

Rozdział 5

Ultrastruktura komórki zwierzęcej. Bioenergetyka

Krzysztof Zabłocki

Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego, PAN, ul. Pasteura 3, 02-093
Warszawa, email: k.zablocki@nencki.gov.pl

Wprowadzenie + Błony komórkowe + Budowa komórki w zarysie + Mitochondria i energetyka komórki (bioenergetyka) + Rys historyczny + Mitochondria - budowa i działanie + Renesans „mitochondriologii” + Organizacja mitochondriów i ich oddziaływanie z innymi organellami + Mitochondria w regulacji sygnalizacji wapniowej i śmierci komórek + Reaktywne formy tlenu, mitochondrialne DNA i choroby mitochondrialne + Podsumowanie

Wprowadzenie

W rozdziale tym będzie mowa o komórkach. Nie ma organizmów zdolnych do samodzielnego życia mniejszych, mniej złożonych niż komórka; wszystkie organizmy zbudowane są z komórek. Dlatego poznanie budowy i funkcjonowania tych najmniejszych „jednostek biologicznych” ma fundamentalne znaczenie i jest fascynującym, ale i trudnym wyzwaniem dla biologa. W obecnym rozdziale poruszone będą dwa aspekty dotyczące komórek: ultrastruktura i metabolizm energetyczny. Oba zasługują na osobne obszerne opracowania. Ale można też podjąć próbę ich wspólnego omówienia, szukając związków między organizacją wnętrza komórki i procesami energetycznymi. W przypadku tych drugich uwaga będzie skupiona przede wszystkim na syntezie ATP zachodzącej w mitochondriach, chociaż trzeba zdać sobie sprawę z tego, bioenergetyka komórki nie jest ograniczona do przemian mitochondrialnych. A zatem, punktem centralnym tego artykułu są mitochondria, ich budowa, mechanizm oksydacyjnej fosforylacji oraz liczne inne funkcje w komórce na tle ogólnej organizacji i struktury komórki. Zanim jednak przejdziemy do tych fascynujących zagadnień, konieczne jest nakreślenie ogólnego tła.

Trudność badania komórek polega między innymi na tym, że z reguły są bardzo małe. Typowa komórka zwierzęca ma średnicę 10-20 μM , a zatem jest pięć razy mniejsza niż to, co jest dostrzegalne gołym okiem. Ponadto zazwyczaj jest przezroczysta i prawie bezbarwna. A zatem badanie komórek wymaga stosowania specjalnych, i w miarę rozwoju tej dyscypliny nauki, coraz bardziej wyszukanych i precyzyjnych narzędzi i umiejętności. Wśród narzędzi najbardziej poczesne miejsce zajmuje mikroskop. Ten prosty początkowo przyrząd wynaleziony w XVII wieku przez Antonine van Leeuwenhoek, a następnie przez Roberta Hooke'a wprowadził badaczy w świat gołym okiem niedostrzegalny. To właśnie dzięki obserwacjom mikroskopowym wprowadzono termin komórka, a niecałe sto lat później badania z użyciem mikroskopu pozwoliły na sformułowanie tzw. teorii komórkowej (Schleiden i Schwann, 1838) i narodziny nowej, wyodrębnionej dyscypliny naukowej – biologii komórki.

Współczesne mikroskopy, charakteryzujące się dużą rozdzielczością umożliwiają nie tylko powiększanie oglądanych komórek, ale także precyzyjne oglądanie ich wnętrza. Ale już w 1857 roku, Kölliker obserwował mitochondria w komórkach mięśniowych, a w 1898 roku Camilo Golgi zastosował technikę barwienia preparatów azotanem srebra, dzięki czemu dostrzegł struktury nazwane od jego nazwiska aparatem Golgiego. Dzisiaj metody barwienia komórek i tkanek, a także metody ich utrwalania i cięcia na skrawki w celu otrzymania preparatów o grubości kilku mikrometrów stanowią kanon technik mikroskopowych.

Początek lat 30-tych XX wieku przyniósł skonstruowanie mikroskopu interferencyjnego oraz mikroskopu kontrastowo-fazowego. Oba przyrządy pozwoliły na stosunkowo precyzyjne oglądanie komórek bez konieczności ich barwienia. Jednak prawdziwym przełomem w badaniach komórek stało się zastosowanie mikroskopii fluorescencyjnej. Daje ona możliwość wybiórczego znakowania (i przez to obserwacji struktur wewnątrzkomórkowych) przy pomocy chemicznych znaczników fluorescencyjnych lub przeciwciał połączonych ze znacznikami fluorescencyjnymi, skierowanych przeciwko konkretnym białkom (po raz pierwszy posłużyli się tą techniką Lazarides i Weber w 1974 r.). Milowym krokiem było wykorzystanie rekombinowanych białek fluorescencyjnych, lokalizujących się specyficznie w wybranych przedziałach komórki (Chalfie i wsp.

1994, odkrycie białka o zielonej fluorescencji GFP (ang.: *Green Fluorescent Protein*) oraz zastosowanie mikroskopii konfokalnej, w której znaczniki fluorescencyjne są wzbudzane światłem lasera, dzięki czemu możliwe jest uzyskanie bardzo ostrego obrazu na określonej głębokości w przekroju komórki i uzyskiwanie zdjęć warstwowych.

Niezależnie od rozwoju metod mikroskopii optycznej, której głównym ograniczeniem jest rozdzielczość (0,2 μm), przełomem w rozwoju badań nad komórkami było wynalezienie i zastosowanie w badaniach biologicznych mikroskopu elektronowego. Początki tego wynalazku przypadają na rok 1931 (Ruska i wsp.), a w 1952 skonstruowano pierwszy transmisyjny mikroskop elektronowy (Palade, Porter, Sjöstrand,). Mikroskop elektronowy umożliwia obserwacje z rozdzielczością 2 nm, a zatem ok. stukrotnie większą niż w przypadku najlepszych mikroskopów świetlnych.

Nie tylko rozwój mikroskopii przyczynił się do postępu w poznawaniu ultrastruktury komórki. Opracowanie metod izolowania poszczególnych składników komórki otworzyło drogę do badania wybranych frakcji komórkowych i scharakteryzowania właściwych im procesów molekularnych.

W 1926 roku Svedberg skonstruował pierwszą ultrawirówkę analityczną, dzięki której wyznaczył masę hemoglobiny. W 1935 roku skonstruowano wirówkę preparatywną i w 1938 roku, Behrens wykorzystał ją w celu oddzielenia jąder od cytoplazmy komórek wątroby. W latach 40-tych i 50-tych rozwijano technikę wirowania w celu izolowania frakcji zawierających poszczególne typy organelli. Z badaniami tymi wiążą się nazwiska Claude'a, Brachema i Hogebooma. W 1940 udało się wyizolować mitochondria (Albert Claude), a w 1954 de Duve otrzymał lizosomy i peroksysomy. W 1951 roku Bakke wprowadził technikę wirowania w gradiencie sacharozy, dzięki czemu zwiększono czystość i jednorodność uzyskiwanych frakcji komórkowych.

Nie trzeba jednak bardzo wyrafinowanych metod, żeby dostrzec, że komórki są niesłychanie zróżnicowane pod względem wielkości, wyglądu i funkcji. W niniejszym rozdziale ograniczymy nasze rozważania do komórki zwierzęcej. A zatem odkładamy na bok organizmy prokariota, a także eukariotyczne komórki

organizmów zaliczanych do protista, grzybów oraz roślin. Ale nawet tak zawężając obszar zainteresowań spotykamy się z wielką różnorodnością.

Zgodnie z definicją cytologiczną, komórka składa się z jądra i cytoplazmy i jest ograniczona błoną plazmatyczną stanowiącą jej najbardziej zewnętrzną warstwę. Taki uproszczony obraz komórki zwierzęcej staje się znacznie bardziej skomplikowany, jeżeli przyjrzymy się dokładniej temu, co kryje się pod nazwą cytoplazma. Dostrzeżemy wtedy, że jest to twór niejednorodny, zawierający wiele ziarnistości nieoblionionych oraz struktur, których podstawowym elementem budulcowym jest błona, niekiedy pojedyncza, a czasami podwójna, czyli dwie błony. Struktury te, zwane organellami, zanurzone są w fazie wodnej zawierającej liczne rozpuszczone substancje drobno i wielkocząsteczkowe oraz elementy cytoszkieletu, tworzącej tzw. cytoplazmę podstawową, często nazywaną cytosolem¹.

Przedmiotem tego artykułu jest ultrastruktura komórki i bioenergetyka. Ultrastruktura kojarzy się przede wszystkim, ale nie wyłącznie z przedziałowością, natomiast bioenergetyka z mitochondriami. Spróbujemy, zatem połączyć oba te zagadnienia, przyjmując mitochondria za punkt centralny naszych rozważań.

Przedziałowość jest cechą komórek eukariota. Oznacza ona, że w komórce można wyróżnić wyodrębnione obszary, oddzielone od innych. Mówimy, że w komórce znajdują się oblione organella (w odróżnieniu od organelli nieoblionionych). Do oblionych organelli znajdujących się w komórce zwierzęcej należy jądro komórkowe, mitochondria, peroksysomy, lizosomy, aparat Golgiego, endosomy oraz siateczka śródplazmatyczna. Jądro i mitochondria charakteryzują się tym, że mają błonę podwójną (dwie błony) natomiast pozostałe organella są utworzone przez pojedynczą błonę białkowo-lipidową.

Nie ulega zatem wątpliwości, że kluczową rolę w tworzeniu przedziałów komórkowych odgrywają błony. Dzięki nim komórka jest tworem wyodrębnionym

¹ W istocie termin „cytosol” oznacza supernatant (nadsącz) uzyskany po odwirowaniu homogenatu komórkowego przez godzinę przy przyspieszeniu ponad 100 000 x g. Jest to roztwór całkowicie pozbawiony organelli oblionych. Dla uproszczenia, w dalszej części tekstu termin ten będzie stosowany w znaczeniu „cytoplazma podstawowa”.

ze środowiska oraz zawiera w swoim wnętrzu również wyodrębnione substrukтуры, charakteryzujące się własnym mikrośrodowiskiem, co umożliwia przebieg procesów wymagających innych warunków (np. stopnia kwasowości) lub udziału innych białek i metabolitów, a także magazynowanie wybranych substancji. Szczególne właściwości błon pozwalają na ich wybiórczą przepuszczalność oraz selektywne i regulowane komunikowanie się organelli, co umożliwia synchronizację procesów w nich zachodzących. A zatem dalsze rozważania dotyczące struktur komórkowych warto poprzedzić krótkim przypomnieniem podstawowych wiadomości o błonach komórkowych².

Błony komórkowe

Wspólną cechą wszystkich błon komórkowych jest ich natura białkowo-lipidowa. Oznacza to, że wszystkie błony zbudowane są z lipidów i białek. To proste zdanie z jednej strony oddaje sedno sprawy, a z drugiej niewiele tłumaczy. Nie tłumaczy dlatego, że samych lipidów istnieje wiele klas, a w obrębie każdej klasy wiele wariantów. Różnorodność białek jest tym bardziej oczywista. A zatem jaki jest skład błon i jak uporządkowane są ich składniki? Odpowiedź na to pytanie nie przyszła od razu, ale jej znalezienie miało fundamentalne znaczenie.

Podstawowymi, ale nie jedyymi lipidami tworzącymi błonę komórkową są fosfolipidy. Jest to duża klasa związków, w której wyróżnia się glicerofosfolipidy (fosfatydylocholina, fosfatydyloseryna, fosfatydyloetanolamina, fosfatydyloinozytol oraz difosfatydyloglicerol zwany kardioliną) oraz sfingolipidy (np. sfingomielina). Wspólną cechą fosfolipidów jest tzw. amfipatyczność, czyli połączenie dwóch różnych cech w jednej cząsteczce. Tymi cechami jest hydrofilność, czyli powinowactwo do wody (tendencja do rozpuszczania się w wodzie) oraz hydrofobowość, czyli brak tego powinowactwa natomiast wysokie powinowactwo do środowisk niepolarnych – lipidowych (tendencja do rozpuszczania się w

² Błonami komórkowymi będziemy nazywać wszystkie błony występujące w komórce, a nie tylko błonę najbardziej zewnętrzną, która będzie nazywana „błoną plazmatyczną”.

lipidach, ale nie w wodzie). W cząsteczce fosfolipidu wyróżnia się część hydrofilową (głowę) oraz hydrofobowy ogon. Dzięki takiej budowie, cząsteczki fosfolipidów umieszczone w środowisku wodnym mają naturalną dążność do samoorganizowania się w pęcherzyki, w taki sposób żeby części hydrofobowe nie miały kontaktu z wodą natomiast hydrofilowe głowy były eksponowane do środowiska wodnego. Jedną z możliwości takiego uorganizowania jest utworzenie pęcherzyków przez tzw. dwuwarstwę lipidową. Oznacza to, że fosfolipidy tworzą błonę o grubości dwóch cząsteczek lipidu tak, że hydrofilowe głowy tworzą powierzchnie zewnętrzne, natomiast hydrofobowe ogony są zwrócone do wewnątrz, gdzie kontaktują się ze sobą, ale nie mają kontaktu z wodą. Taka dwuwarstwa lipidowa, której istnienie po raz pierwszy zasugerowali w latach 20-tych ubiegłego stulecia Gorter i Grendel, stanowi zrab wszelkich błon komórkowych. Poza fosfolipidami w błonach komórkowych może występować cholesterol oraz cukrowe pochodne sfingolipidów (glikosfingolipidy). Dokładny skład lipidowy błon nie jest uniwersalny. Zależy od rodzaju tkanki oraz od rodzaju struktury wewnątrzkomórkowej.

O ile uporządkowanie dwuwarstwy lipidowej było stosunkowo łatwo wyobrażalne, to organizacja błony jako struktury lipidowo-białkowej nie od razu została zrozumiana. Obecność białek w błonach komórkowych została zasugerowana w 1932 roku przez S. Cole, a w 1953 r. James Danieli oraz Hugh Davson zaproponowali pierwszy model błony komórkowej. Zakładał on, że dwuwarstwa lipidów stanowiąca rdzeń błony jest z obu stron opłaszczona warstwą białek. Model ten cieszył się dużym uznaniem do końca lat 50. ubiegłego wieku. Jego udoskonaloną wersją był tzw. model błony elementarnej stworzony w 1957 roku przez Robertsona w oparciu o wyniki badań uzyskanych z zastosowaniem mikroskopii elektronowej. Lata 60. XX wieku to okres dalszych poszukiwań uwieńczonych w roku 1972 stworzeniem modelu tzw. płynnej mozaiki. Model ten, zwany też modelem Singera-Nicolsona od nazwisk jego twórców, obowiązuje z niewielkimi modyfikacjami do dzisiaj. Jego główną cechą, odróżniającą go od wcześniejszych modeli statycznych jest dynamiczna natura. Jak we wcześniejszych modelach, również w modelu mozaikowym zrębem błony jest dwuwarstwa lipidowa. Natomiast białka mogą być związane z powierzchnią błony lub w

różnym stopniu zanurzone w lipidach. Niektóre z nich mogą nawet zajmować cały przekrój błony, inne zanurzone są tylko w jednej warstwie lipidów i kontaktują się z powierzchnią błony, a jeszcze inne są całkowicie zanurzone i nie wystają poza warstwę lipidową. Struktura taka może ulegać przebudowie. Wynika to z płynności warstw lipidowych, pozwalającej na przemieszczanie się białek w płaszczyźnie błony oraz ich rotację. Wbrew jednak pierwszym ocenom, płynność błony i możliwość ruchu białek nie oznacza przypadkowości i dowolności rozmieszczenia poszczególnych cząsteczek. Błony komórkowe są asymetryczne (to znaczy, że skład lipidowy warstw lipidów tworzących dwuwarstwę jest niejednakowy) i w ich strukturze można wyodrębnić obszary charakteryzujące się zwiększoną obecnością określonych typów lipidów i białek. Obszary te nazywane domenami błonowymi mają charakter dynamiczny. Przykładami takich domen są tzw. tratwy (*ang.: rafts*) charakteryzujące się zwiększoną ilością cholesterolu i sfingolipidów oraz tworzące wpuklenia błonie plazmatycznej kaweole, charakteryzujące się dodatkowo obecnością specyficznego białka zwanego kaweoliną. Odkrycie domen w błonach komórkowych miało przełomowe znaczenie dla zrozumienia mechanizmów przekazywania sygnałów, transportu pęcherzykowego, oddziaływania pomiędzy strukturami wewnątrzkomórkowymi czy wymiany lipidów. Było poważnym rozwinięciem modelu błony mozaikowej. Twórcą koncepcji tratw lipidowych był Kai Simon, fiński profesor biochemii mieszkający i pracujący w Niemczech, jeden z inicjatorów założenia Instytutu Maksa Plancka Biologii Molekularnej i Genetyki. Z badaniem kaweoli wiąże się natomiast nazwisko amerykańskiego uczonego Richarda Andersona. Ogólny model błony jako płynnej mozaiki ma charakter uniwersalny. Trzeba jednak pamiętać, że błony tworzące różne organella nie są jednakowe, a różnice dotyczą zarówno składu lipidowego jak i białek.

Budowa komórki w zarysie

Najbardziej zewnętrzną częścią komórki zwierzęcej jest błona plazmatyczna. Jej obecność została zasugerowana już w 1855 roku przez Carla Nageli, który obserwował różnice w przenikaniu barwników do komórek roślinnych uszkodzonych w porównaniu z nieuszkodzonymi. Błona ta oddziela komórkę od

środowiska zewnętrznego. Oprócz fosfolipidów zawiera też obojętne sfingolipidy oraz cholesterol uczestniczący w tworzeniu tratw lipidowych. Na zewnętrznej powierzchni błony znajduje się otoczka utworzona przez łańcuchy cukrowe przyłączone do białek i niektórych lipidów, zwana glikokaliksem. W błonie plazmatycznej znajdują się białka receptorowe, kanały jonowe, białka transportujące i pompy jonowe. Dzięki istnieniu pompy sodowo-potasowej oraz kanałów potasowych w poprzek błony plazmatycznej utrzymywany jest potencjał elektryczny.

Drugim, łatwo zauważalnym składnikiem komórki jest jądro komórkowe, odkryte w 1831 r. przez Roberta Browna. Jego wnętrze wypełnia tzw. macierz jądrowa (zwana też kariolimfą), w której znajduje się jąderko oraz chromatyna utworzona przez DNA kodujący ponad 99% informacji genetycznej komórki histony, białka niehistonowe i małą ilość RNA. Kształt jądra, od kulistego, po wrzecionowaty oraz wielkość zależą od rodzaju komórki i ilości chromatyny. Macierz jądrowa jest białkowym elementem strukturalnym jądra. W jej skład wchodzi blaszka jądrowa (lamina) oraz kompleksy białkowe wyścielające tzw. pory jądrowe znajdujące się w otoczce jądra. Sama otoczka ta jest najbardziej zewnętrzną częścią jądra komórkowego. Jest utworzona przez podwójną błonę płynnie przechodzącą w siateczkę śródplazmatyczną. Pory jądrowe tworzą się w miejscach styku obu błon otoczki.

Wśród wszystkich organelli komórkowych, siateczka śródplazmatyczna zwana też retikulum endoplazmatycznym jest najbardziej rozbudowaną strukturą błonową w komórce. Tworzy ona system błon w postaci kanalików, pęcherzyków i spłaszczonych woreczków. W obrazie mikroskopowym łatwo można wyróżnić siateczkę szorstką, z licznymi rybosomami na błonie oraz siateczkę gładką. Ta pierwsza jest miejscem syntezy białek, które dojrzewają i są modyfikowane w siateczce śródplazmatycznej, natomiast siateczka gładka uczestniczy w biosyntezie hormonów sterydowych, lipidów, glikogenu oraz jest miejscem detoksykacji ksenobiotyków. W cysternach siateczki śródplazmatycznej znajdują się liczne białka m.in. białka opiekuńcze uczestniczące w procesie dojrzewania innych białek, a także białka wiążące wapń, dzięki którym siateczka śródplazmatyczna jest głównym magazynem tego kationu w komórkach. W związku z tą funkcją w błonie

siateczki śródplazmatycznej znajdują się kanały dla jonów wapnia sprzężone z receptorami wrażliwymi na cytosolowe czynniki aktywujące sygnał wapniowy. Ponadto występuje tam specyficzna pompa wapniowa umożliwiająca akumulację Ca^{2+} wbrew gradientowi stężenia. Odbywa się to kosztem energii uwalnianej w czasie hydrolizy ATP.

Na terenie cytoplazmy łatwo zauważamy też liczne struktury pęcherzykowate tworzące aparat Golgiego. W cysternach aparatu Golgiego magazynowane są białka zsyntetyzowane na rybosomach szorstkiej siateczki śródplazmatycznej, następuje ich segregacja i modyfikacje np. glikozylacja. Struktura ta jest także miejscem syntezy polisacharydów i mukopolisacharydów. Ponadto w aparacie Golgiego powstają i dojrzewają pęcherzyki, z których część uczestniczy w sekrecji i ich zawartość np. kolagen są wydzielane z komórki. Inne, zawierające w swoim wnętrzu enzymy hydrolityczne w tym proteazy, a także nukleazy i fosfatazy pozostają w komórce jako lizosomy pierwotne. Wnętrze lizosomów ma odczyn kwaśny, co odpowiada wymaganiom znajdujących się wewnątrz enzymów. Jest to do pewnego stopnia zabezpieczeniem komórki przez autodestrukcją w wypadku uszkodzenia błony lizosomalnej. Lizosomy uczestniczą w procesach heterofagii i autofagii tworząc lizosomy wtórne zwane odpowiednio hetero- lub autofagosomami.

Do organelli utworzonych przez pojedynczą błonę należą też peroksyzomy, w których zachodzą procesy oksydoredukcyjne katalizowane przez peroksydazy i wykorzystujące nadtlenek wodoru. Między innymi zachodzą tam pierwsze etapy utleniania długołańcuchowych kwasów tłuszczowych. Ponadto w cytosolu znajduje się wiele struktur nieobłonionych takich jak rybosomy i centriole. I wreszcie w cytosolu znajdują się kluczowe dla niniejszego opracowania mitochondria. Zbudowane z dwóch błon organelle, traktowane są tradycyjnie jako „siłownie komórek”, będą szczegółowo omówione w dalszej części tego opracowania.

Budowa komórki zwierzęcej jest dokładnie omawiana w licznych podręcznikach szkolnych i akademickich, toteż czytelnik bez trudu znajdzie wszelkie potrzebne informacje. Dlatego w obecnym rozdziale nie będzie dokładnie opisywana, natomiast szczególna uwaga skupiona będzie na mitochondriach, omawianych zarówno w aspekcie strukturalnym jak i w szerokim kontekście

komórkowych procesów energetycznych. Poruszone też będą zagadnienie dotyczące oddziaływań mitochondriów z innymi organellami. Jest to jedno z najintensywniej badanych, niedawno odkrytych zjawisk dotyczących nie tylko mitochondriów, ale także siateczki śródplazmatycznej, błony plazmatycznej i być może także innych organelli. W tych rozważaniach zbliżymy się do problemu ultrastruktury komórki.

Mitochondria i energetyka komórki (bioenergetyka)

Rys historyczny

Jeżeli zajrzemy do encyklopedii lub słownika terminów biologicznych, dowiemy się, że termin „bioenergetyka” oznacza dział biochemii, zajmujący się procesami przekształcania i wykorzystywania energii w komórkach, ale także, że jest to część metabolizmu komórki obejmująca zespół procesów chemicznych i fizycznych pozwalających na przekształcanie energii uwalnianej podczas procesów katabolicznych do postaci, w której może być wykorzystywana przez komórki. Jako końcowy rezultat tych przemian najczęściej mamy na myśli fosforylację ADP do ATP.

Procesy bioenergetyczne w komórce zwierzęcej zachodzą w różnych przedziałach. Przede wszystkim w cytosolu (glikoliza) oraz w mitochondriach. Chociaż w naszych rozważaniach skoncentrujemy się na tych drugich, należy pamiętać, że glikoliza jest szlakiem metabolicznym zachodzącym w większości komórek zwierząt i poprzedza mitochondrialne procesy oddechowe wtedy, gdy wyjściowym substratem energetycznym jest glukoza. Powstały w wyniku glikolitycznych przekształceń glukozy pirogronian jest pobierany przez mitochondria gdzie ulega dalszym przemianom w cyklu kwasów trikarboksylowych. W niektórych komórkach zwierząt glikoliza jest jedynym sposobem pozyskiwania energii. Wtedy wytworzony pirogronian jest redukowany do mleczanu. Mówimy wtedy o glikolizie w warunkach beztlenowych. Warto wiedzieć, że w badaniach nad glikolizą w komórkach mięśni wielkie zasługi położył polski uczoney Jakub Karol Parnas pracujący w latach 1920-1942 na

Uniwersytecie Stefana Batorego we Lwowie. Dlatego szlak tych przemian bywa nazywany szlakiem Embdena-Meyerhofa-Parnasa, na cześć jego badaczy i odkrywców.

Mitochondria były opisane po raz pierwszy w drugiej połowie XIX wieku jako małe granule o różnej wielkości. Zmiana koloru zieleni janusowej, znacznika wykorzystanego do barwienia mitochondriów, była zapewne pierwszą wskazówką, że w organellach tych zachodzą procesy oksydoredukcyjne. Ten pośredni wniosek został potwierdzony w 1913 roku przez Otto Warburga, który wykazał, że zawiesina cząstek uzyskanych w wyniku rozdrobnienia tkanki pobiera tlen. W bez mała dwadzieścia lat później rosyjski badacz Władimir Aleksandrowicz Engelhardt zdołał powiązać fosforylację ADP do ATP z procesami oksydacyjnymi. W ten sposób wykazał, że ATP może powstawać nie tylko w trakcie glikolizy, ale też w związku z procesami tlenowymi. Odkrycia te zbiegły się w czasie z opisaniem przez Hansa Krebsa cyklu przemian metabolicznych zwanych cyklem kwasów trikarboksylowych (lub cyklem Krebsa), w czasie którego utleniany jest pirogronian powstały wcześniej w cytosolu w wyniku glikolizy. Odkrycie to zostało wyróżnione w 1953 roku nagrodą Nobla. Produktami cyklu Krebsa, który zachodzi w macierzy mitochondrialnej są NADH i FADH₂. Są to tzw. równoważniki redukujące, będące bezpośrednimi donorami elektronów w procesach oddechowych. Ponadto w cyklu tym uwalniany jest CO₂.

Kolejne lata to okres poszukiwań mechanizmu, który związałby procesy oksydacyjne z fosforylacją ATP i jednocześnie początek epoki największych triumfów bioenergetyki i szerzej, nauki o mitochondriach. Pierwszą ze sformułowanych koncepcji była tzw. „hipoteza chemicznego sprzężenia” zaproponowana w latach 40. przez Fritza Lipmanna, urodzonego w Królewcu i pracującego w USA, późniejszego laureata nagrody Nobla (1953 r. za odkrycie koenzymu A, wraz z Hansem Krebsem). Hipoteza ta dobrze tłumaczyła wiele obserwacji dotyczących oksydacyjnej fosforylacji i miała swoich zwolenników jeszcze w latach 60. mimo, że nigdy nie znaleziono bezpośrednich dowodów jej słuszności i ostatecznie ją odrzucono.

Prawdziwy przełom w tych badaniach nastąpił wraz z opracowaniem techniki frakcjonowania homogenatów tkankowych z wykorzystaniem wirowania

różnicowego. Zastosowanie tej metody w 1940 roku przez Alberta Claude'a pozwoliło na uzyskiwanie dużych ilości względnie oczyszczonej zawiesiny mitochondriów. Wykorzystywanie izolowanych mitochondriów niezwykle ułatwiło interpretację uzyskiwanych wyników doświadczalnych, ponieważ pozwoliło na uniezależnienie się od pozamitochondrialnych procesów fosforylacji ADP i wykorzystywania ATP. Lata 50., 60., 70. ubiegłego stulecia to okres wielkich odkryć i wielkich triumfów bioenergetyki jako niezwykle dynamicznie rozwijającej się dziedziny biochemii. Przede wszystkim poszukiwano zależności ilościowej między zużyciem tlenu a wytwarzaniem ATP. Z badaniami tymi wiąże się nazwiska amerykańskich uczonych Davida E. Greena, Brittona Chanca, Alberta L. Lehningera oraz pracującego w Holandii Edwarda C. Slatera. Ich prace doprowadziły do ustalenia stechiometrii oksydacyjnej fosforylacji wyrażanej stosunkiem P/O, czyli liczby moli fosforanu wykorzystanego do fosforylacji, do liczby moli zużytego tlenu (lub utlenionego substratu). Dzięki temu ustalono, że podczas utleniania jednej cząsteczki NADH lub FADH₂ (powstałych, np. w cyklu Krebsa) dochodzi do fosforylacji odpowiednio trzech lub dwóch cząsteczek ADP. Określono także, w których miejscach łańcucha oddechowego dochodzi do sprzężenia transportu elektronów z syntezą ATP, czyli innymi słowy, którym reakcjom w łańcuchu oddechowym towarzyszą takie zmiany potencjału oksydoredukcyjnego, które są ze względów energetycznych wystarczające do wytworzenia ATP z ADP i fosforanu nieorganicznego. Podobne wyniki zostały uzyskane przez Chance'a i Williamsa, którzy dodatkowo wprowadzili pojęcie współczynnika kontroli oddechowej, czyli parametru, który wyrażał stopień sprzężenia oksydacyjnej fosforylacji z transportem elektronów w łańcuchu oddechowym. W okresie tym mechanizm sprzężenia tłumaczono istnieniem hipotetycznych wysokoenergetycznych pośredników (hipoteza sprzężenia chemicznego). Jej orędownikiem był Edward C. Slater, australijskiego pochodzenia uczoney, pracujący początkowo w Cambridge pod kierunkiem Davida Keilina, odkrywcy cytochromu c a następnie jako kierownik laboratorium a później instytutu na Uniwersytecie w Amsterdamie. Hipoteza ta znajdowała także potwierdzenia w pracach Larsa Ernster'a i Martina Klingenberg'a. Ostatecznie, nie oparła się krytyce i została odrzucona.

Równoległe z badaniami dotyczącymi stechiometrii syntezy ATP podejmowane były próby izolowania i oczyszczania białek mitochondrialnych zaangażowanych w oksydacyjną fosforylację. Na szczególne podkreślenie zasługują badania prowadzone przez Efraima Rackera, których efektem była identyfikacja tzw. czynników sprzęgających F1 i Fo, które okazały się podjednostkami mitochondrialnej syntazy ATP. Obserwacje z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej prowadzone przez Fernández–Morán pozwoliły przypisać aktywność enzymatyczną odpowiednim strukturom identyfikowanym na wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Co więcej, prace te wykazały, że łańcuch oddechowy oraz aktywność ATPazy, chociaż powiązane funkcjonalnie, są rozdzielne fizycznie i mogą funkcjonować niezależnie. Co prawda, odłączenie części katalitycznej ATPazy od błony mitochondrialnej sprawia, że możliwa jest tylko hydroliza a nie synteza ATP, ale ponowna asocjacja obu elementów przywraca zdolność do fosforylacji z jednoczesnym zużyciem tlenu. W efekcie prace Rackera poddały w wątpliwość koncepcje chemicznego (i w istocie strukturalnego) sprzężenia oddychania i fosforylacji.

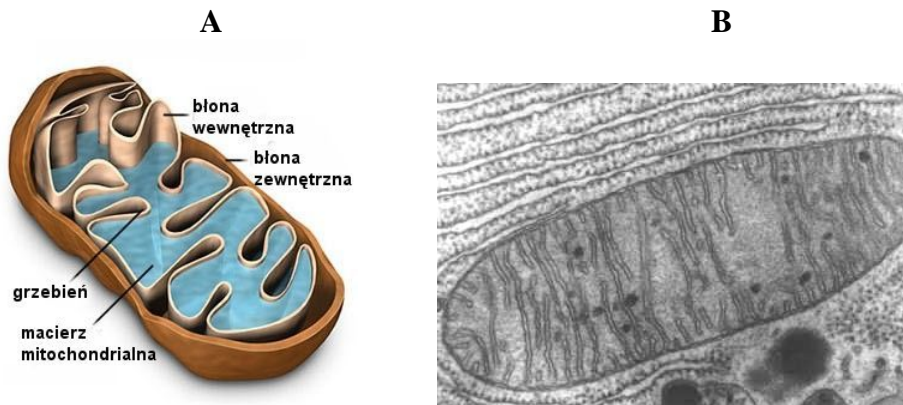
W 1961 roku ukazała się publikacja napisana przez Petera Mitchella całkowicie podważająca dotychczasowe wyjaśnienia mechanizmu sprzężenia oksydacyjnej fosforylacji. W miejsce hipotetycznych i jak się okazało nieistniejących wysokoenergetycznych pośredników Mitchell zaproponował potencjał elektrochemiczny utworzony przez protony nie równocześnie rozmieszczone po obu stronach wewnętrznej błony mitochondriów. Tak utworzony gradient protonowy (siła protonomotoryczna) byłby utworzony kosztem energii uwalnianej w trakcie transportu elektronów w łańcuchu oddechowym. Hipoteza Mitchella, za której sformułowanie otrzymał w 1978 roku nagrodę Nobla z chemii, w sposób prosty i wyczerpujący zarazem wyjaśniała wszystkie zjawiska i wcześniejsze obserwacje dotyczące oksydacyjnej fosforylacji. Tworzony w czasie oddychania gradient protonowy może być wykorzystywany nie tylko do „napędzania” oksydacyjnej fosforylacji, ale może także umożliwiać transport jonów i metabolitów przez wewnętrzną błonę mitochondrialną.

Hipoteza Mitchella, chociaż w elegancki sposób łączyła transport elektronów w łańcuchu oddechowym z oksydacyjną fosforylacją, nie wyjaśniała sposobu w

jaki siła protonomotoryczna mogła by być przekształcana w energię zdolną do wykonania pracy chemicznej jaką jest fosforylacja ATP.

Dopiero prace Paula Boyera i Johna Walkera wyróżnione w 1997 r. nagrodą Nobla wyjaśniły ten skomplikowany mechanizm. Ich odkrycie miało swoje początki już w latach 50. XX wieku, gdy Boyer zaproponował tak zwaną konformacyjną hipotezę sprzężenia oksydacyjnej fosforylacji. Była to alternatywa do koncepcji chemicznego sprzężenia i zakładała, że procesom oksydoredukcyjnym w mitochondriach towarzyszą zmiany konformacji białek tworzących łańcuch oddechowy. Hipoteza ta w swoim oryginalnym sensie nie wytrzymała konkurencji z teorią chemicznoosmotycznego sprzężenia stworzoną przez Mitchella. Dopiero rozwój nowoczesnych technik badania konformacji białek pozwolił dostrzec, że koncepcja Mitchella nie wyklucza odpowiednio zmodyfikowanej hipotezy Boyera, a przeciwnie oba pomysły dobrze się uzupełniają. Okazało się, bowiem, że zmiany konformacyjne dotyczą opisywanych wcześniej przez Rackera czynników sprzęgających, czyli mitochondrialnej ATPazy. To właśnie to białko ulega zmianom konformacyjnym na skutek przepływu protonów. A zatem zmiany te są na koszt siły protonomotorycznej utworzonej przez łańcuch oddechowy. Przekłada się to na zmiany powinowactwa enzymu do ADP, fosforanu i ATP oraz umożliwia przejściowe odpowiednie ustawienie przestrzenne substratów.

Sformułowanie w 1962 roku przez Petera Mitchella hipotezy chemiczno-osmotycznego sprzężenia, oraz wyjaśnienie mechanizmu syntezy ATP w mitochondriach przez Paula Boyera i Johna Walkera, zakończyły wieloletnie zmagania, których celem było zrozumienie kluczowego procesu energetycznego w komórce, jakim jest oksydacyjna fosforylacja. Dzięki tym uczonym ustalono to, co dzisiaj jest przyjęte jako kanon bioenergetyki mitochondriów. Spróbujmy to krótko podsumować.

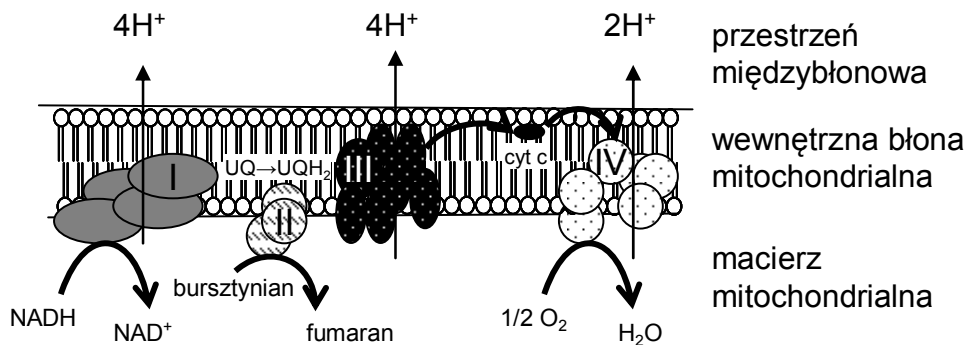
Mitochondria – budowa, działanie

Ryc. 1. A, Uproszczony schemat; B, obraz uzyskany w mikroskopie elektronowym

Zewnętrzna błona mitochondriów jest gładka, natomiast błona wewnętrzna jest mocno pofalowana tworząc tzw. grzebienie mitochondrialne wydajnie zwiększające jej powierzchnię. Błona ta jest miejscem oksydacyjnej fosforylacji. Przestrzeń zamknięta między tymi błonami nazywana jest przestrzenią międzybłonową, natomiast najbardziej wewnętrzna przestrzeń ograniczona błoną wewnętrzną to macierz mitochondrialna. W macierzy znajdują się enzymy katalizujące przemiany metaboliczne takie jak cykl kwasów trikarboksylowych oraz β -oksydacja kwasów tłuszczowych. W zewnętrznej błonie mitochondrialnej znajduje się białko zwane poryną mitochondrialną (VDAC, Voltage-Dependent Anion Channel). Tworzy ono kanały czyniąc tę błonę potencjalnie przepuszczalną dla cząsteczek o masie do 5 kDa. Obecnie wiadome jest, że przepuszczalność ta jest regulowana i nie wszystkie rodzaje substancji przenikają przez tę błonę z tą samą łatwością. Ponadto VDAC bierze udział w oddziaływaniach mitochondriów z innymi organelami

Kluczowe znaczenie dla oksydacyjnej fosforylacji w komórkach eukariota ma wewnętrzna błona mitochondrialna. Jak wszystkie błony, zbudowana jest z fosfolipidów z tą jednak różnicą, że jednym z nich jest fosfolipid typowy dla mitochondriów - kardiolipina. Drugą cechą odróżniającą wewnętrzną błonę mitochondrialną od przeciętnej błony komórkowej jest wysoki, osiągający 80% udział białek. Zazwyczaj stosunek ilościowy białek do lipidów w błonach wynosi 1 : 1. Wewnętrzna błona mitochondrialna (tak jak inne błony białkowo-lipidowe) pozwala na bierne, swobodne przenikanie jedynie nielicznych substancji takich jak gazy rozpuszczone w wodzie i związki niepolarne, rozpuszczające się w lipidach błony. Natomiast jest nieprzepuszczalna dla substancji polarnych np. dla substratów wykorzystywanych w macierzy mitochondrialnej, w tym oczywiście dla jonów.

Wśród białek znajdujących się w wewnętrznej błonie mitochondrialnej dominują te, które są związane z przetwarzaniem energii. A zatem białka tworzące kompleksy łańcucha oddechowego, mitochondrialna ATP-aza, zwana też syntazą ATP, która katalizuje wytwarzanie ATP z ADP i nieorganicznego fosforanu, oraz liczne białka uczestniczące w przenoszeniu związków drobnocząsteczkowych wykorzystywanych lub wytwarzanych w mitochondriach. Należą do nich białka transportujące ADP do mitochondriów a powstały w nich ATP do przestrzeni międzybłonowej, oraz białka transportujące substraty energetyczne ulegające utlenianiu w macierzy mitochondrialnej, takie jak pirogronian lub odpowiednio przekształcone kwasy tłuszczowe. Ponadto w błonie tej znajdują się też białka bezpośrednio niezwiązane z procesami bioenergetycznymi, ale konieczne dla prawidłowego funkcjonowania mitochondriów. Należą do nich m.in. białka uczestniczące w transporcie do mitochondriów tych białek, które są kodowane w DNA jądrowym i których przeznaczeniem są te organella.



Ryc. 2. Fragment błony z kompleksami łańcucha oddechowego

Pomiędzy kompleksami oddechowymi znajdują się tzw. przekaźniki elektronów: ubichinon (UQ) ulegający dwustopniowej redukcji najpierw do ubisemichinonu, a następnie ubichionolu oraz cytochrom c. Transportowi elektronów wzdłuż łańcucha oddechowego towarzyszy przenoszenie jonów wodoru (protonów) z macierzy mitochondrialnej do przestrzeni międzybłonowej. Odbyna się to z udziałem kompleksów I, III i IV, które mają aktywności pomp protonowych zasilanych energią uwalnianą w czasie reakcji oksydoredukcji. Energia ta umożliwia utworzenie różnicy stężenia protonów w poprzek błony. Tworzy się potencjał elektrochemiczny jonów wodoru, czyli tzw. siła protonomotoryczną. Ma ona składową elektryczną wynikającą z różnicy ładunków oraz składową chemiczną wynikającą z różnicy stężeń jonów. W przypadku jonów wodoru różnica stężeń wyrażana jest w postaci różnicy stopnia kwasowości (pH)

Sednem mitochondrialnych przemian energetycznych jest łańcuch oddechowy (Ryc. 2). Zbudowany jest z czterech kompleksów białkowych zwanych też kompleksami oddechowymi, zanurzonych w lipidach wewnętrznej błony. W skład tych kompleksów wchodzi w sumie ok. 80 białek. Piątym kompleksem jest syntaza ATP, która nie jest częścią łańcucha oddechowego, ale jest z nim funkcjonalnie związana tworząc system oksydacyjnej fosforylacji.

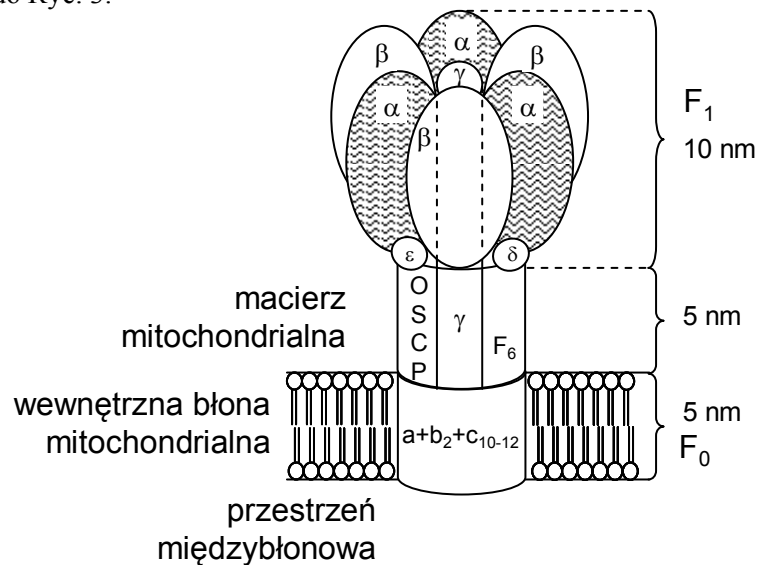
Donorem elektronów dla łańcucha oddechowego są zredukowane dinukleotydy (NADH i FADH₂). Powstają one w cyklu Krebsa, a także w trakcie utleniania kwasów tłuszczowych w mitochondriach. Elektrony są przekazywane wzdłuż łańcucha oddechowego zgodnie z rosnącym potencjałem oksydoredukcyjnym. Ostatecznym akceptorem elektronów jest tlen cząsteczkowy (O₂) ulegający redukcji czteroelektronowej. Dlatego końcowym produktem utleniania substratów oddechowych jest woda.



Procesom oksydoredukcyjnym w łańcuchu oddechowym towarzyszy spadek tzw. energii swobodnej układu. Mówiąc prościej, stan w którym w mitochondrium w warunkach tlenowych znajdują się zredukowane nukleotydy jest mniej korzystny energetycznie niż stan, w którym nukleotydy są utlenione. Dlatego naturalną tendencją jest utlenianie NADH lub FADH₂ i uwalnianie energii. Jednakże, w przeciwieństwie do niekontrolowanego procesu utleniania, jakim jest np. palenie się kartki papieru (w tym przypadku również zmniejsza się energia swobodna układu), w czasie utleniania w mitochondriach energia jest uwalniana stopniowo. Wynika to stąd, że reakcje oksydoredukcyjne w łańcuchu oddechowym są procesami enzymatycznymi i ich szybkość jest regulowana wydolnością katalityczną każdego z nich. Część uwalnianej energii jest rozpraszana w postaci ciepła, natomiast część jest przejściowo „utrwalana” w postaci potencjału mitochondrialnego. Potencjał ten jest zdolny do wykonania pracy, w tym pracy chemicznej polegającej na fosforylacji ADP do ATP. To oczywiste obecnie stwierdzenie jest sednem teorii chemicznoosmotycznego sprzężenia.

Synteza ATP w mitochondriach jest katalizowana przez mitochondrialną ATPazę zwaną też, ze względu na „fizjologiczny” kierunek reakcji „syntazą ATP”.

Fosforylacja ADP jest procesem wymagającym nakładu energii. Zachodzi ona kosztem potencjału protonowego, którego „rozładowanie” wymusza zmiany konformacyjne w cząsteczce enzymu. Bardziej szczegółowo jest to opisane w legendzie do Ryc. 3.



Rys. 3. ATPaza (syntaza ATP)

Mitochondrialna ATPaza katalizuje reakcję między ADP i nieorganicznym fosforanem. Reakcji tej towarzyszy odłączenie cząsteczki wody, a zatem fosforylacja ADP jest odwróceniem reakcji hydrolizy ATP. Enzym ten jest zbudowany z kilku rodzajów podjednostek. W jego skomplikowanej budowie można wyróżnić fragment transbłonowy zwany F_0 (jedna podjednostka a , dwie podjednostki b i 10-12 podjednostek c) oraz „głowę” (podjednostka F_1) znajdującą się po stronie macierzy mitochondrialnej (po 3 podjednostki α i β oraz po jednej podjednostce δ i ϵ). F_0 i F_1 są połączone elementem łącznikowym (po jednej podjednostce γ , F_6 i OSCP – *oligomycin sensitivity-conferring protein*). Protony nierównocześnie rozłożone po obu stronach błony powracają zgodnie z gradientem potencjału do macierzy mitochondrialnej przez kanał utworzony w części błonowej ATP-azy. Ten przepływ wymusza zmiany konformacji białek fragmentu F_0 , powodujące obracanie się tej części ATP-azy. Powoduje to cykliczne zmiany konformacji w części katalitycznej enzymu („głowa”). Każda z par $\alpha\beta$ przechodzi przez trzy stadia przemian konformacyjnych, podczas których dochodzi do związania ADP i fosforanu, reakcji między tymi substratami i uwolnienia ATP. Synteza jednej cząsteczki ATP wymaga przepływu 3 protonów z przestrzeni międzybłonowej do macierzy mitochondrialnej. Ponieważ część katalityczna ATPazy zawiera 3 układy $\alpha\beta$ będące w kolejnych stadiach konformacyjnych, to podczas pełnego obrotu podjednostki F_0 uwalniane są 3 cząsteczki ATP

Dlatego warunkiem koniecznym dla zajścia oksydacyjnej fosforylacji jest to, by mitochondria były sprzężone (sprzężenie oksydacyjnej fosforylacji). Sprzężenie to oznacza, że wewnętrzna błona mitochondrialna jest w stanie utrzymywać wysoki potencjał elektrochemiczny (wynosi on ok. 180-240 mV). Czynniki zwiększające przepuszczalność wewnętrznej błony mitochondrialnej dla protonów uniemożliwiają utworzenie takiego potencjału. Mówimy wtedy, że mitochondria są rozsprzężone. W takich warunkach transport elektronów i zużywanie tlenu są bardzo szybkie, ale nie może dojść do syntezy ATP. Cała energia uwalniana w czasie procesów oksydoredukcyjnych jest rozpraszana w postaci ciepła.

W pionierskim okresie badań nad metabolizmem energetycznym mitochondriów niewątpliwie prym wiedli badacze ze Stanów Zjednoczonych oraz Europy Zachodniej. Należy jednak wspomnieć o tym, że w Polsce istniały w tamtym okresie ośrodki naukowe zajmujące się mitochondriami, których osiągnięcia niewątpliwie wpisały się w światowy nurt badań bioenergetycznych. Wśród nich była grupa badawcza kierowana przez Lecha Wojtczaka w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN. Przedmiotem jej badań były mechanizmy regulacji sprzężenia oksydacyjnej fosforylacji a wśród największych osiągnięć ustalenie roli i sposobu działania kwasów tłuszczowych jako czynników regulujących wydajność syntezy ATP w mitochondriach. W tym samym czasie zespół Zbigniewa Kaniugi pracujący na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego prowadził badania dotyczące m.in. transportu elektronów w łańcuchu oddechowym, ze szczególnym naciskiem na mechanizm działania kompleksu I. Zespół kierowany przez Jana Michejdę z Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu zajmował się oksydacyjną fosforylacją u pierwotniaków i drożdży, natomiast grupa Jerzego Popinigisa z Akademii Medycznej w Gdańsku koncentrowała swoje zainteresowania na procesach bioenergetycznych zachodzących w mięśniach. Warto dodać, że niektóre z tych zespołów z powodzeniem kontynuują badania dotyczące bioenergetyki i mitochondriów.

Renesans „mitochondriologii”

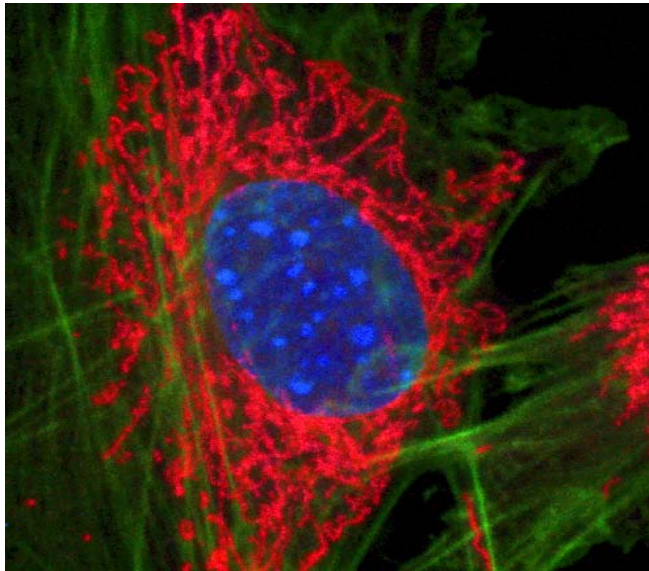
Ostateczne rozwiązanie zagadki oksydacyjnej fosforylacji zakończyło ważną erę w badaniach mitochondriów. Mogłoby się nawet wydawać, że mitochondria postrzegane przede wszystkim jako „siłownie komórki” nie kryją już tajemnic, których odsłonięcie zmieniałoby dotychczasowe poglądy. Wbrew temu jednak w latach 80. XX wieku rozpoczął się renesans badań nad mitochondriami. Impulsem były obserwacje, że mitochondria mogą uczestniczyć w przebiegu programowanej śmierci komórek. Ponadto, zaczęto doceniać rolę mitochondriów jako ważnego elementu w regulacji sygnalizacji wapniowej w komórce. Stało się też jasne, że zaburzenia funkcjonowania mitochondriów towarzyszą wielu poważnym patologiom. Co więcej, poznano wiele chorób genetycznych spowodowanych mutacjami w DNA mitochondrialnym (mtDNA). Próby łągodzenia ich skutków oraz śledzenie sposobów dziedziczenia jest poważnym wyzwaniem dla biologii i medycyny. To wszystko sprawiło, że mitochondria stały się przedmiotem wzrastającego zainteresowania i stopniowo pojawiały się w centrum uwagi nie tylko „bioenergetyków”, ale także biologów zajmujących się wieloma aspektami funkcjonowania komórek.

Zatrzymajmy się na chwile przy niektórych z nich.

Organizacja mitochondriów i ich oddziaływania z innymi organellami

Prawdziwa rewolucja dotknęła poglądów na temat wewnątrzkomórkowej organizacji i struktury mitochondriów. W pionierskich czasach bioenergetyki mitochondria opisywano jako kuliste lub owalne twory o wymiarach rzędu kilku mikrometrów, utworzone przez dwie błony, tak jak to przedstawiono schematycznie na Ryc. 1. Taki obraz, utrwalany przez lata i nadal przedstawiany w podręcznikach biologii jest tylko częściowo prawdziwy.

Obecnie dzięki rozwojowi mikroskopii elektronowej i fluorescencyjnej wiemy z całą pewnością, że mitochondria mogą być uorganizowane w postaci sieci, która jest strukturą dynamiczną (Ryc. 4).



Rys. 4. Sieć mitochondrialna

Taka organizacja mitochondriów pozwala na ich jednoczesne kontaktowanie się z różnymi strukturami komórkowymi np. błoną plazmatyczną i siateczką śródplazmatyczną, co umożliwia koordynację procesów zachodzących w różnych częściach komórki. Na zdjęciu przedstawione są mioblasty myszy. Kolor czerwony – mitochondria, zielony – cytoszkielet aktynowy, niebieski – jądro komórkowe. (Autor zdjęcia: Joanna Szczepanowska z Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie)

W wyniku zjawiska fuzji może tworzyć rozgałęzione, tubularne struktury lub ulegać fragmentacji na mniejsze fragmenty, przy czym zmiany te nie powodują zaburzeń metabolizmu energetycznego. Co istotne, fuzja lub fragmentacja mitochondriów polega na łączeniu się lub fragmentacji obu błon (zewnętrznej i wewnętrznej), a sam proces musi przebiegać bez uwalniania zawartości mitochondriów do cytosolu i nie może prowadzić do dysfunkcji organelli. Wiemy już, że w procesach tych biorą udział specyficzne białka, w dużej części należące do dużej rodziny GTPaz. Co więcej, niektóre z nich np. białko OPA1 uczestniczy nie tylko w reorganizacji sieci mitochondrialnej ale także w przebudowie grzebieni tworzonych przez wewnętrzną błonę mitochondrialną, co może mieć znaczenie dla regulacji metabolizmu tych organelli. Fragmentacja mitochondriów wymaga udziału białka Drp1 spokrewnionego z dynaminą i do pewnego stopnia przypomina tworzenie pęcherzyków endocytarnych. Taka dynamiczna natura mitochondriów

sprawia, że trudno jest oszacować liczbę tych organelli w komórce. Natomiast wyizolowane mitochondria są pofragmentowane i w istocie tworzą kuliste struktury opisywane wcześniej.

Wykazanie, że mitochondria tworzą struktury usieciowane (retikulum mitochondrialne), przez niektórych badaczy porównywane z siateczką śródplazmatyczną (retikulum endoplazmatyczne) odebrane było jako rewolucyjne nie tylko dla bioenergetyki, ale i biologii komórki. Co prawda, pierwsze obserwacje wskazujące na usieciowaną strukturę mitochondriów pochodzą z prac, które ukazały się w latach 70., lecz wówczas nie przyciągnęły uwagi badaczy. Dopiero w latach 90., w okresie renesansu „mitochondriologii” doceniono te odkrycia. Co więcej, dzięki zastosowaniu zaawansowanych technik mikroskopii elektronowej (electron microscopy tomography) udało się „zajrzeć” do wnętrza mitochondrium (Carmen Manella, 1997).

Należy jednak zaznaczyć, że nie wszystkie komórki charakteryzują się takim samym stopniem złożoności sieci mitochondrialnej. Ponadto, stopień usieciowania mitochondriów wiąże się z intensywnością ich metabolizmu, a w komórkach ulegających podziałom zmienia się wraz z cyklem komórkowym. Sieć mitochondrialna fragmentuje zazwyczaj w komórkach ulegających apoptozie, ale związek przyczynowy między apoptozą a stopniem usieciowania/pofragmentowania mitochondriów jest nadal przedmiotem dyskusji. Organizacja mitochondriów jako dynamicznej sieci umożliwia przepływ substancji w jej obrębie a także mieszanie się i równomierny rozkład mitochondrialnego DNA (co przeciwstawia się tworzeniu i utrwalaniu się mitochondriów z dominacją DNA uszkodzonego).

Organizacja mitochondriów w postaci dynamicznej sieci umożliwia jej kontaktowanie się z innymi strukturami komórkowymi np. siateczką śródplazmatyczną lub błoną plazmatyczną. Okazało się, że ma to kolosalne znaczenie między innymi w regulacji sygnalizacji i homeostazy wapniowej w komórce. W ostatnich latach pojawiło się wiele publikacji dotyczących różnych aspektów wewnątrzkomórkowej organizacji mitochondriów. Na pierwszy plan wysuwają się tu prace amerykańskich Carmen Manelli (Division of Molecular Medicine, Wadsworth Center, New York State Department of Health, Albany,

New York) oraz Richarda Youle i Mariusza Karbowskiego z NIH, Bethesda, Maryland USA, a także Luca Scorrano z Uniwersytetu w Padwie.

Zaburzenia wewnątrzkomórkowej organizacji mitochondriów w warunkach stresu spowodowanego mutacjami w DNA mitochondrialnym lub zmianami metabolizmu komórek są przedmiotem badań prowadzonych w zespole kierowanym przez Jerzego Duszyńskiego z Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie.

Mitochondria w regulacji sygnalizacji wapniowej i śmierci komórek

Nie ulega wątpliwości, że jony wapnia są jednym z najważniejszych przekaźników sygnału w komórce oraz czynnikiem regulującym aktywność licznych białek. Przez długi czas uważano, że głównym magazynem wapnia w komórkach są mitochondria. Dzisiaj wiemy, że pogląd ten (wyrażany między innymi przez Alberta Lehningera) jest w dużej mierze nieścisły, a głównym miejscem magazynowania wapnia w komórce w stanie spoczynku są cysterny siateczki śródplazmatycznej. Natomiast mitochondria są dynamicznymi buforami wapniowymi, które mogą pobierać Ca^{2+} i przejściowo akumulować wapń w swoim wnętrzu. Dzieje się to w stanach pobudzenia, kiedy stężenia Ca^{2+} w cytosolu komórek rośnie. W ten sposób mitochondria mogą lokalnie modulować stężenie Ca^{2+} w wybranych obszarach komórki i tym samym wpływać na aktywność procesów zależnych od Ca^{2+} . Ponadto jony wapnia są aktywatorami trzech kluczowych dehydrogenaz uczestniczących w metabolizmie oksydacyjnym mitochondriów, stąd odpowiednie pobieranie Ca^{2+} do mitochondriów stymuluje metabolizm tych organelli.

Siłą napędową pozwalającą na pobieranie Ca^{2+} i akumulację wapnia w mitochondriach w takich ilościach, że stężenie Ca^{2+} w macierzy mitochondrialnej przewyższa stężenie tego jonu w cytosolu jest potencjał wewnętrznej błony mitochondrialnej. Obdarzone ładunkiem dodatnim jony wapnia przemieszczają się do mitochondriów wtedy, gdy ładunek elektryczny po wewnętrznej stronie wewnętrznej błony mitochondrialnej jest ujemny. Jest to możliwe, jeżeli mitochondria są wydolne energetycznie, tzn. oddychają i są sprzężone. Co

ciekawe, chociaż napływ Ca^{2+} do mitochondriów jest badany od ponad 40 lat i jest nieźle scharakteryzowany pod względem funkcjonalnym, do tej pory nie udało się zidentyfikować białka umożliwiającego przepływ tego jonu do macierzy mitochondrialnej. Wchodzeniu Ca^{2+} do mitochondriów towarzyszy nieustanne usuwanie tego jonu do cytosolu. Odbywa się to przy udziale wymienników umożliwiających wychodzenie jednego jonu Ca^{2+} z jednoczesnym wejściem do mitochondriów trzech jonów Na^+ . A zatem wymiana ta jest elektrogenna, ale dzięki takiej stechiometrii uprzywilejowana w normalnie funkcjonujących mitochondriach. Inny rodzaj wymiennika umożliwia wypływ Ca^{2+} na wymianę z protonami. W tym przypadku „siłą napędzającą” ukierunkowany ruch jonów jest różnica stężeń H^+ (a zatem różnica pH) po obu stronach błony. Wydajność „buforowania” Ca^{2+} przez mitochondria jest wypadkową szybkości pobierania i uwalniania tego jonu. Ponieważ czynnikiem ograniczającym jest szybkość pobierania, to w istocie akumulacja wapnia w mitochondriach jest możliwa wtedy, gdy stężenie tego jonu w pobliżu mitochondriów wzrasta do wartości ok. 500 nM (wartość spoczynkowa wynosi ok. 100 nM). Wynika to stąd, że powinowactwo transportera jonów wapnia znajdującego się w wewnętrznej błonie mitochondrialnej jest bardzo niskie (ok. 10 μM). Dlatego, przy niższych stężeniach Ca^{2+} w cytosolu szybkość pobierania tego jonu przez mitochondria jest na tyle mała, że nie może przewyżżyć usuwania tego jonu do cytosolu. Przejściowa akumulacja wapnia w mitochondriach w stanach pobudzenia komórki jest jednym z mechanizmów utrzymywania właściwej homeostazy tego jonu oraz regulacji sygnalizacji wapniowej w komórce. Obecna wiedza dotycząca mitochondrialnego „metabolizmu” wapniowego jest wynikiem prac prowadzonych w wielu laboratoriach i trudno to jest wskazać jednego odkrywcę. Wśród zasłużonych na tym polu należy wymienić włoskiego uczonego Ernesto Carafoli, a także Amerykanina, Tomasa Edgara Guntera.

W stanach pobudzenia komórki stężenie Ca^{2+} w cytosolu wzrasta, ale wzrost ten nie jest jednakowy w każdym miejscu. Jest oczywiste, że jest to szczególnie wyraźne w pobliżu kanałów wapniowych znajdujących się w błonie plazmatycznej komórek oraz w siateczce śródplazmatycznej, z której Ca^{2+} jest uwalniany. Ponadto, sygnał wapniowy w komórkach ma często postać fal i oscylacji

wapniowych charakteryzujących się odpowiednią częstotliwością i amplitudą, co sprawia, że rozkład stężeń tego jonu w cytosolu jest niejednakowy i zmienny w czasie. Dlatego szybkość pobierania Ca^{2+} przez mitochondria jest niejednakowa i w dużej mierze zależy od wewnątrzkomórkowej lokalizacji tych organelli.

Buforowanie Ca^{2+} przez mitochondria nie tylko wpływa na kształt sygnału wapniowego (amplituda, częstotliwość oscylacji), ale także może mieć ochronne działanie dla komórek. Jest to szczególnie istotne w sytuacji, gdy pobudzeniu komórki towarzyszy bardzo duży lokalny wzrost stężenia Ca^{2+} , które może osiągać wartość kilkudziesięciu mikromolową. Tak dzieje się na przykład po aktywacji komórek wydzielniczych trzustki. Tak duży lokalny wzrost stężenia Ca^{2+} jest konieczny dla procesu sekrecji. Z drugiej strony, globalny wzrost stężenia Ca^{2+} w cytosolu musi być znacznie niższy. W przeciwnym wypadku mogłoby dojść do uszkodzeń komórki. W takiej sytuacji mitochondria otaczają obszar, w którym wzrost stężenia Ca^{2+} jest wyjątkowo duży i pobierając jony wapnia tworzą barierę uniemożliwiająca rozlanie się sygnału wapniowego w całej komórce. Istnieje, zatem wyraźny związek między uorganizowaniem sieci mitochondrialnej w komórce (ultrastruktura komórki) a funkcją. Innymi słowy, mitochondria w komórce tworzą populację niejednorodną pod względem funkcjonalnym.

Jony wapnia, które napływają do cytosolu w czasie pobudzenia komórki pochodzą z dwóch źródeł: Ze środowiska pozakomórkowego oraz z magazynów wewnątrzkomórkowych zlokalizowanych w siateczce śródplazmatycznej. Dlatego szczególną rolę w regulacji homeostazy wapniowej odgrywają mitochondria zlokalizowane w sąsiedztwie błony plazmatycznej oraz w pobliżu błon siateczki. Siateczka śródplazmatyczna jest najbardziej rozległym organellum komórkowym rozprzestrzenionym od otoczki jądrowej, z którą zachowuje ciągłość aż po błonę plazmatyczną. Błony wchodzące w skład siateczki stanowią ok. 50% wszystkich błon komórkowych. Nic, więc dziwnego, że siateczka śródplazmatyczna kontaktuje się z wieloma innymi strukturami, w tym szczególnie z siecią mitochondrialną. W ostatnim okresie pojawiło się wiele prac opisujących ten nowy aspekt dotyczący ultrastruktury komórki, w których podkreśla się bezpośrednio i fizyczne, a nie tylko funkcjonalne oddziaływania między siateczką śródplazmatyczną a mitochondriami. Opisano też białka, które współuczestniczą w

tworzeniu miejsc kontaktu między błonami. Te struktury kontaktowe nazywane MAM (z ang.: mitochondria associated membranes) mogą być izolowane z komórek, co potwierdza ich strukturalną stabilność. Podobnie, bliskie kontakty mitochondriów z błoną plazmatyczną komórek mogą mieć charakter oddziaływań o charakterze strukturalnym, a nie jedynie funkcjonalnym. Dające się wyizolować frakcje błon zwane PAM (z ang.: plasma membrane associated membranes), zawierają niektóre białka charakterystyczne dla mitochondriów i dla siateczki śródplazmatycznej. Istnienie takich bezpośrednich i jednocześnie dynamicznych oddziaływań między mitochondriami, siateczką śródplazmatyczną i błoną plazmatyczną jest niewątpliwie związane ze współdziałaniem tych struktur w utrzymywaniu homeostazy wapniowej w komórce.

Wśród badaczy zajmujących się wewnątrzkomórkową organizacją mitochondriów w kontekście sygnalizacji wapniowej należy wymienić Włochów Rosario Rizutto i Tulio Pozzana, którzy dostarczyli przekonujących dowodów wskazujących na oddziaływania między mitochondriami i siateczką śródplazmatyczną a także wspomnianego już Carmen Manellę, który posługując się metodą tomograficzną stworzył przestrzenny obraz uwidaczniający interakcje między tymi strukturami. Warto też wspomnieć o pracach prowadzonych w zespole Jerzego Duszyńskiego z Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN dotyczących udziału mitochondriów w regulacji tzw. pojemnościowego napływu Ca^{2+} do komórek niebudliwych elektrycznie.

W stanach anomalii zdarza się jednak, że stężenie jonów wapnia komórce wzrasta w sposób nieprawidłowy i osiąga zbyt duże wartości. Przykładem takiej sytuacji jest nadmierna aktywacja kanałów wapniowych stymulowanych glutaminianem w ośrodkowym układzie nerwowym np. w następstwie epizodu niedokrwienego (tzw. cytotoksyczność pobudzeniowa). Powoduje to szereg niekorzystnych zmian w komórce, w tym zmian dotyczących mitochondriów. W efekcie może dojść do śmierci komórki. Dzisiaj wiemy, że w przestrzeni międzybłonowej mitochondriów znajdują się białka, których uwolnienie do cytosolu aktywuje tzw. wewnętrzną lub od-mitochondrialną ścieżkę apoptozy. Wśród białek tych jest cytochrom c, pełniący funkcję przekaźnika elektronów w łańcuchu oddechowym a także białko AIF (z ang.: apoptosis inducing factor),

endonukleaza G, której substratem jest DNA oraz kilka innych białek, których rola polega na modulacji aktywności enzymów koniecznych dla przebiegu apoptozy. Do chwili obecnej nie jest oczywiste, w jaki sposób białka znajdujące się w przestrzeni międzybłonowej mogą ją opuścić w sposób selektywny i podlegający regulacji. Niewątpliwie bierze w tym udział tzw. poryna mitochondrialna, czyli VDAC. VDAC jest białkiem tworzącym w zewnętrznej błonie mitochondrialnej pory zdolne do przepuszczenia substancji o masie molowej do 5 kDa. To o wiele za mało, żeby umożliwić wypływ białek. Ale wiadomo też, że VDAC oddziałuje z białkami wewnętrznej błony mitochondrialnej tworząc tzw. megakanał mitochondrialny oraz z proapoptotycznymi białkami z rodziny Bcl₂. Samo powstawanie megakanału też nie wyjaśnia zjawiska uprzepuszczalności zewnętrznej błony mitochondriów dla białek aktywujących apoptozę. Istnieją jednak dowody na to, że „zablokowanie” tej struktury ma działanie antyapoptotyczne. Ostatecznie musimy na razie przyjąć, że kompleks białek tworzących megakanał wraz z białkami Bcl₂ i prawdopodobnie jeszcze innymi uczestniczy w promocji odmitochondrialnej ścieżki apoptotycznej. Regulacja apoptozy przykuwa od lat uwagę wielu badaczy komórek, w tym również specjalistów skupiających swoją uwagę na mitochondriach. Wśród nich warto wymienić nazwiska Paolo Bernardiego z Padwy, Andrew Halestrapa z Bristolu, Dietera Brdiczki z Konstancy czy francuskiego badacza Guido Kroemera. To ich badania przyczyniły się znacząco do wyjaśnienia struktury i regulacji megakanału mitochondrialnego oraz jego związku z przebiegiem apoptozy.

Reaktywne formy tlenu, mitochondrialne DNA i choroby mitochondrialne

Udział mitochondriów w aktywacji śmierci komórek ma także związek z wytwarzaniem przez te organella reaktywnych form tlenu (ROS). Związki te charakteryzują się wysoką reaktywnością w stosunku do wielu składników komórkowych w tym lipidów, białek i kwasów nukleinowych. Ze względu na bliskie sąsiedztwo źródła ROS, mitochondrialny DNA (mtDNA) jest szczególnie narażony na uszkodzenia oksydacyjne. Co więcej, brak białek histonowych, brak zjawiska rekombinacji oraz mniej wydajny niż w przypadku DNA jądrowego

system naprawy mtDNA są uważane za czynniki zwiększające szybkość pojawiania się zmian w obrębie mtDNA.

Mitochondrialny DNA u zwierząt koduje zaledwie 13 białek, co stanowi niewielki odsetek w stosunku do ok. 1000 białek występujących w mitochondriach. Jednakże wszystkie te białka są nieodzowne dla prawidłowego przebiegu oksydacyjnej fosforylacji. Bez nich mitochondria nie mogą funkcjonować.

Powstawanie ROS jest nieuchronną konsekwencją życia w warunkach tlenowych i ceną, jaką płaci organizm za wykorzystywanie tlenu jako ostatecznego akceptora elektronów w łańcuchu oddechowym. W warunkach normy wytwarzanie ROS jest równoważone ich neutralizacją, co nie znaczy, że związki te nie wywierają negatywnych skutków w komórce. Uważa się, że postępujące uszkodzenia oksydacyjne są jedną z przyczyn naturalnego procesu starzenia się organizmów i przez niektórych badaczy są traktowane jako ostateczny wyznacznik maksymalnej długości życia.

Natomiast w warunkach patologicznych, w których dochodzi do zaburzenia równowagi oksydoredukcyjnej w komórkach np. w wyniku przejściowego braku tlenu spowodowanego chwilowym niedokrwieniem, a następnie przywróceniem krążenia krwi (ischemia-reoksygenacja), wytwarzanie ROS może znacznie przewyższać szybkość jego detoksykacji. W wyniku takich zdarzeń dochodzi m.in. do szeregu zmian oksydacyjnych w tym do uszkodzenia mtDNA i w efekcie niewydolności energetycznej komórek. Następstwem tego jest deficyt ATP i w efekcie wiele anomalii komórkowych z zaburzeniami homeostazy jonowej na czele. Co więcej, uszkodzenie mtDNA pociąga za sobą zwiększenie wytwarzania ROS i w ten sposób powstaje samonakręcająca się spirala stresu oksydacyjnego. Takie zjawiska są nie tylko następstwem epizodów niedokrwiennych w ośrodkowym układzie nerwowym i w mięśniu sercowym, ale towarzyszą też chorobom neurodegeneracyjnym (np. chorobie Alzheimera) oraz wielu innym schorzeniom ogólnoustrojowym np. cukrzycy. A zatem, pilną potrzebą wydaje się poszukiwanie sposobów zmniejszania stresu oksydacyjnego i tym samym zapobieganie uszkodzeniom komórek. Jednym z proponowanych sposobów jest łagodne obniżanie potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej. Można to osiągnąć np. zwiększając napływ K^+ do macierzy mitochondrialnej. Powoduje to

przyspieszenie oddychania mitochondrialnego i tym samym zmniejszenia stopnia redukcji nukleotydów (NAD^+ i FAD). W efekcie zmniejsza się szybkość wytwarzania ROS. W laboratoriach kierowanych przez Adama Szewczyka z Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN oraz Krzysztofa Dołowego z SGGW w Warszawie prowadzone są badania nad wykorzystaniem substancji otwierających mitochondrialne kanały potasowe w kardio- i neuroprotekcji.

Mutacje w obrębie mtDNA są nie tylko efektem zmian postępujących w czasie życia osobniczego. Istnieje wiele znanych wrodzonych chorób spowodowanych mutacjami mtDNA. Mutacje te, podobnie jak cała informacja genetyczna zawarta w mtDNA dziedziczą się po linii matczynej a zatem w sposób nie mendelowski. Mogą one dotyczyć albo genów kodujących jedno z 13 białek, albo genów kodujących tRNA wykorzystywanych podczas translacji zachodzącej w mitochondriach (mtDNA zawiera geny dla 22 rodzajów tRNA i 2 rodzajów rRNA). W każdym przypadku dochodzi do dysfunkcji oksydacyjnej fosforylacji i w konsekwencji może dojść do zaburzeń energetycznych w obrębie komórki. Ze względu na to, że w każdej komórce może być kilkaset do kilku tysięcy kopii mtDNA, występowanie skutków mutacji zależy od stopnia heterooplazmii, czyli od tego jaki odsetek mtDNA w komórce stanowi mtDNA z mutacją. Zaburzenia związane z mutacjami w mtDNA (zwane chorobami mitochondrialnymi) obniżają wydolność energetyczną komórek i dlatego, zapewne dotyczą przede wszystkim tych narządów i tkanek, które charakteryzują się szczególnie dużym zapotrzebowaniem na ATP a zatem ośrodkowego układu nerwowego i mięśni. Przypisywane konkretnym mutacjom zespoły chorobowe są opisywane skrótami, których rozwinięcie jest zazwyczaj opisem objawów choroby np.: zespół NARP (neurogenna miopatia z ataksją i zwyrodnieniem barwnikowym siatkówki, ang.: neurogenic myopathy, ataxia, retinitis pigmentosa, NARP syndrome) lub zespół MELAS (miopatia mitochondrialna, encefalopatia, kwasica mleczanowa, występowanie incydentów podobnych do udarów, ang. mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, stroke-like episodes). Choroby mitochondrialne spowodowane mutacjami w mtDNA są jak dotąd nieuleczalne i w wielu przypadkach letalne. Są one przedmiotem dużego zainteresowania biologów,

genetyków i lekarzy. Ostatnio można spotkać się z terminem „medycyna mitochondrialna” odnoszącym się m.in. do chorób spowodowanych mutacjami w mtDNA, ale także będących skutkiem mutacji w genach jądrowych kodujących białka związane z funkcjonowaniem mitochondriów. Wśród badaczy zajmujących się tymi schorzeniami warto wymienić profesorów Salvatore Di Mauro, Erica Schoudbridge, Jana Smeitinka i Douglasa Wallace. Także w Polsce istnieją ośrodki zajmujące się tym zagadnieniem zarówno od strony klinicznej jak i naukowej. Między innymi jest to zespół Ewy Pronickiej z Centrum Zdrowia Dziecka w Warszawie, grupa kierowana przez Ewę Bartnik z Zakładu Genetyki Uniwersytetu Warszawskiego oraz Zespół Badawczo-Leczniczy Chorób Nerwowo-Mięśniowych kierowany przez Irenę Hausmanową-Petrusewicz z Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego PAN w Warszawie.

Podsumowanie

W początkach drugiej połowy XX wieku badania dotyczące bioenergetyki osiągnęły apogeum. Gdy opisano już mechanizm oksydacyjnej fosforylacji mogło wydawać się, że mitochondria nie kryją żadnych istotnych tajemnic a ich badanie wejdzie w okres zastoju i będzie ograniczone do wyjaśniania szczegółów niezmiennających ogólnego oglądu. Tak się jednak nie stało. Rozwój metod badawczych w tym zaawansowanych technik mikroskopowych stworzył nowe możliwości badania ultrastruktury komórek, w tym także mitochondriów. Zaczęto interesować się wewnątrzkomórkową organizacją mitochondriów, a także ich strukturą wewnętrzną. Dotychczasowe poglądy dotyczące tych zagadnień zostały poddane poważnej rewizji. Mitochondriami zainteresowali się także biolodzy komórki zajmujący się apoptozą, starzeniem się komórek, sygnalizacją wapniową, oddziaływaniami między organellami a także genomem mitochondrialnym, sposobem dziedziczenia cech kodowanych w mtDNA, wykorzystaniem mtDNA do badań pokrewieństwa oraz prowadzenia rozważań ewolucyjnych. Wszystko to razem sprawiło, że badania mitochondriów przeżywają obecnie renesans, a „mitochondriologia” znacznie wykracza poza tradycyjną bioenergetykę mitochondriów. Ale jeżeli zastanowimy się głębiej, to dojdziemy do wniosku, że to

wszystko co nas w tej chwili tak bardzo w mitochondriach fascynuje jest w rzeczywistości bardzo mocno wsparte na najważniejszej funkcji tych organelli i wszelkie rozważania dotyczące różnych aspektów działania mitochondriów nie mogą obyć się bez odwoływania się do tak podstawowych pojęć jak transport elektronów, potencjał oksydoredukcyjny, siła protonomotoryczna i oksydacyjna fosforylacja.

Lektura uzupełniająca

Książki

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (red.) (2007): Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing, Inc. New York and London, wyd.5.

Tzagoloff A. (1982): Mitochondria. Plenum Press, New York.

Dykens J.A., Will Y. (red.) (2008): Drug-induced mitochondrial dysfunction. Wiley and Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.

Czasopisma:

Dimauro S. (2004): Mitochondrial medicine. Biochim. Biophys. Acta 1659: 107-114.

Duszyński J., Koziel R., Brutkowski W., Szczepanowska J., Zabłocki K. (2006): The regulatory role of mitochondria in capacitative calcium entry. Biochim. Biophys. Acta 1757: 380-387.

Gunter T.E., Yule D.I., Gunter K.K., Eliseev R.A., Salter J.D. (2004): Calcium and mitochondria. FEBS Lett. 567: 96-102.

Mannella C.A., Buttle K., Rath B.K., Marko M. (1998): Electron microscopic tomography of rat-liver mitochondria and their interaction with the endoplasmic reticulum. Biofactors. 8: 225-228.

Wojtczak L. (2000): Siedemdziesiąt lat badań nad oksydacyjną fosforylacją, czyli od koncepcji chemicznego sprzężenia do wirującej ATP-azy. Kosmos 49: 467-479.

- Wojtczak L., Zabłocki K. (2008): Mitochondria w życiu, chorobie i śmierci komórki. *Post. Biochem.* 54:129-41.
- Youle R.J., Karbowski M. (2005): Mitochondrial fission in apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 657-663.
- Zabłocki K. (2004): Regulacja wewnątrzkomórkowych sygnałów wapniowych – rola mitochondriów. XXI Zimowa Szkoła Instytutu Farmakologii PAN, Mogilany 2004. Skrypt 47 – 59.