle. *Journal of Vascular Research*. 2013, **50**, 357-371.
74. MEDLOCK, A. E., M. T. SHIFERAW, J. R. MARCERO, *et al.* Identification of the Mitochondrial Heme Metabolism Complex. *PLOS ONE*. 2015, **10**, 1-20.
75. MITTAL, S. a M. S. RAJALA. Heat shock proteins as biomarkers of lung cancer. *Cancer Biology & Therapy*. 2020, **21**, 477-485.
76. MIYOSHI, N., H. OUBRAHIM a B. P. CHOCK, *et al.* Age-dependent cell death and the role of ATP in hydrogen peroxide-induced apoptosis and necrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006, **103**, 1727-1731.
77. MOYER, A. M., B. L. FRIDLEY, G. D. JENKINS, *et al.* Acetaminophen-NAPQI Hepatotoxicity: A Cell Line Model System Genome-Wide Association Study. *Toxicological Sciences*. 2011, **120**, 33-41.
78. MURANOVA, L. K., M. V. SUDNITSYNA, S. V. STRELKOV, *et al.* Mutations in HspB1 and hereditary neuropathies. *Cell Stress and Chaperones*. 2020, **25**, 655-665.
79. NDI, M., L. MARIN-BUERA, R. SALVATORI, *et al.* Biogenesis of the bc1 Complex of the Mitochondrial Respiratory Chain. *Journal of Molecular Biology*. 2018, **430**, 3892-3905.

80. NG, S., H. S. LIM, Q. MA, *et al.* Optical Aptasensors for Adenosine Triphosphate. *Theranostics*. 2016-b, **6**, 1683-1702.
81. NG, Y. S. a D. M. TURNBULL. Mitochondrial disease: genetics and management. *Journal of Neurology*. 2016-a, **263**, 179-191.
82. NGUYEN, U., N. SQUAGLIA, A. BOGE, *et al.* The Simple Western™: a gel-free, blot-free, hands-free Western blotting reinvention. *Nature Methods*. 2011, **8**, 1-2.
83. NOLFI-DONEGAN, D., A. BRAGANZA a S. SHIVA. Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement. *Redox Biology*. 2020, **37**, 1-9.
84. NSIAH-SEFAA, A. a M. MCKENZIE. Combined defects in oxidative phosphorylation and fatty acid β -oxidation in mitochondrial disease. *Bioscience Reports*. 2016, **36**, 1-19.
85. NUNNARI, J. a A. SUOMALAINEN. Mitochondria: In Sickness and in Health. *Cell*. 2012, **148**, 1145-1159.
86. OJUKA, E., B. ANDREW, N. BEZUIDENHOUT, *et al.* Measurement of β -oxidation capacity of biological samples by respirometry: a review of principles and substrates. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2016, **310**, E715-E723.
87. PANDEY, A., J. PAIN, A. K. GHOSH, *et al.* Fe-S Cluster Biogenesis in Isolated Mammalian Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*. 2015, **290**, 640-657.
88. PATEL, B. A., T. L. D'AMICO a B. S.J. BLAGG. Natural products and other inhibitors of F_1F_0 ATP synthase. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2020, **207**, 1-42.
89. PATHAK, T. a M. TREBAK. Mitochondrial Ca^{2+} signaling. *Pharmacology & Therapeutics*. 2018, **192**, 112-123.
90. POSADAS, I., P. SANTOS, V. CEÑA, *et al.* Acetaminophen Induces Human Neuroblastoma Cell Death through NF κ B Activation. *PLoS ONE*. 2012, **7**, 1-13.
91. POSADAS, I., V. VELLECCO, P. SANTOS, *et al.* Acetaminophen potentiates staurosporine-induced death in a human neuroblastoma cell line. *British Journal of Pharmacology*. 2007, **150**, 577-585.
92. PREGI, N., D. VITTORI, G. PÉREZ, *et al.* Effect of erythropoietin on staurosporine-induced apoptosis and differentiation of SH-SY5Y

- neuroblastoma cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2006, **1763**, 238-246.
93. PROTASONI, M. a M. ZEVIANI. Mitochondrial Structure and Bioenergetics in Normal and Disease Conditions. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, **22**, 1-53.
 94. QU, B., Y. JIA, Y. LIU, *et al.* The detection and role of heat shock protein 70 in various nondisease conditions and disease conditions: a literature review. *Cell Stress and Chaperones*. 2015, **20**, 885-892.
 95. RABL, R., V. SOUBANNIER, R. SCHOLZ, *et al.* Formation of cristae and crista junctions in mitochondria depends on antagonism between Fcj1 and Su e/g. *Journal of Cell Biology*. 2009, **185**, 1047-1063.
 96. RATHINAM, R., S. GHOSH, WL. NEUMANN, *et al.* Cisplatin-induced apoptosis in auditory, renal, and neuronal cells is associated with nitration and downregulation of LMO4. *Cell Death Discovery*. 2015, **1**, 1-8.
 97. REN, Z., S. CHEN, J. SEO, *et al.* Mitochondrial dysfunction and apoptosis underlie the hepatotoxicity of perhexiline. *Toxicology in Vitro*. 2020, **69**, 1-27.
 98. RÖPKE, M., P. SAURA, D. RIEPL, *et al.* Functional Water Wires Catalyze Long-Range Proton Pumping in the Mammalian Respiratory Complex I. *Journal of the American Chemical Society*. 2020, **142**, 21758-21766.
 99. ROTTENBERG, H., R. COVIAN a B. L. TRUMPOWER. Membrane Potential Greatly Enhances Superoxide Generation by the Cytochrome bc1 Complex Reconstituted into Phospholipid Vesicles. *Journal of Biological Chemistry*. 2009, **284**, 19203-19210.
 100. SARTI, P. E. FORTE, D. MASTRONICOLA, *et al.* Cytochrome c oxidase and nitric oxide in action: Molecular mechanisms and pathophysiological implications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2012, **1817**, 610-619.
 101. SAUVAGEAU, J. a C. JUMARIE. Different mechanisms for metal-induced adaptation to cadmium in the human lung cell lines A549 and H441. *Cell Biology and Toxicology*. 2013, **29**, 159-173.
 102. SCARCELLO, E., A. LAMBREMONT, R. VANBEVER, *et al.* Mind your assays: Misleading cytotoxicity with the WST-1 assay in the presence of manganese. *PLOS ONE*. 2020, **15**, 1-14.

103. SEONG, Y., P. SHIN, J. YOON, *et al.* Induction of the Endoplasmic Reticulum Stress and Autophagy in Human Lung Carcinoma A549 Cells by Anacardic Acid. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 2014, **68**, 369-377.
104. SHAKERI, R., A. KHEIROLLAHI aj. DAVOODI. Apaf 1: Regulation and function in cell death. *Biochimie*. 2017, **135**, 111-125.
105. SHI, P., Y. ZHANG, Z. YU, *et al.* Label-free Electrochemical Detection of ATP Based on Amino-functionalized Metal-organic Framework. *Scientific Reports*. 2017, **7**, 1-7.
106. SUN, F., X. HUO, Y. ZHAI, *et al.* Crystal Structure of Mitochondrial Respiratory Membrane Protein Complex II. *Cell*. 2005, **121**, 1043-1057.
107. TAN, S. C. a B. C. YIAP. DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2009, **2009**, 1-10.
108. TANG, Q., Q. YUAN, H. LI, *et al.* MiR-223/Hsp70/JNK/JUN/miR-223 feedback loop modulates the chemoresistance of osteosarcoma to cisplatin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2018, **497**, 827-834.
109. TATSUMI, T., J. SHIRAIISHI, N. KEIRA, *et al.* Intracellular ATP is required for mitochondrial apoptotic pathways in isolated hypoxic rat cardiac myocytes. *Cardiovascular Research*. 2003, **59**, 428-440.
110. TEMKIN, V., Q. HUANG, H. LIU, *et al.* Inhibition of ADP/ATP Exchange in Receptor-Interacting Protein-Mediated Necrosis. *Molecular and Cellular Biology*. 2006, **26**, 2215-2225.
111. THAKUR, S. S., K. SWIDERSKI, J. G. RYALL, *et al.* Therapeutic potential of heat shock protein induction for muscular dystrophy and other muscle wasting conditions. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2018, **373**, 1-11.
112. TIMÓN-GÓMEZ, A., E. NÝVLTOVÁ, L. A. ABRIATA, *et al.* Mitochondrial cytochrome c oxidase biogenesis: Recent developments. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2018, **76**, 163-178.
113. TOEI, M. a H. NOJI. Single-molecule Analysis of F₀F₁-ATP Synthase Inhibited by N,N-Dicyclohexylcarbodiimide. *Journal of Biological Chemistry*. 2013, **288**, 25717-25726.
114. VALIPOUR, N. R., N. M. VALIPOUR a M. AHMADIZADEH. Determination of Protein Concentration Using Bradford Microplate Protein Quantification Assay. *International Electronic Journal of Medicine*. 2015, **4**, 11-17.

115. VANCRAENENBROECK, R. a M. R. WEBB. A Fluorescent, Reagentless Biosensor for ATP, Based on Malonyl-Coenzyme A Synthetase. *ACS Chemical Biology*. 2015, **10**, 2650-2657.
116. WANG, L., Y. LI, R. GUO, *et al.* Optimized bioluminescence analysis of adenosine triphosphate (ATP) released by platelets and its application in the high throughput screening of platelet inhibitors. *PLOS ONE*. 2019, **14**, 1-16.
117. WANG, Y., H. YANG, H. LIU, *et al.* Effect of staurosporine on the mobility and invasiveness of lung adenocarcinoma A549 cells: an in vitro study. *BMC Cancer*. 2009, **9**, 1-12.
118. WEBB, M. a D. P. SIDERIS. Intimate Relations—Mitochondria and Ageing. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020, **21**, 1-49.
119. WIRTH, C., U. BRANDT, C. HUNTE, *et al.* Structure and function of mitochondrial complex I. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2016, **1857**, 902-914.
120. WOYDA-PLOSZCZYCA, A. M. a W. JARMUSZKIEWICZ. The conserved regulation of mitochondrial uncoupling proteins: From unicellular eukaryotes to mammals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2017, **1858**, 21-33.
121. XU, G., S. LIU, M. HUANG, *et al.* Cadmium induces apoptosis of human granulosa cell line KGN via mitochondrial dysfunction-mediated pathways. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2021, **220**, 1-9.
122. YANG, N., W. HO, Y. CHEN, *et al.* A Convenient One-Step Extraction of Cellular ATP Using Boiling Water for the Luciferin-Luciferase Assay of ATP. *Analytical Biochemistry*. 2002, **306**, 323-327.
123. YANG, S., H. XIAO, Y. SUN, *et al.* Zeylenone synergizes with cisplatin in osteosarcoma by enhancing DNA damage, apoptosis, and necrosis via the Hsp90/ AKT / GSK3 β and Fanconi anaemia pathway. *Phytotherapy Research*. 2021, **35**, 5899-5918.
124. YANG, X., J. WANG, Y. ZHOU, *et al.* Hsp70 promotes chemoresistance by blocking Bax mitochondrial translocation in ovarian cancer cells. *Cancer Letters*. 2012, **321**, 137-143.

125. YIMIT, A., O. ADEBALI, A. SANCAR, *et al.* Differential damage and repair of DNA-adducts induced by anti-cancer drug cisplatin across mouse organs. *Nature Communications*. 2019, **10**, 1-11.
126. YIN, L., Y. WEI, Y. WANG, *et al.* Long Term and Standard Incubations of WST-1 Reagent Reflect the Same Inhibitory Trend of Cell Viability in Rat Airway Smooth Muscle Cells. *International Journal of Medical Sciences*. 2013, **10**, 68-72.
127. YIN, X., J. ZHOU, C. JIE, *et al.* Anticancer activity and mechanism of Scutellaria barbata extract on human lung cancer cell line A549. *Life Sciences*. 2004, **75**, 2233-2244.
128. YOON, E., A. BABAR, M. CHOUDHARY, *et al.* Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity: a Comprehensive Update. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*. 2016, **4**, 131-142.
129. YUSTE, V. J., I. SANCHEZ-LOPEZ, C. SOLE, *et al.* The prevention of the staurosporine-induced apoptosis by Bcl-XL, but not by Bcl-2 or caspase inhibitors, allows the extensive differentiation of human neuroblastoma cells. *Journal of Neurochemistry*. 2002, **80**, 126-139.
130. ZAMARAEVA, M. V., R. Z. SABIROV, E. MAENO, *et al.* Cells die with increased cytosolic ATP during apoptosis: a bioluminescence study with intracellular luciferase. *Cell Death & Differentiation*. 2005, **12**, 1390-1397.
131. ZHANG, R., N. ZHANG, H. ZHANG, *et al.* Celastrol prevents cadmium-induced neuronal cell death by blocking reactive oxygen species-mediated mammalian target of rapamycin pathway. *British Journal of Pharmacology*. 2017, **174**, 82-100.
132. ZICK, M., R. RABL a A. S. REICHERT. Cristae formation—linking ultrastructure and function of mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2009, **1793**, 5-19.
133. ZININGA, T., L. RAMATSUI a A. SHONHAI. Heat Shock Proteins as Immunomodulants. *Molecules*. 2018, **23**, 1-17.

Práce vznikla za podpory projektu OP VVV " IT4Neuro(degeneration) " reg. č. CZ.02.1.01/0.0/0.0/18_069/0010054.