

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Marie-Klára Chalupová

Vliv hypoxie na mitochondriální metabolismus kalcia

The impact of hypoxia on mitochondrial calcium metabolism

Bakalářská práce

Školitel: doc. MUDr. Jan Polák, Ph.D., MBA

Praha, 2024

Poděkování:

Děkuji svému školiteli doc. MUDr. Janu Polákovi, Ph.D, MBA za to, že se mi během zhotovení této bakalářské práce důkladně věnoval, pomáhal mi a poskytoval mi mnoho cenných rad. Dále bych chtěla poděkovat celé své rodině za podporu v průběhu celého studia.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 5.8.2024

Podpis

Abstrakt

Mitochondrie v buňkách plní klíčovou roli v regulaci homeostázy vápenatých iontů, které jsou nezbytné pro řadu buněčných procesů, jako jsou produkce energie, intracelulární signalizace a apoptóza. Hypoxie ale narušuje tyto procesy změnou mitochondriální funkce a homeostázy vápníku. Ovlivňuje funkci mitochondriálního vápníkového uniportéru a dalších mitochondriálních transportérů, což vede k akumulaci vápníkových iontů v cytosolu a poklesu těchto iontů v mitochondriích. To může způsobit dysfunkci mitochondrií, zvýšenou produkci reaktivních forem kyslíku a spustit apoptotické procesy. Tento dopad je zvláště zajímavý u adipocytů, u kterých hypoxie přispívá i k vážným metabolickým poruchám jako jsou obezita a diabetes mellitus 2. typu. Tato bakalářská práce shrnuje dosavadní poznatky o vlivu hypoxie na transport vápenatých iontů v mitochondriích a diskutuje mechanismy, kterými hypoxie ovlivňuje mitochondriální funkce a mitochondriální vápníkovou homeostázi v adipocytech.

Klíčová slova: mitochondrie, vápník, hypoxie, adipocyty

Abstract

Mitochondria play a crucial role in cells by regulating the homeostasis of calcium ions, which are essential for a range of cellular processes such as energy production, intracellular signalling, and apoptosis. However, hypoxia disrupts these processes by altering mitochondrial function and calcium homeostasis. Hypoxia affects the function of the mitochondrial calcium uniporter and other mitochondrial transporters, leading to the accumulation of calcium ions in the cytosol and a decrease in these ions within the mitochondria. This can cause mitochondrial dysfunction, increased production of reactive oxygen species, and trigger apoptotic processes. This impact is particularly significant in adipocytes, where hypoxia can influence the development of severe metabolic disorders such as obesity and type 2 diabetes mellitus. This bachelor's thesis summarizes the current knowledge on the effect of hypoxia on the transport of calcium ions in mitochondria and discusses the mechanisms by which hypoxia influences mitochondrial functions and mitochondrial calcium homeostasis in adipocytes.

Key words: mitochondria, calcium, hypoxia, adipocytes

Seznam zkratek

ADP	Adenosindifosfát
AM	Acetoxymethyl ester
ATP	Adenosintrifosfát
Ca ²⁺	Vápenaté ionty
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
ER	Endoplazmatické retikulum
ETC	Elektronový transportní řetězec
GTP	Guanosintrifosfát
HIF	Hypoxií-indukovatelné faktory
IMM	Vnitřní mitochondriální membrána
K _d	Disociační konstanta
LETM1	Leucine Zipper and EF-Hand Containing Transmembrane Protein 1
MAMs	Mitochondriálně asociované membrány
MCU	Mitochondriální vápníkový uniporter
mtDNA	Mitochondriální genom
mPTP	Pór přechodné permeability mitochondrií
mRyR	Mitochondriální ryanodinový receptor
NCLX	Mitochondriální Na ⁺ /Ca ²⁺ výměník
OMM	Vnější mitochondriální membrána
OXPHOS	Oxidativní fosforylace
RNA	Ribonukleová kyselina
ROS	Reaktivní formy kyslíku
TCA	Cyklus trikarboxylových kyselin
VDAC	Napětově závislé aniontové kanály
[Ca ²⁺] _{mito}	Mitochondriální vápenaté ionty

Obsah

1	Úvod	1
2	Mitochondrie	2
2.1	Struktura	3
2.2	Množství a typy	4
2.3	Genom.....	5
2.4	Dynamika mitochondrií	6
2.5	Mitochondriálně asociované membrány	7
3	Metabolismus vápníku v mitochondrii	8
3.1	Vnější mitochondriální membrána (OMM).....	8
3.2	Vnitřní mitochondriální membrána (IMM)	10
4	Hypoxie	15
4.1	Základní informace	15
4.2	Vliv na intracelulární metabolismus	15
4.2.1	Reaktivní formy kyslíku (ROS) a HIF	15
4.2.2	Adipocyty a hypoxie.....	17
4.2.3	Adipocity a mitochondriální metabolismus vápníku	19
5	Závěr	20
6	Seznam literatury	21

1 Úvod

Vápenaté ionty (Ca^{2+}) jsou zásadní pro řadu buněčných procesů včetně produkce energie, regulace buněčné signalizace a apoptózy. Intracelulární hladina Ca^{2+} je ovlivněna řadou faktorů, zejména transmembránovým transportem, regulací příjmu a výdeje Ca^{2+} z endoplazmatického retikula (ER) a mitochondrií. Mitochondrie působí jako „pufr“ pro cytosolický Ca^{2+} . (Rizzuto et al., 2012). Důležitou funkcí Ca^{2+} v mitochondriích je regulace aktivity dehydrogenáz, konkrétně pyruvátdehydrogenázy a následných enzymů cyklu trikarboxylových kyselin (TCA), isocitrátdehydrogenázy a α -ketoglutarátdehydrogenázy, čímž je regulována produkce adenosintrifosfátu (ATP) (Denton & McCormack, 1990).

Mitochondriální funkce a metabolismus Ca^{2+} mohou být významně ovlivněny hypoxií, což je stav snížené koncentrace kyslíku. Během hypoxie se snižuje účinnost elektronového transportního řetězce (ETC), který slouží jako konečný akceptor elektronů. Tato neefektivnost může vést k produkci reaktivních forem kyslíku (ROS), které způsobují oxidační poškození mitochondriální deoxyribonukleové kyseliny (DNA), proteinů a lipidů (Chandel et al., 1998). Zvýšená produkce ROS při hypoxii modifikuje aktivitu proteinů regulujících příjem a výdej Ca^{2+} do mitochondrií a způsobuje tak poruchy v transportu Ca^{2+} a tím i poruchy intracelulární koncentrace Ca^{2+} (Kristián & Siesjö, 1998).

Tato práce se zaměří na důsledky poruchy mitochondriálního Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$) při hypoxii v adipocytech. Studie ukazují, že $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$ hraje klíčovou roli v regulaci energetického metabolismu a lipolýzy. Narušená homeostáza $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$ vede k inhibici oxidace mastných kyselin a zvýšení anaerobní glykolýzy s následným hromaděním lipidů a rozvoji inzulinové rezistence. Dysregulace intracelulárního Ca^{2+} může ovlivnit signální dráhy zapojené do adipogeneze a apoptózy, vedoucí k metabolickým poruchám, jako je diabetes mellitus 2. typu (Trayhurn, 2013).

Pochopení molekulárních mechanismů, kterými hypoxie ovlivňuje mitochondriální zpracování Ca^{2+} , je klíčové pro vývoj terapeutických strategií zaměřených na zmírnění negativních účinků nedostatku kyslíku na buněčné zdraví. Chronická hypoxie, jaká se vyskytuje např. při chronické obstrukční plicní nemoci, obstrukční spánkové apnoe či srdečním selhání může přispět k rozvoji kardiovaskulárních chorob, neurodegenerativních poruch a metabolického syndromu (Nanduri et al., 2015). Cílem této práce je shrnout nejnovější poznatky o mitochondriálním metabolismu Ca^{2+} a molekulárních mechanismech, kterými hypoxie ovlivňuje tento metabolismus.

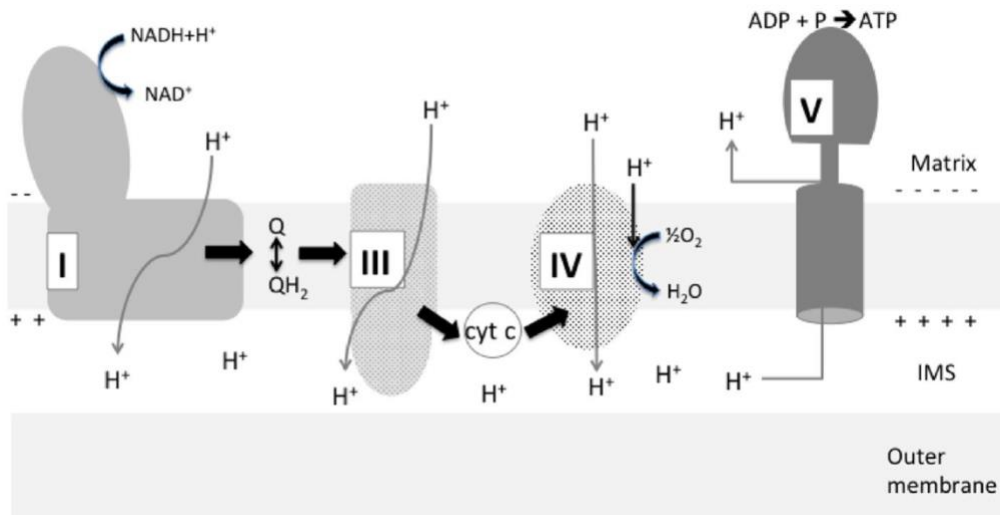
2 Mitochondrie

Mitochondrie jsou semiautonomní organely lokalizované v cytoplazmě eukaryotických buněk. Mitochondrie se podílí na řadě buněčných procesů, včetně produkce energie pro buňku ve formě ATP a guanosintrifosfátu (GTP), ale podílí se také na dalších důležitých buněčných procesech – hrají klíčové role nejen v metabolismu, ale také v buněčné signalizaci, diferenciaci a homeostáze Ca^{2+} (Mishra & Chan, 2014). Produkce ATP prostřednictvím oxidativní fosforylace (OXPHOS) zahrnuje TCA cyklus a ETC (Obr. 5). TCA cyklus neboli Krebsův cyklus je řada enzymatických reakcí probíhající v mitochondriální matrix. Začíná kondenzací acetyl-CoA s oxaloacetátem za vzniku citrátu, který je poté metabolizován v několika krocích, produkujíc NADH, FADH_2 a GTP. Hlavním účelem Krebsova cyklu je generování vysoce energetických elektronových nosičů, NADH a FADH_2 , které jsou klíčové pro další fázi produkce energie.

Elektronový transportní řetězec, umístěný ve vnitřní mitochondriální membráně, se skládá ze čtyř mnohasložkových komplexů (komplexy I-IV) a dvou mobilních elektronových nosičů, ubiquinonu (koenzym Q) a cytochromu c (viz. Obr. 1). Komplex I (NADH: ubiquinon oxidoreduktáza) přijímá elektrony z NADH, zatímco komplex II (sukcinátdehydrogenáza) přijímá elektrony z FADH_2 . Tyto elektrony jsou přenášeny přes ETC prostřednictvím ubiquinonu a cytochromu c, sekvenčně procházejí komplexy III (ubiquinol: cytochrom c oxidoreduktáza) a IV (cytochrom c oxidáza) (Ramsay, 2019). Přenos elektronů přes komplexy je spojen s pumpováním protonů z mitochondriální matrix do intermembránového prostoru, čímž vzniká elektrochemický protonový gradient přes vnitřní mitochondriální membránu. Tento protonový gradient generuje protonový motorický potenciál, která pohání syntézu ATP prostřednictvím ATP syntázy (komplex V) procesem známým jako chemiosmóza. Protony proudí zpět do mitochondriální matrix přes ATP syntázu, což způsobuje konformační změny, které umožňují enzymu fosforylovat adenosindifosfát (ADP) na ATP (Spinelli & Haigis, 2018).

Diferenciace buněk je rovněž ovlivněna mitochondriální aktivitou, jelikož energetické požadavky na různé fáze diferenciace jsou zajišťovány mitochondriemi, které poskytují potřebnou energii a zároveň regulují buněčné signály prostřednictvím reaktivních kyslíkových radikálů (ROS). Mitochondrie jsou klíčové v rámci buněčné signalizace díky své schopnosti generovat ROS. ROS působí jako signální molekuly, které mohou ovlivňovat různé buněčné procesy, včetně proliferace, diferenciace a apoptózy. Dále mitochondrie slouží jako významné zásobárny Ca^{2+} , které mohou rychle uvolňovat nebo přijímat Ca^{2+} podle potřeby buňky. Mitochondrie také hrají klíčovou roli ve vnitřní (intrinsické) cestě apoptózy. Uvolnění

cytochromu c z mezimembránového prostoru mitochondrií do cytosolu, spuštěné proapoptotickými signály, vede k aktivaci kaspáz a následné exekuci apoptózy. Tento proces je regulován anti-apoptotickými proteiny Bcl-2, které kontrolují permeabilizaci vnější mitochondriální membrány (OMM) (Tait & Green, 2010).



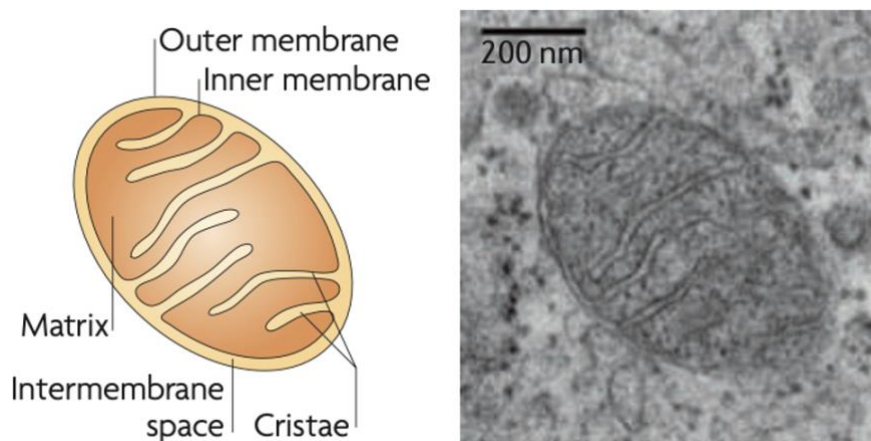
Obr. 1: Komponenty elektronového transportního systému od NADH k kyslíku, které přenášejí protony z vnitřní strany na vnější stranu vnitřní membrány: Komplex I, II a IV (Ramsay, 2019).

2.1 Struktura

V elektronové mikroskopii se mitochondrie jeví jako kruhové či oválné struktury s ostrými obrysy a odlišují se optickou denzitou (hustotou) od zbytku cytoplazmy. Denzita mitochondrií je vyšší než denzita okolní cytoplazmy a je způsobena vysokou koncentrací proteinů, lipidů a DNA uvnitř mitochondrií, což je činí v elektronovém obraze tmavšími s viditelnou vnitřní membránou a přítomností elektronově denzních matrixových granulí (Palade, 1952). V metabolicky méně aktivních buňkách jsou mitochondrie často přítomny jako četné malé sférické útvary nebo krátké tyčinky, zatímco v metabolicky aktivních buňkách se objevují jako velké propojené sítě (Bereiter-Hahn, 1990). Mitochondrie, jakožto intracelulární organely, se vyznačují přítomností dvou membrán, které vytvářejí čtyři podprostory uvnitř organely: vnější mitochondriální membránu (OMM), mezimembránový prostor (IMS), vnitřní mitochondriální membránu (IMM) tvořící krysty (vychlípeniny), a mitochondriální matrix (viz Obr. 2) (Lewis et al., 2016).

OMM je propustná pro malé molekuly a ionty a obsahuje napěťově závislé aniontové kanály (VDAC), které umožňují průchod iontů a malých molekul až do velikosti 5 kDa. OMM také hostí proteiny zapojené do syntézy lipidů, regulace apoptózy a dynamiky mitochondrií (procesy fúze a štěpení) (Camara et al., 2017). Naopak vnitřní mitochondriální membrána

(IMM) je nepropustná a obsahuje komplexy (I-IV) elektronového transportního řetězce (ETC), ATP syntázu, různé transportéry jako jsou adenin nukleotidový translokátor (ANT), fosfátový translokátor, protonové pumpy, vápníkový uniporter (MCU), karnitin/acylkarnitinový přenašeč, enzymy metabolických drah (dehydrogenázy a transhydrogenázu) a regulační proteiny (například proteiny regulující apoptózu (Bax, Bak). Unikátní složení lipidů v IMM, bohaté na kardiolipin (Pangborn, 1945), podporuje její roli v udržování elektrochemického gradientu nezbytného pro produkci ATP (Paradies et al., 2004). Kličky IMM (kristy) významně zvyšují povrchovou plochu, což umožňuje efektivní konverzi energie.



Obr. 2: Struktura mitochondrie (vlevo) a záběr mitochondrie z transmisního elektronového mikroskopu (vpravo) (Westermann, 2010)

2.2 Množství a typy

Množství mitochondrií se v různých buňkách liší z důvodu buněčné adaptace na metabolické potřeby. Například v buňkách s vysokými energetickými nároky, jako jsou svalové buňky, je mitochondrií mnohonásobně více než v buňkách s nízkými energetickými nároky jako například ve fibroblastech, makrofázích nebo adipocytech (Robin & Wong, 1988). Počet mitochondrií v buňce se také může měnit v reakci na podmínky prostředí a fyziologické stavy – bylo dokázáno u svalových buněk, že chronická elektrická stimulace svalu a vede ke zvýšení objemové hustoty mitochondrií (Schwerzmann et al., 1989). Velikost mitochondrií je také závislá na metabolické aktivitě buněk. Jsou zaznamenány charakteristické rozdíly v průměrech mitochondrií – štíhlé mitochondrie (průměr 0,2-0,3 μm) byly nalezeny v endoteliích, epitelu pankreatických vývodů, centroacinárních buňkách pankreatu a v buňkách Langerhansových ostrůvků; silnější byly nalezeny v jaterních buňkách (přibližně 0,5 μm), v epitelu proximálního tubulu nefronu (0,4-0,6 μm), v pankreatických acinárních buňkách (0,5-0,7 μm) a ve vláknech srdečního svalu (0,4-1 μm) (Palade, 1952).

Mitochondrie vykazují rozmanitost ve formě a funkci v závislosti na typu buňky a fyziologických podmínkách. Ve svalových buňkách lze rozpoznat různé typy mitochondrií zkoumáním jejich morfologických, biochemických a funkčních charakteristik. Tyto typy zahrnují subsarcolemmální a intermyofibrilární mitochondrie ve svalových buňkách, které se liší svou polohou a funkcí. Subsarcolemmální mitochondrie jsou umístěny pod buněčnou membránou a primárně se podílejí na reakci na buněčné signály a energetické nároky, zatímco intermyofibrilární mitochondrie jsou situovány mezi myofibrilami a více se podílejí na trvalé produkci ATP během svalové kontrakce (Palmer et al., 1977). Podobně lze rozlišit neuronální mitochondrie na nesynaptické neboli volné mitochondrie a synaptické mitochondrie, které lze dále rozdělit do dvou skupin na základě sedimentace – těžké a lehké (Liao et al., 2020).

Mitochondrie lze také klasifikovat na základě jejich metabolického stavu, kdy se mohou vyskytovat ve dvou konformacích: kondenzované nebo ortodoxní, dle jejich aktivity a mitochondriálního membránového potenciálu (Hackenbrock, 1966). Ortodoxní konformace je charakterizována rozsáhlejší oblastí matrix a menším počtem krist. Tato konformace je typická pro mitochondrie v klidovém nebo méně aktivním stavu, kde je nižší spotřeba energie a nižší produkce ATP. Kondenzovaná konformace naopak vykazuje kompaktnější oblast matrix a více krist. Tento stav je spojen s vysokou metabolickou aktivitou mitochondrií, odpovídající vyšší buněčné spotřebě kyslíku a intenzivní produkce ATP. Změny mezi těmito konformacemi umožňují mitochondriím rychle reagovat na energetické požadavky buňky (Benard et al., 2006).

2.3 Genom

Mitochondrie mají vlastní genom (mtDNA), což odráží endosymbiotickou teorii, která popisuje, jak mitochondrie vznikly z volně žijících α -proteobakterií, které byly prostřednictvím endosymbiózy pohlceny předky eukaryotických buněk. Pohlcené α -proteobakterie se staly nedílnou součástí hostitelských buněk, čímž vznikly mitochondrie (Gray et al., 2001). Endosymbiotická teorie je dále podpořena přítomností dvojité membrány, 70S ribozomů, kruhovou DNA a také reprodukcí mitochondrií procesem binárního dělení (Sagan, 1967).

Mitochondriální genom je tvořen kruhovou molekulou DNA, která u člověka má 16 569 bazí (bp) a obsahuje 37 genů, avšak vykazuje variabilitu u různých druhů (Formenti et al., 2021). Tyto geny kódují 13 proteinů, které jsou esenciálními složkami ETC, 22 transferových ribonukleových kyselin (RNA) a 2 ribozomové RNA. Na rozdíl od jaderného genomu, který je lineární a obsahuje přibližně 20 000-25 000 genů, je mtDNA mnohem menší a kóduje pouze

zlomek proteinů potřebných pro mitochondriální funkci. Většina mitochondriálních proteinů je kódována jadernými geny, syntetizována v cytoplazmě a importována do mitochondrií, včetně všech proteinů účastnících se mitochondriálním transportu Ca^{2+} (Anderson, 1981). Replikace mtDNA probíhá během celého buněčného cyklu a je nezávislá na procesu replikace jaderné DNA. Replikace mtDNA zahrnuje několik klíčových enzymů, včetně DNA polymerázy gamma (Pol γ), jediné DNA polymerázy známé v mitochondriích, helikázy Twinkle a mitochondriálního proteinu vázajícího jednořetězcovou DNA. (Korhonen et al., 2004).

2.4 Dynamika mitochondrií

Mitochondrie jsou dynamické organely charakterizované svou schopností měnit tvar, velikost a distribuci v buňce. Mitochondrie neustále procházejí procesy dělení a fúze, jelikož jsou důležité pro jejich funkci, distribuci a kontrolu kvality. Dělení umožňuje mitochondriím se dělit a replikovat, což zajišťuje dostatečný počet mitochondrií pro uspokojení energetických nároků buňky, zatímco fúze pomáhá zmírňovat poškození smícháním obsahu částečně poškozených mitochondrií jako formu kontroly kvality (Bereiter-Hahn & Voth, 1994). Rovnováha mezi těmito protikladnými procesy je zásadní pro buněčnou homeostázu a adaptaci na metabolické změny.

Fúze je proces, při kterém mitofusiny (Mfn1 a Mfn2) na OMM umožňují přiblížení a spojení dvou mitochondrií. Tyto proteiny interagují přes své GTPázové domény, čímž zahajují fúzi OMM. Protein Optic Atrophy 1 (Opa1) se nachází na IMM a je zodpovědný za její fúzi. Opa1 také udržuje strukturu krist a reguluje mitochondriální dýchací řetězec. Jeho aktivita je regulována proteolytickým štěpením, kde se plná délka Opa1 štěpí na kratší formy účastnící se fúze (Ramos et al., 2019). Fúze mitochondrií umožňuje sdílení zdravé DNA, proteinů a dalších komponentů, což napomáhá opravě poškozených mitochondrií a optimalizuje produkci ATP. Tím také zajišťuje rovnoměrnou distribuci enzymů a substrátů potřebných pro OXPHOS a zabraňuje nadměrnému uvolňování pro-apoptotických faktorů. Výměna mtDNA mezi mitochondriemi udržuje genetickou stabilitu a funkčnost mitochondriální populace (Westermann, 2010).

Štěpení mitochondrie je proces, při kterém se jedna mitochondrie rozdělí na dvě nebo více menších mitochondrií. Tento proces je nezbytný pro buněčné dělení, odstranění poškozených mitochondrií a regulaci apoptózy. Hlavním proteinem zapojeným do štěpení je dynamin-related protein 1 (Drp1), GTPáza, která se rekrutuje z cytosolu na mitochondriální membránu, kde tvoří prstencové struktury, které mechanicky konstriktují a fragmentují

mitochondrii. Proteiny Fission 1 (Fis1), Mitochondrial fission factor (Mff) a MiD49/MiD51 na OMM slouží jako kotviště pro Drp1 a další faktory štěpení (Dong, et al., 2023). Dynamické štěpení a fúze mitochondrií umožňuje buňkám přizpůsobit se změnám v energetických požadavcích a metabolických podmínkách. Štěpení může zvýšit počet mitochondrií, což je výhodné pro rychlou adaptaci na zvýšené energetické nároky (Westermann, 2010).

2.5 Mitochondriálně asociované membrány

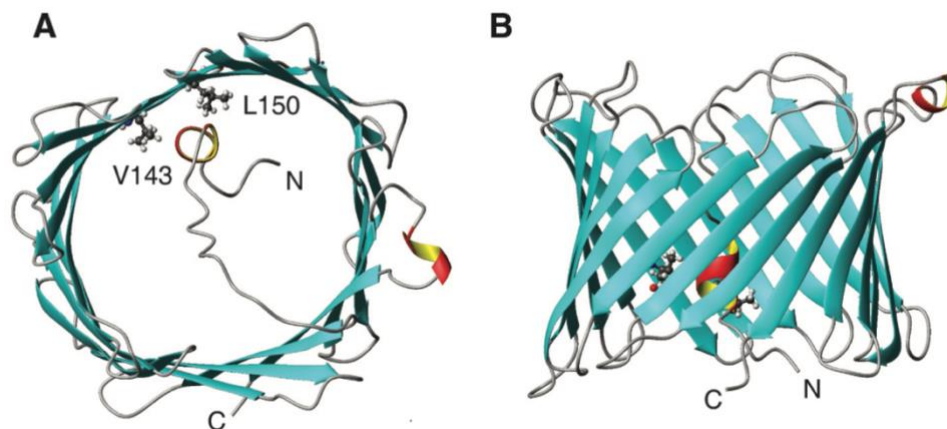
Mitochondrie také interagují s dalšími buněčnými organelami, jako je ER, prostřednictvím specializovaných kontaktních míst známých jako mitochondriálně asociované membrány (MAMs) (Vance, 1990). Na těchto místech se membrány ER a mitochondrií přibližují na velmi malou vzdálenost (10-30 nm), což umožňuje efektivní komunikaci a interakci mezi těmito organelami. Bylo odhadnuto, že 5–20 % celkového povrchu mitochondrií je v úzkém kontaktu s membránami ER (Csordás et al., 2006). ER je hlavním Ca^{2+} v buňce a mitochondrie hrají klíčovou roli v regulaci intracelulární koncentrace Ca^{2+} . Mitochondrie a ER zajišťují skladování Ca^{2+} , což umožňuje udržovat trvale nízké hladiny Ca^{2+} v cytosolu a tím bránit nechtěnému spuštění signálních drah závislých na tomto druhém poslovi. MAMs zajišťují přenos Ca^{2+} z ER, plazmatické membrány či jaderného obalu do mitochondrií a jsou klíčové pro výměnu lipidů a iniciaci apoptotických signálů. Efektivita transportu Ca^{2+} je zvýšena těsným přilnutím mitochondrií k Ca^{2+} hotspotům, čímž se rozumí mikrodomény s vysokou hladinou cytosolického Ca^{2+} . Tvoří se na místech uvolnění Ca^{2+} z intracelulárních zásob, kde dočasně dosahují vyšších koncentrací než v celkovém cytosolu, jako například v blízkosti plazmatické membrány, jaderného obalu a zejména v okolí ER.

Koncentrace Ca^{2+} v cytosolu obvykle udržována na velmi nízkých úrovních, obvykle kolem 100 nM. Po buněčné stimulaci se koncentrace Ca^{2+} v cytosolu může zvýšit na mikromolární úrovně v rozmezí 1 až 2 μM . Koncentrace Ca^{2+} v mitochondriích je obvykle v rozmezí 100-200 nM, ale během buněčné excitace může vzrůst na 10-20 μM (Modesti et al., 2021). Zjistilo se, že koncentrace Ca^{2+} v mitochondriích se liší v závislosti na zdroji i podmínkách. Například endogenní obsah Ca^{2+} v mitochondriích jater potkanů se pohybuje od 10 do 14 ng-atomů na mg proteinu, zatímco v mitochondriích ledvin potkanů se pohybuje od 35 do 55 ng-atomů na mg proteinu (Carafoli & Lehninger, 1971).

3 Metabolismus vápníku v mitochondrii

3.1 Vnější mitochondriální membrána (OMM)

Potenciál na OMM je obecně považován za zanedbatelný nebo blízký nule. To je způsobeno tím, že OMM je vysoce propustná pro ionty a malé molekuly díky přítomnosti kanálů závislých na napětí známé jako napěťově závislé aniontové kanály (VDAC), které umožňují volný průchod těmito entitám a tím zabraňují vytvoření významného elektrochemického gradientu. Přesná hodnota potenciálu OMM nebyla definitivně změřena, ale studie naznačují, že jakýkoli přítomný potenciál je velmi minimální ve srovnání s významným membránovým potenciálem nalezeným přes vnitřní mitochondriální membránu (IMM) (Liu & Colombini, 1992). Mitochondriální membránový potenciál je vytvořen napříč v IMM, nikoli OMM. Ačkoli se VDAC nachází v OMM, může reagovat na malé potenciálové rozdíly, které vznikají díky lokálním iontovým gradientům nebo interakcím s jinými mitochondriálními proteiny a cytoplazmatickými komponentami. Tyto malé změny napětí jsou dostatečné k tomu, aby ovlivnily konformaci a funkci VDAC (Hodge & Colombini, 1997).



Obr. 3: Stavba VDAC, pohled shora (A) a z boku (B). β listy – modře, helikální sekundární struktury – červeně a žlutě. N- a C-terminály a rezidua L150 a V143 jsou označeny (Hiller et al., 2008).

Vnější mitochondriální membrána obsahuje mnohem menší množství proteinů než IMM, přičemž nejvýznamnějším je 30 kDa integrovaný membránový protein (C. Mannella & Bonner, 1975), který tvoří iontový kanál s velkou vodivostí (Colombini, 1979; Schein et al., 1976). Tento protein, označovaný jako VDAC, je zodpovědný za permeabilitu OMM (Colombini, 1979) a pomocí něj se Ca^{2+} a jiné ionty, metabolity a malé molekuly pohybují z cytosolu do mezimembránového prostoru mitochondrií (IMS). Tento kanál se nachází na OMM všech eukaryotických buněk (Colombini, 1987). VDAC je hlavní proteinovou složkou OMM, která významně přispívá k proteinové frakci, která tvoří 40 % hmotnosti OMM (C.

Mannella et al., 1986). Byly popsány tři izoformy VDAC (VDAC1–3), přičemž VDAC1 je nejrozšířenější izoformou a nejlépe charakterizovanou izoformou v mitochondriích savců, zatímco VDAC2 a VDAC3 mají specializovanější a méně pochopené role (Yamamoto et al., 2006).

Struktura VDAC byla objasněna pomocí technik, jako je rentgenová krystalografie a nukleární magnetická rezonance. VDAC je tvořen 19 β -řetězci tvořících antiparalelní list (viz Obr. 3), uzavřený paralelním párováním prvního a posledního řetězce (Ujwal et al., 2008). Řetězce jsou nakloněny přibližně o 45 stupňů vzhledem k hlavní ose válce a celá struktura je vysoká asi 30 Å s otevřeným průměrem kolem 25 Å. Pór o přibližném průměru 2,5 až 3 nm je dostatečně široký pro průchod iontů a malých molekul. Každý β -pramen ve VDAC je propojen krátkými smyčkami, které přispívají k flexibilitě a „gatingovým“ vlastnostem kanálu. „Gatingové“ vlastnosti VDAC se rozumí mechanismy, jimiž se kanál otevírá a zavírá, což reguluje tok iontů a metabolitů přes OMM. N-koncový segment VDAC, který zahrnuje α -helix, se nachází uvnitř barelu a hraje klíčovou roli v napět'ovém řízení kanálu. Tento segment se může pohybovat v reakci na změny membránového potenciálu, čímž otevírá nebo zavírá pór a reguluje tok metabolitů a iontů, včetně Ca^{2+} (Bayrhuber, 2008). Přesný počet β -pramenů byl předmětem diskusí; zatímco dřívější studie naznačovaly 13 β -pramenů, novější studie s vysokým rozlišením potvrzují přítomnost 19 β -pramenů (Hiller et al., 2008).

N-terminální ocas VDAC-1 (aminokyseliny 1-23) je umístěn uvnitř kanálu, netvoří část stěny válce, ale leží vedle malého hydrofobního místa uvnitř válce. Toto uspořádání naznačuje, že N-terminální oblast, která je zapojena do napět'ové regulace, by mohla přijímat různé konformace v závislosti na vnějších podmínkách. VDAC-1 vykazuje teoretický náboj +3 při neutrálním pH, s 29 negativními náboji z Asp a Glu zbytků kompenzovanými 32 pozitivními náboji z Arg a Lys zbytků. Tyto náboje jsou převážně umístěny ve smyčkách a vnitřní stěně kanálu, tvořící výrazné elektrostatické plochy, které mohou souviset s preferencí kanálu pro anionty před kationty. Rezidua L150 a V143 jsou konkrétní aminokyseliny v sekvenci proteinu VDAC-1 (viz Obr. 3). „L“ označuje aminokyselinu leucin a „V“ označuje aminokyselinu valin, zatímco čísla 150 a 143 odkazují na jejich pozici v sekvenci proteinu (Hiller et al., 2008).

Napět'ově závislé aniontové kanály existují v různých konformačních stavech, které jsou ovlivněny napětím, vazbou metabolitů a interakcemi s jinými proteiny. V otevřené konformaci se VDAC vyznačuje vysokou vodivostí a je snadno propustný pro adeninnukleotidy (ATP, ADP), malé metabolity (pyruvát, malát, citrát) a ionty jako Ca^{2+} . V tomto stavu kanál umožňuje volný tok těchto molekul, což je nezbytné pro udržení funkce mitochondrií

a buněčného metabolismu (Colombini, 1979; Schein et al., 1976). VDAC může při depolarizaci IMM přejít do uzavřeného stavu, čímž se omezuje průchod iontů a metabolitů. Tento stav se vyznačuje nižší vodivostí, což omezuje tok iontů a metabolitů. Uzavřená konformace hraje roli při ochraně mitochondrií za stresových podmínek. Kanál může také přijmout mezistavy mezi plně otevřeným a plně uzavřeným stavem. Tyto mezistavy jsou považovány za jemné ladění propustnosti kanálu a jsou zásadní pro jeho regulační funkce (Colombini, 1979).

Cytosolický Ca^{2+} reguluje vodivost VDAC, přičemž zvýšená koncentrace Ca^{2+} podporuje zvýšenou vodivost kanálu. Ca^{2+} může také zvýšit transport ATP přes OMM, což naznačuje, že Ca^{2+} může ovládat celkovou propustnost malých molekul VDAC i jeho iontovou vodivost (Báthori et al., 2006). Propustnost Ca^{2+} VDAC je dále regulována interakcí s proteiny, jako například antiapoptotický protein Bcl-xL. Když se Bcl-xL naváže na VDAC, dochází k regulaci otevření nebo uzavření kanálu, což ovlivňuje, kolik Ca^{2+} iontů může kanálem procházet. To znamená, že přítomnost Bcl-xL může zvýšit nebo snížit průchod Ca^{2+} iontů skrze VDAC, a tím přímo ovlivňuje hladiny Ca^{2+} v mitochondriích a následně buněčnou signalizaci a apoptózu. Dále hexokináza, která se váže na VDAC, může ovlivňovat konformaci kanálu a jeho propustnost pro Ca^{2+} a další ionty. Kromě toho může lipidové prostředí OMM, zejména přítomnost kardiolipinu, ovlivňovat funkci VDAC (Huang et al., 2013). Kromě toho může lipidové prostředí OMM, zejména přítomnost kardiolipinu, ovlivňovat funkci VDAC. Změny v obsahu kardiolipinu, ke kterým může docházet za patologických podmínek, jako jsou metabolické poruchy (obezita, diabetes), srdeční selhání nebo ischemie a reperfuční poranění, mohou změnit VDAC-zprostředkovaný transport Ca^{2+} a funkci mitochondrií (Pastorino & Hoek, 2008).

3.2 Vnitřní mitochondriální membrána (IMM)

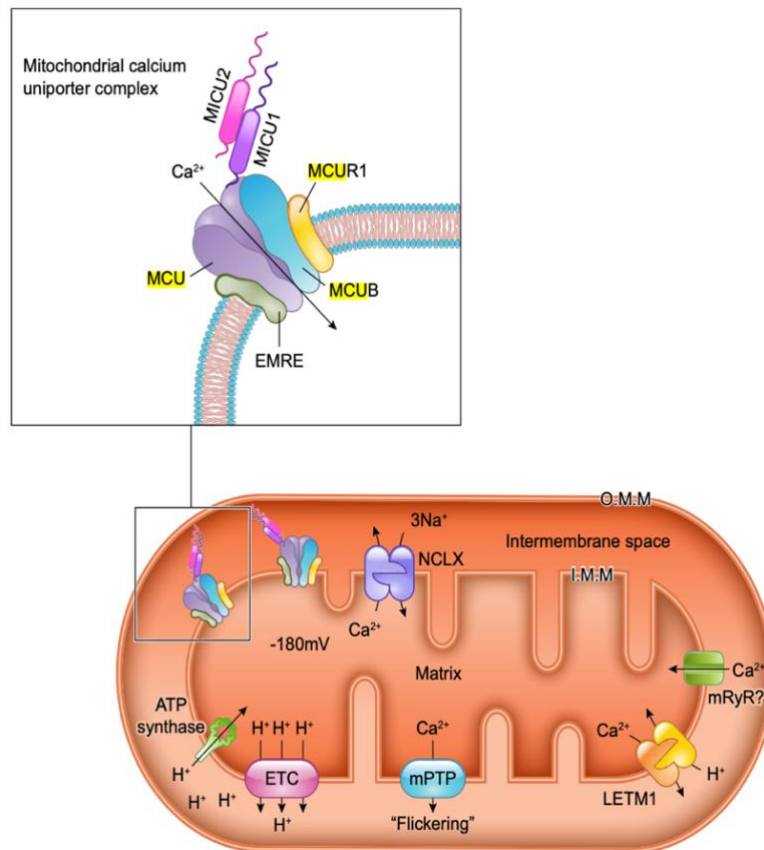
Po překročení OMM přes VDAC musí být Ca^{2+} transportován z IMS přes IMM, která na rozdíl od OMM není propustná iontům. IMM udržuje potenciál kolem -150 až -180 mV, díky své nepropustnosti pro ionty a činnosti ETC (viz Obr. 1), který vytváří protonový gradient nezbytný pro syntézu ATP. Elektrony jsou přenášeny přes řadu proteinových komplexů (komplex I, III a IV) v IMM a tyto komplexy čerpají H^+ ionty z mitochondriální matrix do IMS, čímž vytvářejí vysokou koncentraci H^+ iontů v IMS. V mitochondriální membráně existují specifické přenašeče, jako je výměník $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$, který využívá energii protonového gradientu k transportu Ca^{2+} iontů do mitochondriální matrix. H^+ ionty transportované přes IMM respiračním řetězcem vytvářejí koncentrační gradient, pomocí kterého se akumuluje Ca^{2+} v mitochondriální matrix. IMM obsahuje řadu proteinů, které umožňují transport Ca^{2+} , jedná se o A) mitochondriální

vápníkový uniporter (MCU), B) Leucine Zipper and EF-Hand Containing Transmembrane Protein 1 (LETM1), C) pór přechodné permeability mitochondrií (mPTP), D) mitochondriální ryanodinový receptor (mRyR) a E) NCLX výměník (viz Obr. 4). Mitochondriální vápníkový uniporterový komplex představuje hlavní mechanismus transportu Ca^{2+} přes IMM do mitochondriální matrix (Kirichok et al., 2004). MCU je podjednotka tvořící pór, která představuje hlavní část tohoto multiproteinového komplexu. MCU tvoří vysoce selektivní kanál, který umožňuje průchod Ca^{2+} iontů do matrix v reakci na specifické buněčné signály či koncentraci Ca^{2+} v IMS. Komplex MCU se dále skládá z regulačních proteinů MICU1, MICU2 a esenciálního regulátoru MCU (EMRE) (Baughman et al., 2011).

Mitochondriální vápníkový uniporter (MCU) obsahuje dvě klíčové transmembránové domény (TMD1 a TMD2), které procházejí mitochondriální vnitřní membránou. Tyto transmembránové segmenty se podílejí na tvorbě centrálního póru kanálu, kterým procházejí Ca^{2+} ionty (Baughman et al., 2011). D-helix je důležitou součástí struktury MCU, která se podílí na stabilizaci komplexu a interakci mezi jednotlivými podjednotkami. D-helix se nachází v IMS a je důležitý pro oligomerizaci MCU podjednotek (Payne et al., 2020). Dále komplex MCU zahrnuje paralogické proteiny MICU1 a MICU2, které tyčí do IMS a pomáhají detekovat hladiny cytosolického Ca^{2+} podle kterého následně regulují aktivitu MCU (viz Obr. 4). MICU1 a MICU2 fungují jako „strážci“, kteří zabraňují nadměrnému přílivu Ca^{2+} v klidových podmínkách, čímž zajišťují, že příjem Ca^{2+} probíhá pouze tehdy, když je to potřeba. EMRE je zásadní pro aktivitu komplexu MCU a udržuje pór v otevřené konformaci. Zároveň působí jako most mezi MCU a MICU – přenáší detekci Ca^{2+} pomocí MICU1/2 na pór. MCUB je inaktivní paralog MCU a může tvořit součást komplexu (Oxenoid et al., 2016). Součástí komplexu je i regulátor mitochondriálního vápníkového uniportéru 1 (MCUR1). Váže se přímo na MCU, čímž stabilizuje a podporuje strukturu celého uniportérového komplexu a působí jako pozitivní regulátor aktivity MCU. To znamená, že jeho přítomnost je nezbytná pro účinný transport Ca^{2+} přes vnitřní mitochondriální membránu. MCUR1 usnadňuje otevírání kanálu a tím umožňuje, aby Ca^{2+} vstoupilo do mitochondriální matrix (Mallilankaraman et al., 2012).

Rozlišují se dva kineticky odlišné mechanismy příjmu Ca^{2+} přes MCU – pomalý způsob příjmu, který odpovídá aktivitě MCU, a rychlý způsob příjmu (RaM) (Sparagna et al., 1995). Rychlý způsob příjmu Ca^{2+} (RaM) je mechanismus, který byl navržen pro vysvětlení rychlého a přechodného příjmu Ca^{2+} mitochondriemi v reakci na buněčné signály. RaM je charakterizován svou schopností rychle sekvestrovat Ca^{2+} v mitochondrii, čímž poskytuje rychlý reakční mechanismus na změny v buněčných hladinách Ca^{2+} . RaM funguje na začátku

pulzu Ca^{2+} , čímž se rozumí krátkodobé zvýšení koncentrace Ca^{2+} v cytosolu buňky. RaM umožňuje tak mitochondriím akumulovat Ca^{2+} i v případě, že doba trvání cytosolického pulsu Ca^{2+} není dostatečná pro aktivaci MCU neboli pomalého způsobu příjmu. Při koncentracích cytosolického Ca^{2+} pod nebo okolo 200 nM, všechny příjem Ca^{2+} je zprostředkováno RaM. Ačkoli přesná molekulární identita RaM ještě není plně objasněna, předpokládá se, že funguje ve spolupráci s MCU pro modulaci příjmu Ca^{2+} během období vysoké buněčné potřeby (Sparagna et al., 1995).



Obr. 4: Transportní proteiny na IMM a stavba MCU komplexu (Garbincius & Elrod, 2022)

Dalším významným proteinem je LETM1, který se primárně podílí na transportu Ca^{2+} přes IMM, čímž usnadňuje příjem Ca^{2+} do mitochondriální matrix. Studie ukazují, že LETM1 funguje jako mitochondriální $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ antiportér, což usnadňuje výměnu Ca^{2+} s H^+ přes IMM. Konkrétněji, Ca^{2+} putuje do mitochondriální matrix, zatímco H^+ opouští mitochondriální matrix směrem do IMS. LETM1 zajišťuje, že hladina Ca^{2+} v matrix není ani příliš nízká, což by bránilo enzymatickým reakcím, ani příliš vysoká, což by mohlo vést k toxickým účinkům a apoptóze. Výměnou H^+ za Ca^{2+} LETM1 pomáhá udržovat protonový gradient napříč IMM, který je nezbytný pro syntézu ATP pomocí ATP syntázy. Tento antiportní mechanismus také přispívá k udržení stabilního pH uvnitř mitochondriální matrix, což je důležité pro optimální fungování

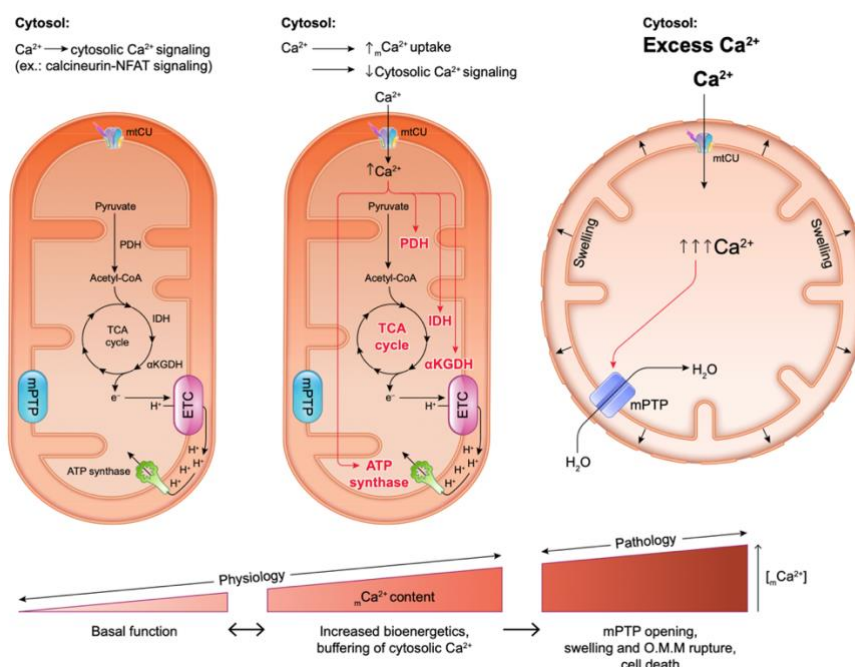
mitochondriálních enzymů. Dále LETM1 chrání proti mitochondriální dysfunkci, protože dysregulace Ca^{2+} homeostázy může vést k otevření mPTP, což způsobuje ztrátu mitochondriálního potenciálu a apoptózu. LETM1 tím, že reguluje hladiny Ca^{2+} , přispívá k prevenci těchto škodlivých událostí. LETM1 pracuje v koordinaci s dalšími transportéry a kanály, jako jsou MCU a NCLX, k dosažení celkové Ca^{2+} homeostázy a odpovídající reakce na buněčné signály (Nowikovsky & Bernardi, 2014).

Struktura LETM1 zahrnuje jednu transmembránovou doménu, která zajišťuje jeho zakotvení ve IMM a je nezbytná pro stabilitu proteinu a jeho správné umístění v mitochondriích. Dále LETM1 obsahuje leucinové zipy, což jsou sekvence bohaté na aminokyselinu leucin. Pomáhají při tvorbě funkčních proteinových komplexů, které jsou nezbytné pro transport iontů, což zahrnuje zejména výměnu Ca^{2+} s H^+ . EF-hand motivy jsou další významnou strukturální složkou LETM1. Fungují jako senzory Ca^{2+} a jsou schopné jej vázat. Když je koncentrace Ca^{2+} vysoká, Ca^{2+} se váží na tyto motivy, což způsobuje konformační změny v proteinu LETM1. Vazba Ca^{2+} na EF-hand motivy vede ke konformačním změnám v LETM1, které mohou ovlivnit jeho transportní aktivitu – jedná se o změny tvaru EF-hand motivu nebo otevření či uzavření transportních kanálů. Tyto změny mohou zvýšit nebo modulovat schopnost LETM1 transportovat Ca^{2+} a H^+ přes IMM (Durigon et al., 2018).

Pór přechodné permeability mitochondrií (mPTP) je multiproteinový komplex v IMM. Strukturálně je mPTP tvořen interakcí několika proteinů, včetně adeninnukleotidového translokátoru (ANT), napěťově závislého aniontového kanálu (VDAC) a cyklofilinu D (CypD), mezi jinými (Bernardi, 2013). Otevření mPTP je vysoce regulováno hladinami Ca^{2+} , přičemž zvýšené koncentrace Ca^{2+} v mitochondrii podporují jeho otevření. mPTP se typicky otevírá během patologických stavů (např. ischemicko-reperfuční poškození), což vede ke ztrátě membránového potenciálu, osmotickému otoku mitochondrií a uvolnění pro-apoptotických faktorů, což má za následek odtok Ca^{2+} z mitochondrií do cytosolu. Uvolnění pro-apoptotických faktorů umožňuje průchod molekul až do velikosti 1,5 kDa z mitochondrie do cytosolu, což narušuje mitochondriální membránový potenciál, vede k otoku mitochondrií, jejich prasknutí, a nakonec k buněčné smrti prostřednictvím nekrózy nebo apoptózy (Obr. 3) (Bernardi et al., 2023).

Mitochondriální ryanodinový receptor (mRyR) je protein, který hraje významnou roli v regulaci transportu Ca^{2+} uvnitř mitochondrií. Předpokládá se, že mRyR funguje jako Ca^{2+} kanál, který usnadňuje pohyb Ca^{2+} iontů do mitochondriální matrix. Přesný mechanismus funkce mRyR při transportu Ca^{2+} není zcela objasněn, ale předpokládá se, že zahrnuje modulaci

mitochondriálního příjmu Ca^{2+} , ovlivňujícího mPTP a ovlivňující buněčný metabolismus a přežití. mRyR se podílí na zprostředkování mitochondriálního příjmu Ca^{2+} v reakci na lokální změny koncentrace Ca^{2+} v blízkosti buněčných uvolňovacích míst jako například na ER. Tento receptor usnadňuje lokalizovaný příjem Ca^{2+} do mitochondrií (Xu et al., 2016). Dle studií, akutní inhibice mRyR pomocí ryanodinu snižuje nárůst spotřeby kyslíku, ke kterému dochází při expozici zvýšené koncentraci Ca^{2+} , což naznačuje jeho roli ve stimulaci oxidačního metabolismu. Rozdílná odpověď mRyR a MCU na různé buněčné signály naznačuje, že mRyR je obzvláště citlivý na lokální zvýšení koncentrace Ca^{2+} v mikrodomech, zatímco MCU je citlivější na celkové zvýšení koncentrace Ca^{2+} v cytosolu. Tato specializace umožňuje mRyR významně přispívat k bazální produkci ATP a homeostatickému příjmu Ca^{2+} , zatímco aktivace MCU je důležitější během období zvýšené energetické náročnosti (Garbincius & Elrod, 2022).



Obr. 5: Mitochondriální metabolismus, fyziologické a patologické funkce akutního příjmu Ca^{2+} a bobtnání mitochondrie (Garbincius & Elrod, 2022)

$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}/\text{Li}^+$ výměník (NCLX) také přispívá k udržení mitochondriální a buněčné homeostázy Ca^{2+} . NCLX skládá z 10 transmembránových segmentů, přičemž jeho N- a C-konce směřují do mitochondriální matrix. Tento výměník usnadňuje vylučování Ca^{2+} z mitochondriální matrix výměnou za Na^+ nebo Li^+ , čímž reguluje koncentraci $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$. Aktivita NCLX je klíčová pro prevenci přetížení mitochondrií Ca^{2+} , jelikož přetížení Ca^{2+} může vést k otevření mPTP a následné buněčné smrti (Palty et al., 2010). Příjem Ca^{2+} pomocí MCU je převážně vyvážen právě mitochondriálním NCLX. Funkce NCLX je navíc modifikována

membránovým gradientem Na^+ v buňce, což zdůrazňuje jeho roli v interakci mezi mitochondriální a cytosolickou iontovou homeostázou (Kirichok et al., 2004).

4 Hypoxie

4.1 Základní informace

Hypoxie je stav, při kterém buňky či tkáň se nachází ve stavu snížené dostupnosti kyslíku. Tento stav může nastat buď z důvodu nedostatečného přísunu kyslíku ze vzduchu, snížené schopnosti krve přenášet kyslík, zhoršeného krevního oběhu nebo zvýšené potřeby tkání na kyslík (Trayhurn et al., 2008). Hypoxie může mít různé příčiny, včetně vysokohorské nemoci, srdečních nebo plicních onemocnění, anémie a dalších stavů, které ovlivňují dýchací nebo oběhový systém. Hypoxie může mít závažné následky na funkci orgánů a celkový zdravotní stav. Kardiovaskulární a respirační systémy se snaží kompenzovat sníženou dostupnost kyslíku, což může vést k tachykardii, zvýšené frekvenci dýchání, a v chronických případech ke zvýšení počtu červených krvinek. Bez adekvátního zásobení kyslíkem mohou buňky přejít na anaerobní metabolismus, což vede k akumulaci laktátu a metabolické acidóze (Semenza, 2011).

Intermitentní hypoxie je charakterizována opakovanými epizodami nízkých hladin kyslíku, které se střídají s periodami normoxie (normální hladiny kyslíku). Tento typ hypoxie je typicky spojen se stavem, jako je obstrukční spánková apnoe, při kterém dochází k opakovanému uzavírání dýchacích cest během spánku, což vede k přechodným periodám hypoxie (Shobatake et al., 2022). Intermitentní hypoxie má na organismus různé dopady, které mohou být odlišné od chronické hypoxie. Může vyvolávat adaptivní i maladaptivní odpovědi. Například krátkodobá intermitentní hypoxie může zlepšit kardiovaskulární zdraví tím, že stimuluje angiogenezi a zlepšuje svalovou kapacitu pro využití kyslíku. Na druhou stranu, dlouhodobá intermitentní hypoxie je spojena s negativními zdravotními dopady, včetně zvýšeného oxidačního stresu, zánětu, inzulinové rezistence a zvýšeného rizika kardiovaskulárních chorob (Brown, 2009).

4.2 Vliv na intracelulární metabolismus

4.2.1 Reaktivní formy kyslíku (ROS) a HIF

Reaktivní formy kyslíku (ROS) jsou chemicky reaktivní molekuly obsahující kyslík. Zahrnují volné radikály jako superoxid ($\text{O}_2^{\bullet-}$), hydroxylový radikál ($\bullet\text{OH}$) a neradikálové druhy jako peroxid vodíku (H_2O_2) a singletový kyslík ($^1\text{O}_2$). ROS jsou vedlejšími produkty buněčného metabolismu, zvláště během OXPHOS v ETC. Nadměrná produkce ROS však způsobuje

oxidační stres, který poškozuje buněčné komponenty, jako jsou lipidy, proteiny a DNA. Antioxidantní obranné mechanismy těla, včetně enzymů, jako je superoxid dismutáza a kataláza, obvykle udržují rovnováhu neutralizací ROS (Andrés Juan et al., 2021).

Stav hypoxie vede k zvýšené produkci ROS. Během hypoxie částečná redukce kyslíku v mitochondriích vede k akumulaci částečně redukováných forem kyslíku, které jsou pak přeměněny na ROS. Tato nadměrná produkce ROS za hypoxických podmínek posléze aktivuje různé buněčné signální dráhy, které mohou přispět k adaptaci buněk, jejich přežití nebo smrti v závislosti na kontextu a závažnosti hypoxie (Andrés Juan et al., 2021). Nerovnováha mezi produkcí ROS a antioxidantními obrannými mechanismy v adipocytech přispívá k patogenezi komplikací spojených s obezitou. ROS mohou stabilizovat hypoxií-indukovaný faktor 1-alfa (HIF-1 α), transkripční faktor, který reguluje expresi genů zapojených do adaptivních odpovědí na nízké hladiny kyslíku, čímž spojuje ROS s hypoxií indukovanými buněčnými reakcemi (Andrés Juan et al., 2021).

Hypoxie ovlivňuje buněčný metabolismus prostřednictvím aktivace faktorů HIF, konkrétně HIF-1 a HIF-2 (Jaśkiewicz et al., 2022). HIF jsou transkripční faktory, který regulují buněčnou odpověď na hypoxii. HIF-1 α , nejvíce studovaná izoforma, je stabilizována za hypoxických podmínek a aktivuje transkripci různých genů zapojených do angiogeneze, metabolismu a zánětu. Jedná se například o angiopoietin 1, hexokinase 2, glucose transporter 1 a interleukin 6 mimo jiné (Keith et al., 2012). Za podmínek nízkého obsahu kyslíku, HIF-1 indukuje metabolický posun z aerobního na anaerobní metabolismus, čímž zvyšuje závislost na glykolýze pro produkci ATP. TCA cyklus a OXPHOS, které jsou závislé na kyslíku, se stávají méně efektivními. V důsledku toho buňky zvyšují expresi glykolytických enzymů a transportérů glukózy, aby splnily své energetické požadavky prostřednictvím zvýšené glykolýzy, přestože je výtěžek ATP nižší ve srovnání s oxidační fosforylací (Semenza, 2011).

Hypoxie ovlivňuje různé buněčné procesy včetně angiogeneze, erytropoézy a metabolismu železa. HIF-1 stimuluje produkci vaskulárního endoteliálního růstového faktoru, který podporuje tvorbu nových krevních cév a zlepšuje tak přísun kyslíku do tkání. Také zvyšuje produkci erythropoetinu, což zvyšuje počet červených krvinek a zlepšuje transport kyslíku. U rakoviny hypoxie přispívá k Warburgovu efektu, kdy rakovinné buňky přednostně využívají glykolýzu i za přítomnosti kyslíku, což podporuje rychlý růst buněk a přežití v hypoxickém mikroprostředí nádoru. Toto metabolické přeprogramování je klíčové pro progresi nádoru a metastázy (Semenza, 2011).

4.2.2 Adipocyty a hypoxie

Adipocyty jsou hlavními složkami tukové tkáně, která existuje ve dvou hlavních formách: bílá tuková tkáň a hnědá tuková tkáň. Bílá tuková tkáň je primárně zodpovědná za ukládání energie, izolaci těla a ochranu vnitřních orgánů. Dosahuje toho prostřednictvím ukládání triglyceridů, které mohou být mobilizovány během období energetického deficitu. Hnědá tuková tkáň je naopak specializována na výdej energie a produkci tepla, což je proces usnadněný přítomností unikátního proteinu nazývaného rozpojovací protein 1 v jeho mitochondriích. Navíc nedávný výzkum zdůraznil třetí typ adipocytu známý jako běžové adipocyty, které vykazují vlastnosti střední mezi bílými a hnědými adipocyty. Kromě své role v ukládání energie a termogenezi jsou adipocyty také významnými endokrinními orgány, vylučujícími různé hormony a cytokiny, souhrnně nazývané adipokiny, které ovlivňují řadu fyziologických procesů včetně regulace chuti k jídlu, citlivosti na inzulín a zánětu (Rosen & Spiegelman, 2014).

Hypoxie významně ovlivňuje funkci a chování adipocytů. Jedním z primárních účinků hypoxie na adipocyty je inhibice jejich diferenciací. Preadipocyty, prekurzorové buňky adipocytů, potřebují dobře okysličené prostředí k dozrání. V hypoxických podmínkách je exprese klíčového transkripčního faktoru PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) snížena prostřednictvím hypoxie-indukovatelného faktoru 1 (HIF-1). Toto snížení brání normálnímu procesu diferenciací, čímž se inhibuje tvorba nových adipocytů. Tento mechanismus slouží jako potenciální brzda pro nábor nových tukových buněk během obezity, což je v souladu s pozorováním, že počet adipocytů je u dospělých lidí relativně konstantní (Anvari & Bellas, 2021).

Za normoxických podmínek se adipocyty spoléhají na mitochondriální OXPHOS pro produkci ATP, ale během hypoxie je nucen metabolický posun od OXPHOS ke glykolýze, procesu známému jako Pasteurův efekt. Tento posun je zprostředkován HIF-1 α , který downreguluje mitochondriální biogenezi a funkci a současně upreguluje glykolytické enzymy. Zhoršená mitochondriální funkce za hypoxie vede ke snížené oxidaci mastných kyselin a zvýšené akumulaci lipidů v adipocytech, což zhoršuje obezitu a inzulínovou rezistenci. Navíc hypoxií indukovaná mitochondriální dysfunkce zvyšuje produkci ROS, což přispívá k oxidačnímu stresu a dalším metabolickým poruchám (Andrés Juan et al., 2021; Anvari & Bellas, 2021).

Hypoxie také vyvolává významné změny v genové expresi zralých adipocytů. Expresí více než 1 000 genů je změněna, což ovlivňuje různé metabolické dráhy a funkce. Klíčovou adaptací je přechod z OXPHOS na anaerobní glykolýzu, což vede ke zvýšenému příjmu a využití glukózy. Tento metabolický přepínač je zprostředkován HIF-1, který zvyšuje exprese glukózových transportérů jako GLUT1, aby usnadnil zvýšený vstup glukózy do buněk. Důsledkem je výrazné zvýšení produkce laktátu, což odráží zvýšenou glykolytickou aktivitu. Tento laktát je exportován z buněk prostřednictvím monokarboxylátových transportérů, jejichž exprese je také indukována hypoxií.

Navíc k změnám v genové expresi adipocytů a následné zvýšené produkci laktátu, je hypoxickými podmínkami také výrazně modulovaná sekrece adipokinů. Hypoxie stimuluje produkci prozánětlivých adipokinů, jako je leptin, VEGF (vaskulární endoteliální růstový faktor) a IL-6, zatímco potlačuje sekreci adiponektinu, hormonu s protizánětlivými a inzulin-senzibilizačními vlastnostmi. Zvýšení leptinu a snížení adiponektinu je zvláště významné, protože přispívá k rozvoji inzulinové rezistence, což je charakteristický znak metabolické dysfunkce při obezitě. Zvýšené hladiny VEGF při hypoxii mají za cíl podpořit angiogenezi a zlepšit dodávku kyslíku do tkáně, ačkoliv tato odpověď často nestačí k potlačení hypoxického prostředí.

Hypoxií-indukované změny v genové expresi, celulárního pH a v sekreci adipokynů přispívají k dysregulaci odpovědi imunitního systému a podpoře zánětlivé prostředí v tukové tkáni. Dále k tomuto přispívá stabilizace HIF-1 v adipocytech což vede k sekreci různých zánětlivých cytokinů. Tato zánětlivá odpověď je ještě dále zesílena činností makrofágů a dalších stromálních vaskulárních buněk přítomných v tkáni. Hypoxií indukovaný zánět je klíčovým faktorem v patogenezi obezitou spojených metabolických poruch, jelikož podporuje chronický stav nízko-úrovňového zánětu, který narušuje normální metabolické procesy v těle. Dalším významným důsledkem hypoxie v rámci odpovědi imunitního systému v tukové tkáni je indukce fibrózy. Hypoxie podporuje exprese složek extracelulární matrix a enzymů zapojených do křížového spojování kolagenu, jako je lysyl oxidáza. To vede ke ztuhnutí matrix tukové tkáně, což zhoršuje její roztažitelnost a dále zhoršuje metabolickou dysfunkci. Fibróza v tukové tkáni je spojena s vážnější zánětlivou odpovědí a větší inzulinovou rezistencí, což přispívá k celkovému zhoršení metabolického zdraví při obezitě.

4.2.3 Adipocity a mitochondriální metabolismus vápníku

Intracelulární Ca^{2+} ovlivňuje různé buněčné procesy a funkci MCU komplexu při regulaci Ca^{2+} ve vztahu k inzulinové rezistenci a metabolické dysfunkci. Použitím modelů obézních a diabetických hlodavců, stejně jako lidských vzorků, studie analyzovali genovou expresi a příjem mitochondriálního kalcia v tukové tkáni. Zjistili zvýšený příjem Ca^{2+} a zvýšenou expresi několika komponent MCU v inzulin-rezistentních adipocytech, zejména ve viscerální tukové tkáni během progresu obezity a diabetu. Hladiny Ca^{2+} byly normalizovány ve viscerální tukové tkáni pacientů po bariatrické operaci. Pomocí genetické manipulace aktivity MCU v 3T3-L1 adipocytech, buňky, které jsou odvozeny z myších embryonálních fibroblastů. Změny v koncentraci mitochondriálního Ca^{2+} ovlivňují mitochondriální metabolismus, včetně aktivity oxidačních enzymů, respirace, membránového potenciálu a tvorby ROS. Navíc bylo zjištěno, že zvýšené mitochondriální Ca^{2+} je spojeno se zvýšeným uvolňováním prozánětlivých cytokinů IL-6 a $\text{TNF}\alpha$, což naznačuje, že změněný tok mitochondriálního Ca^{2+} v adipocytech hraje významnou roli v obezitě a diabetu (Wright et al., 2017).

Mitochondriální signály Ca^{2+} hrají roli v progresi rakoviny, ovlivňující řadu buněčných procesů, jako je energetický metabolismus, přežití buněk a metastázy. Studie zkoumaly účinky kondicionovaného média z kultur tukové tkáně, obohaceného o prekurzorové buňky, na mitochondriální homeostázu Ca^{2+} v rakovinných buňkách. Mezi tukovou tkání z různých částí těla a konkrétními typy rakovinných buněk existují specifické interakce, například preadipocyty odvozené z viscerální tukové tkáně ovlivnily signály mitochondriálního Ca^{2+} v buňkách rakoviny jícnu, zatímco preadipocyty odvozené z podkožní tukové tkáně ovlivnily trojitě negativní buňky rakoviny prsu. Dále byly identifikovány kreatin a kreatinin jako významné metabolity uvolňované prekurzorovými buňkami adipocytů, které zvyšují příjem mitochondriálního Ca^{2+} a tím podporují migraci a proliferaci rakovinných buněk (De Mario et al., 2024).

5 Závěr

Tato bakalářská práce zkoumala klíčovou roli mitochondrií v regulaci homeostázy Ca^{2+} a vliv hypoxie na tento proces, zejména v adipocytech. Práce zdůraznila, jak hypoxie narušuje funkci mitochondrií, což vede k změněné homeostázi Ca^{2+} , zvýšené produkci reaktivních forem kyslíku (ROS) a aktivaci apoptotických drah. Dále zdůrazňuje význam udržování mitochondriální homeostáze Ca^{2+} pro buněčné zdraví a upozorňuje na škodlivé účinky hypoxie na tuto rovnováhu. Pokroky v pochopení základních mechanismů a zkoumání potenciálních terapeutických strategií mohou v budoucnu významně přispět k vývoji účinných léčebných postupů pro metabolická onemocnění spojená s hypoxií indukovanou mitochondriální dysfunkcí.

Studie ukazují, že hypoxií indukovaná mitochondriální dysfunkce v adipocytech přispívá k závažným metabolickým poruchám, včetně obezity a diabetes mellitus 2. typu. Hypoxie ovlivňuje MCU a další mitochondriální transportéry, což způsobuje akumulaci Ca^{2+} v cytosolu a jejich pokles v mitochondriích, čímž dochází k narušení funkce mitochondrií. Toto narušení vede k zvýšené produkci ROS, která dále zhoršuje buněčný stres, metabolickou dysregulaci a následně dysregulaci imunitní odpovědi.

Budoucí výzkum by se mohl zaměřit na několik potenciálních aplikací a směrů. Za prvé, zkoumání terapeutických strategií k modulaci MCU by mohlo poskytnout nové možnosti léčby metabolických onemocnění. Například cílení na MCU nebo jiné související proteiny by mohlo pomoci obnovit správnou homeostázi Ca^{2+} a zmírnit nepříznivé účinky hypoxie na funkci mitochondrií. Za druhé pochopení vztahu hypoxie a mitochondriální dysfunkce, se zaměřením na dráhy HIF-1 α a jiné související s mitochondriální biogenezí, by mohlo vést k vývoji cílených intervencí zaměřených na snížení produkce ROS a prevenci apoptózy v adipocytech. Jelikož se ukázalo, že HIF-1 α hraje klíčovou roli v adaptaci buněk na nízké hladiny kyslíku podporou glykolýzy a snížením mitochondriální spotřeby kyslíku, modulace aktivity HIF-1 α by mohla nabídnout nové terapeutické strategie k zmírnění metabolických dysfunkcí spojených s hypoxií. Dále pochopení složitého vzájemného vztahu mezi tukovou tkání a nádorovými buňkami, který je zprostředkovaný mitochondriálními signály Ca^{2+} , je kritická oblast výzkumu. Je zde potenciál cílené terapie zaměřené na tuto dráhu jako účinnou intervenci u rakovin spojených s obezitou.

6 Seznam literatury

(sekundární zdroje jsou označeny *)

- Anderson, S. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290.
- Andrés Juan, C., Manuel Pérez de la Lastra, J., Plou, F. J., Pérez-Lebeña, E. & Reinbothe, S. (2021). Molecular Sciences The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies. *Int. J. Mol. Sci*, 22, 4642. <https://doi.org/10.3390/ijms>
- Anvari, G. & Bellas, E. (2021). Hypoxia induces stress fiber formation in adipocytes in the early stage of obesity. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00335-1>
- Báthori, G., Csordás, G., Garcia-Perez, C., Davies, E. & Hajnóczky, G. (2006). Ca²⁺-dependent control of the permeability properties of the mitochondrial outer membrane and voltage-dependent anion-selective channel (VDAC). *Journal of Biological Chemistry*, 281(25), 17347–17358. <https://doi.org/10.1074/jbc.M600906200>
- Baughman, J. M., Perocchi, F., Girgis, H. S., Plovanich, M., Belcher-Timme, C. A., Sancak, Y., Bao, X. R., Strittmatter, L., Goldberger, O., Bogorad, R. L., Kotliansky, V. & Mootha, V. K. (2011). Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*, 476(7360), 341–345. <https://doi.org/10.1038/nature10234>
- Bayrhuber, M. (2008). *Structure of the human voltage-dependent anion channel* (Vol. 105, Issue 40).
- Benard, G., Faustin, B., Passerieux, E., Galinier, A., Rocher, C., Bellance, N., Delage, J.-P., Casteilla, L., Letellier, T., Rossignol, R. & Ros, R. (2006). Physiological diversity of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Am J Physiol Cell Physiol*, 291, 1172–1182. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00195.2006>.-To
- Bereiter-Hahn, J. (1990). Behavior of Mitochondria in the Living Cell. In *INTERNATIONAL REVIEW OF CYTOLOGY* (Vol. 122).

- Bereiter-Hahn, J. & Voth, M. (1994). Dynamics of Mitochondria in Living Cells: Shape Changes, Dislocations, Fusion, and Fission of Mitochondria. In *MICROSCOPY RESEARCH AND TECHNIQUE* (Vol. 27).
- *Bernardi, P., Gerle, C., Halestrap, A. P., Jonas, E. A., Karch, J., Mnatsakanyan, N., Pavlov, E., Sheu, S. S. & Soukas, A. A. (2023). Identity, structure, and function of the mitochondrial permeability transition pore: controversies, consensus, recent advances, and future directions. In *Cell Death and Differentiation* (Vol. 30, Issue 8, pp. 1869–1885). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41418-023-01187-0>
- Brown, K. A. (2009). Intermittent Hypoxia and the Practice of Anesthesia. In *Anesthesiology* (Vol. 110). www.anesthesiology.com.
- Camara, A. K. S., Zhou, Y. F., Wen, P. C., Tajkhorshid, E. & Kwok, W. M. (2017). Mitochondrial VDAC1: A key gatekeeper as potential therapeutic target. In *Frontiers in Physiology* (Vol. 8, Issue JUN). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00460>
- Carafoli, E. & Lehninger, A. L. (1971). A Survey of the Interaction of Calcium Ions with Mitochondria from Different Tissues and Species. In *Biochem. J* (Vol. 122).
- Chandel, N. S., Maltepe, E., Goldwasser, E., Mathieu, C. E., Simon, M. C. & Schumacker, P. T. (1998). Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. In *Cell Biology* (Vol. 95). www.pnas.org.
- Colombini, M. (1979). A candidate for the permeability pathway of the outer mitochondrial membrane. *Nature*, 279(5714), 643–645.
- Colombini, M. (1987). *Characterization of Channels Isolated from Plant Mitochondria*.
- Csordás, G., Renken, C., Várnai, P., Walter, L., Weaver, D., Buttle, K. F., Balla, T., Mannella, C. A. & Hajnóczky, G. (2006). Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. *Journal of Cell Biology*, 174(7), 915–921. <https://doi.org/10.1083/jcb.200604016>
- *De Mario, A., Trevellin, E., Piazza, I., Vindigni, V., Foletto, M., Rizzuto, R., Vettor, R. & Mammucari, C. (2024). Mitochondrial Ca²⁺ signaling is a hallmark of specific adipose tissue-cancer crosstalk. *Scientific Reports*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-55650-0>

- *Denton, R. M. & McCormack, J. G. (1990). Ca^{2+} as a second messenger within mitochondria of the heart and other tissues. In *Annu. Rev. Physiol* (Vol. 52). www.annualreviews.org
- Dong, WT., Long, LH., Deng, Q. et al. Mitochondrial fission drives neuronal metabolic burden to promote stress susceptibility in male mice. *Nat Metab* 5, 2220–2236 (2023). <https://doi.org/10.1038/s42255-023-00924-6>
- Durigon, R., Mitchell, A. L., Jones, A. W., Manole, A., Mennuni, M., Hirst, E. M., Houlden, H., Maragni, G., Lattante, S., Doronzio, P. N., Dalla Rosa, I., Zollino, M., Holt, I. J. & Spinazzola, A. (2018). LETM 1 couples mitochondrial DNA metabolism and nutrient preference. *EMBO Molecular Medicine*, 10(9). <https://doi.org/10.15252/emmm.201708550>
- Formenti, G., Rhie, A., Balacco, J., Haase, B., Mountcastle, J., Fedrigo, O., Brown, S., Capodiferro, M. R., Al-Ajli, F. O., Ambrosini, R., Houde, P., Koren, S., Oliver, K., Smith, M., Skelton, J., Betteridge, E., Dolucan, J., Corton, C., Bista, I., ... Bukhman, Y. (2021). Complete vertebrate mitogenomes reveal widespread repeats and gene duplications. *Genome Biology*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s13059-021-02336-9>
- *Garbincius, J. F. & Elrod, J. W. (2022). Mitochondrial Calcium Exchange in Physiology and Disease. In *Physiological Reviews* (Vol. 102, Issue 2, pp. 893–992). American Physiological Society. <https://doi.org/10.1152/physrev.00041.2020>
- *Gray, M. W., Burger, G. & Ranz Lang, B. (2001). *The origin and early evolution of mitochondria A mitochondrial genomics perspective*. <http://genomebiology.com/2001/2/6/reviews/1018>. <http://genomebiology.com/2001/2/6/reviews/1018>
- Hackenbrock, C. R. (1966). *ULTRASTRUCTURAL BASES FOR METABOLICALLY LINKED MECHANICAL ACTIVITY IN MITOCHONDRIA I. Reversible Ultrastructural Changes with Change in Metabolic Steady State in Isolated Liver Mitochondria*.
- Hiller, S., Garces, R. G., Malia, T. J., Orekhov, V. Y., Colombini, M. & Wagner, G. (2008). Solution structure of the integral human membrane protein VDAC-1 in detergent micelles. *Science*, 321(5893), 1206–1210. <https://doi.org/10.1126/science.1161302>
- Hodge, T. & Colombini, M. (1997). *Regulation of Metabolite Flux through Voltage-Gating of VDAC Channels*.

- Huang, H., Hu, X., Eno, C. O., Zhao, G., Li, C. & White, C. (2013). An interaction between Bcl-xL and the Voltage-dependent Anion Channel (VDAC) promotes mitochondrial Ca²⁺ uptake. *Journal of Biological Chemistry*, 288(27), 19870–19881. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.448290>
- Jaśkiewicz, M., Moszyńska, A., Króliczewski, J. et al. The transition from HIF-1 to HIF-2 during prolonged hypoxia results from reactivation of PHDs and HIF1A mRNA instability. *Cell Mol Biol Lett* 27, 109 (2022). <https://doi.org/10.1186/s11658-022-00408-7>
- *Keith, B., Johnson, R. S. & Simon, M. C. (2012). HIF1 α and HIF2 α : sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 12, Issue 1, pp. 9–22). <https://doi.org/10.1038/nrc3183>
- Kirichok, Y., Krapivinsky, G. & Clapham, D. E. (2004). The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature*, 427(6972), 360–364.
- Korhonen, J. A., Pham, X. H., Pellegrini, M. & Falkenberg, M. (2004). Reconstitution of a minimal mtDNA replisome in vitro. *EMBO Journal*, 23(12), 2423–2429. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600257>
- Kristián, T. & Siesjö, B. K. (1998). Calcium in ischemic cell death. In *Stroke* (Vol. 29, Issue 3, pp. 705–718). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1161/01.STR.29.3.705>
- Lewis, S. C., Uchiyama, L. F. & Nunnari, J. (2016). ER-mitochondria contacts couple mtDNA synthesis with Mitochondrial division in human cells. *Science*, 353(6296). <https://doi.org/10.1126/science.aaf5549>
- Liao, P. C., Bergamini, C., Fato, R., Pon, L. A. & Pallotti, F. (2020). Isolation of mitochondria from cells and tissues. In *Methods in Cell Biology* (Vol. 155, pp. 3–31). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2019.10.002>
- Liu, M. Y. & Colombini, M. (1992). Regulation of mitochondrial respiration by controlling the permeability of the outer membrane through the mitochondrial channel, VDAC. In *Biochimica et Biophysica Acta* (Vol. 1098).
- Mallilankaraman, K., Cárdenas, C., Doonan, P. J., Chandramoorthy, H. C., Irrinki, K. M., Golenár, T., Csordás, G., Madireddi, P., Yang, J., Müller, M., Miller, R., Kolesar, J. E., Molgó, J., Kaufman, B., Hajnóczky, G., Foskett, J. K. & Madesh, M. (2012). MCUR1 is

- an essential component of mitochondrial Ca^{2+} uptake that regulates cellular metabolism. *Nature Cell Biology*, 14(12), 1336–1343. <https://doi.org/10.1038/ncb2622>
- Mannella, C., Ribeiro, A. & Frank, J. (1986). Structure of the Channels in the Outer Mitochondrial Membrane: Electron Microscopic Studies of the Periodic Arrays Induced by Phospholipase a2 Treatment of the Neurospora membrane. *Biophysical Journal*, 49(1), 307–318. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(86\)83643-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(86)83643-8)
- Mannella, C. & Bonner, W. (1975). BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF THE OUTER MEMBRANES OF PLANT MITOCHONDRIA. In *Biochimica et Biophysica Acta* (Vol. 413).
- *Mishra, P. & Chan, D. C. (2014). Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 15, Issue 10, pp. 634–646). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrm3877>
- *Modesti, L., Danese, A., Vitto, V. A. M., Ramaccini, D., Aguiari, G., Gafà, R., Lanza, G., Giorgi, C. & Pinton, P. (2021). Mitochondrial Ca^{2+} signaling in health, disease and therapy. In *Cells* (Vol. 10, Issue 6). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells10061317>
- Nanduri, J., Vaddi, D. R., Khan, S. A., Wang, N., Makarenko, V., Semenza, G. L. & Prabhakar, N. R. (2015). HIF-1 α activation by intermittent hypoxia requires NADPH oxidase stimulation by xanthine oxidase. *PLoS ONE*, 10(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119762>
- Nowikovsky, K. & Bernardi, P. (2014). LETM1 in mitochondrial cation transport. In *Frontiers in Physiology: Vol. 5 FEB*. Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00083>
- Oxenoid, K., Dong, Y., Cao, C., Cui, T., Sancak, Y., Markhard, A. L., Grabarek, Z., Kong, L., Liu, Z., Ouyang, B., Cong, Y., Mootha, V. K. & Chou, J. J. (2016). Architecture of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*, 533, 269–273. <https://doi.org/10.1038/nature17656>
- Palade, G. E. (1952). The Fine Structure of Mitochondria. *Anat Rec*, 114(3), 427–451.
- Palmer, J. W., Tandler, B. & Hoppel, C. L. (1977). Biochemical properties of subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria isolated from rat cardiac muscle. *Journal of Biological Chemistry*, 252(23), 8731–8739. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)75283-1](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)75283-1)

- Palty, R., Silverman, W. F., Hershfinkel, M., Caporale, T., Sensi, S. L., Parnis, J., Nolte, C., Fishman, D., Shoshan-Barmatz, V., Herrmann, S., Khananshvili, D. & Sekler, I. (2010). NCLX is an essential component of mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchange. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(1), 436–441. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908099107>
- Pangborn, M. C. (1945). A simplified preparation of cardiolipin, with note on purification of lecithin for serologic use. *The Journal of Biological Chemistry*, 161, 71–82. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)41523-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)41523-7)
- Paradies, G., Petrosillo, G., Pistolese, M., Di Venosa, N., Federici, A. & Ruggiero, F. M. (2004). Decrease in Mitochondrial Complex I Activity in Ischemic/Reperfused Rat Heart: Involvement of Reactive Oxygen Species and Cardiolipin. *Circulation Research*, 94(1), 53–59. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000109416.56608.64>
- Pastorino, J. G. & Hoek, J. B. (2008). Regulation of hexokinase binding to VDAC. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 40(3), 171–182. <https://doi.org/10.1007/s10863-008-9148-8>
- Payne, R., Li, C. & Foskett, J. K. (2020). Variable Assembly of EMRE and MCU Creates Functional Channels with Distinct Gatekeeping Profiles. *IScience*, 23(4). <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101037>
- Ramos, E. S., Motori, E., Brüser, C., Kühl, I., Yeroslaviz, A., Ruzzenente, B., Kauppila, J. H. K., Busch, J. D., Hultenby, K., Habermann, B. H., Jakobs, S., Larsson, N. G. & Mourier, A. (2019). Mitochondrial fusion is required for regulation of mitochondrial DNA replication. *PLoS Genetics*, 15(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008085>
- Ramsay, R. R. (2019). Electron carriers and energy conservation in mitochondrial respiration. *ChemTexts*, 5(2). <https://doi.org/10.1007/s40828-019-0085-4>
- *Rizzuto, R., De Stefani, D., Raffaello, A. & Mammucari, C. (2012). Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 13, Issue 9, pp. 566–578). <https://doi.org/10.1038/nrm3412>
- Robin, E. D. & Wong, R. (1988). Mitochondrial DNA Molecules and Virtual Number of Mitochondria per Cell in Mammalian Cells. In *JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY*.

- *Rosen, E. D. & Spiegelman, B. M. (2014). What we talk about when we talk about fat. In *Cell* (Vol. 156, Issues 1–2, pp. 20–44). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.012>
- Sagan, L. (1967). On the Origin of Mitosing Clds. In *J. Theoret. Biol* (Vol. 14).
- Schein, S. J., Colombini, M. & Finkelstein, A. (1976). Reconstitution in Planar Lipid Bilayers of a Voltage-Dependent Anion-Selective Channel Obtained from Paramecium Mitochondria. In *J. Membrane Biol* (Vol. 30). Knowles & Racker.
- Schwerzmann, K., Hoppeler, H., Kayar, S. R. & Weibel, E. R. (1989). Oxidative capacity of muscle and mitochondria: Correlation of physiological, biochemical, and morphometric characteristics (mitochondrial membranes/enzymes/respiratory chain/stereology/maximal oxygen consumption). In *Cell Biology* (Vol. 86).
- *Semenza, G. L. (2011). Hypoxia-inducible factor 1: Regulator of mitochondrial metabolism and mediator of ischemic preconditioning. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* (Vol. 1813, Issue 7, pp. 1263–1268). <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.08.006>
- Shobatake, R., Ota, H., Takahashi, N., Ueno, S., Sugie, K. & Takasawa, S. (2022). The Impact of Intermittent Hypoxia on Metabolism and Cognition. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 21). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms232112957>
- Sparagna, G. C., Gunter, K. K., Sheu, S.-S. & Gunter, T. E. (1995). *Mitochondrial Calcium Uptake from Physiological-type Pulses of Calcium A DESCRIPTION OF THE RAPID UPTAKE MODE**. <http://www.jbc.org/>
- *Spinelli, J. B. & Haigis, M. C. (2018). The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism. In *Nature Cell Biology* (Vol. 20, Issue 7, pp. 745–754). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0124-1>
- *Tait, S. W. G. & Green, D. R. (2010). Mitochondria and cell death: Outer membrane permeabilization and beyond. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 11, Issue 9, pp. 621–632). <https://doi.org/10.1038/nrm2952>
- *Trayhurn, P. (2013). Hypoxia and Adipose Tissue Function and Dysfunction in Obesity. *Physiol Rev*, 93, 1–21. <https://doi.org/10.1152/physrev.00017.2012>. -The

- Trayhurn, P., Wang, B. & Wood, I. S. (2008). Hypoxia in adipose tissue: A basis for the dysregulation of tissue function in obesity? *British Journal of Nutrition*, 100(2), 227–235. <https://doi.org/10.1017/S0007114508971282>
- Ujwal, R., Cascio, D., Colletier, J.-P., Faham, S., Zhang, J., Toro, L., Ping, P., Abramson, J. & Kaback, H. R. (2008). *The crystal structure of mouse VDAC1 at 2.3 Å resolution reveals mechanistic insights into metabolite gating*. www.pnas.org/cgi/content/full/
- Vance, J. E. (1990). Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 265(13), 7248–7256. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)39106-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)39106-9)
- *Westermann, B. (2010). Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 11, Issue 12, pp. 872–884). <https://doi.org/10.1038/nrm3013>
- Wright, L. E., Vecellio Reane, D., Milan, G., Terrin, A., Di Bello, G., Belligoli, A., Sanna, M., Foletto, M., Favaretto, F., Raffaello, A., Mammucari, C., Nitti, D., Vettor, R. & Rizzuto, R. (2017). Increased mitochondrial calcium uniporter in adipocytes underlies mitochondrial alterations associated with insulin resistance. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 313(6), E641–E650. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00143.2016>
- Xu, Z., Zhang, D., He, X., Huang, Y. & Shao, H. (2016). Transport of Calcium Ions into Mitochondria. In *Current Genomics* (Vol. 17).
- Yamamoto, T., Yamada, A., Watanabe, M., Yoshimura, Y., Yamazaki, N., Yoshimura, Y., Yamauchi, T., Kataoka, M., Nagata, T., Terada, H. & Shinohara, Y. (2006). VDAC1, having a shorter N-terminus than VDAC2 but showing the same migration in an SDS-polyacrylamide gel, is the predominant form expressed in mitochondria of various tissues. *Journal of Proteome Research*, 5(12), 3336–3344. <https://doi.org/10.1021/pr060291w>