

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Molekulární biologie a biochemie organismů
Studijní obor: Speciální chemicko-biologické obory



Sebastian Balvín

Mitochondriální RNA v savčích buňkách
Mitochondrial RNA in mammalian cell

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Petr Ježek, DrSc.

Praha, 2013

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, 14. 05. 2013

Podpis

Poděkování:

Děkuji RNDr. Petr Ježekovi, DrSc., Ing. Jaroslavu Zelenkovi, PhD. a Mgr. Lukáši Alánovi za jejich trpělivost, pomoc a podporu při psaní této práce.

Abstrakt

Mitochondrie je důležitá organela, zajišťující energetický metabolismus buňky a účastní se signalizace, buněčného cyklu a programované smrti. Její patologie způsobují mnoho chorob.

V mitochondrii stejně jako v jádře probíhá replikace, transkripce a translace, i když mtDNA kóduje jen třináct genů. Tyto děje jsou ovšem odlišné od těch jaderných, stejně jako mitochondriální DNA a RNA. Mitochondriální DNA je cirkulární a obě vlákna se replikují odděleně. Mitochondrie tvoří polycistronní transkripty, které musí být následně sestřihovány pomocí tRNA.

Mitochondriální ribozom se vyvinul z prokaryotického, obsahuje ale jen asi polovinu rRNA a tu nahrazuje ribozomálními proteiny. Těch má dokonce více než mnohem větší eukaryotický cytoplazmatický ribozom. Tato práce je zaměřena na aktuální téma molekulární genetiky mitochondrií: mitochondriální rRNA a tedy i ribozom, především pak na jeho skládání. Při něm interagují mitochondriální rRNA s jaderně kódovanými proteiny ve složitém procesu, který se nejspíše odehrává na membráně v blízkosti nukleoidu. Porozumění tomuto procesu může pomoci v léčbě mnoha mitochondriálních patologií.

Klíčová slova: Mitochondrie, mtDNA, mtRNA, skládání ribozomu

Abstract

Mitochondrion is an important organelle maintaining energy metabolism of the cell and participating in signalization, cell cycle and apoptosis. It's pathology causes several diseases.

Replication, transcription and translation take place in mitochondria, similarly like in nucleus, though there are only 13 protein coding genes. However, these processes, as well as mitochondrial DNA and RNA, vary significantly from those present in nucleus. Mitochondrial DNA is circular and both strands are replicated separately. Mitochondria form polycistronic transcripts, which are subsequently processed by tRNA.

Mitochondrial ribosome evolved from prokaryotic one, but contains only half as much rRNA. Missing rRNAs are replaced by ribosomal proteins. These ribosomes contain even more proteins compared to much larger cytoplasmatic eukaryotic ones. This work is focused on current topic of mitochondrial molecular genetics: mitochondrial rRNA and ribosome, especially ribosomal assembly. In this process mitochondrial rRNAs interact with nuclear encoded proteins. The whole process probably takes place on the inner mitochondrial membrane close to the nucleoid. Our understanding to whole mechanism can help us to find a way how to cure mitochondrial pathologies.

Key words: Mitochondria, mtDNA, mtRNA, ribosome assembly

1. Obsah

1.	Obsah	5
2.	Seznam použitých zkratek	6
3.	Úvod	7
4.	Mitochondrie	8
4.1.	Mitochondriální anatomie	8
4.2.	Mitochondriální genom	9
4.2.1.	Struktura mitochondriálního genomu	9
4.2.2.	Replikace	11
4.2.3.	Transkripce	12
5.	RNA	14
5.1.	Druhy mitochondriální RNA	14
5.1.1.	mRNA	14
5.1.1.1.	Sestřih RNA	15
5.1.1.2.	Polyadenylace mRNA	15
5.1.1.3.	Translace.....	16
5.1.2.	tRNA	17
5.1.3.	rRNA	17
5.1.4.	Nekódující RNA.....	18
5.1.5.	Jaderné RNA	19
5.2.	Degradace RNA	19
6.	Ribozom	20
6.1.	Skládání ribozomu.....	21
6.1.1.	Nastavení rovnováhy množství rRNA vůči MRP.....	21
6.1.2.	rRNA	22
6.1.2.1.	Modifikace 12S rRNA.....	23
6.1.2.2.	Modifikace 16S rRNA.....	24
6.1.3.	Proteiny	25
6.1.3.1.	Asociace ribozomu s vnitřní mitochondriální membránou	26
6.1.3.1.1.	Funkce ribozomu ve skládání dýchacího řetězce	26
6.1.3.2.	Asociace ribozomu s nukleoidem.....	27
7.	Diskuze	28
8.	Závěr	29
9.	Seznam Literatury	30

2. Seznam použitých zkratek

ATP	Adenosin trifosfát
CO	Cytochrom c oxidáza
CSB	Konzervované sekvenční bloky
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
HmtPAP	Poly-A polymeráza lidské mitochondrie
MRP	Mitochondriální ribozomální protein
mTERF	Mitochondriální terminační faktor
mtEXO	Mitochondriální degradozom
mtSSB	Mitochondriální single-strand binding protein
NADH	Nikotinamid adenin dinukleotid
NCR	Nekódující region
ND	NADH dehydrogenáza
O _H	Origin replikace H-vlákna
O _L	Origin replikace L-vlákna
ORF	Otevřený čtecí rámeček
PNPáza	Polynukleotid fosforyláza
POLRMT	Mitochondriální RNA polymeráza
RNA	Ribonukleová kyselina
SDM	Strand-displacement model replikace
TAS	Sekvence asociované s terminací
TFAM	Mitochondriální transkripční faktor A
TFB1M	Mitochondriální transkripční faktor B 1
TFB2M	Mitochondriální transkripční faktor B 2
TIM	Translokáza vnitřní mitochondriální membrány
TOM	Translokáza vnější mitochondriální membrány
UTR	Nepřekládaná oblast

3. Úvod

Všechny živé organismy potřebují vnější zdroj energie. Přijatá energie musí být v buňce transformována do univerzálně použitelné podoby, nejčastěji do formy adenosintrifosfátu (ATP). V eukaryotických organismech většinu této energie vyrábí buněčné organely zvané mitochondrie pomocí Krebsova cyklu a oxidační fosforylace. Mitochondrie ale nejsou jen jakési buněčné elektrárny, ale hrají roli i v dalších procesech jako signalizace, buněčný cyklus a programovaná smrt (apoptóza). Mitochondrie vznikla z alfa-proteobakterie, která byla pohlcena předchůdcem eukaryotické buňky. V průběhu evoluce pak postupně docházelo k přenosu genů z mitochondrie do jádra a tím mitochondrie ztrácela svoji autonomii. Přesto stále neztratila vše ze svého prokaryotického předka. V mitochondriích se tedy mísí dva světy a z každého si berou něco, což z nich dělá velmi zajímavý objekt vědeckého bádání, od evolučních biologů přes antropology až po molekulární biology. Mitochondrie si zachovala mnoho typicky prokaryotních znaků, jako polycistronní transkripty nebo absenci sestřihového aparátu, vše ale probíhá v eukaryotním organismu a pomocí eukaryotických bílkovin. Ať už se bavíme o replikaci, transkripci nebo translaci, vše má svá specifika. Těm se snažíme porozumět už jen proto, že mitochondriální dysfunkce doprovází mnoho chorob jako ateroskleróza, vysoký krevní tlak, ischemické poruchy, záněty, cystická fibróza, nádory, diabetes mellitus druhého typu, Parkinsonova choroba, Alzheimerova choroba a další neurodegenerativní poruchy. Proto je v dnešní době mitochondriím věnována velká pozornost a jejich výzkum se rychle rozvíjí.

4. Mitochondrie

Mitochondrie je buněčná organela vyskytující se u všech eukaryotických organismů. Někteří zástupci protistů mají však mitochondrii buď extrémně redukovanou, nebo se přeměnila na jinou organelu, jako hydrogenozom nebo mitozom. V buňce se vyskytuje až v tisících, jak se ale ukazuje, spíše než jednotlivé mitochondrie je v buňce mitochondriální síť, která se neustále pohybuje po mikrotubulech a mění, jak různé části fúzíjí a zase se oddělují. To, jak je mitochondrie často zobrazovaná v učebnicích jako spousta malých kulatých mitochondrií odpovídá spíše patologickému stavu u některých chorob. Nejuznávanější teorií vzniku mitochondrie je tzv. endosymbiotická teorie. Ta říká, že předchůdce eukaryotické buňky asi před 1,5-2 miliardami let pohltit alfa-proteobakterii, která v něm už zůstala. První funkce tohoto endosymbionta ale nejspíš nebyla výroba energie jako u dnešní mitochondrie, ta se vyvinula až později. Nějakou výhodu pro udržení buňce ale přinášet musel, pokud to nebyl parazit. Mohl poskytovat ochranu před kyslíkem, jelikož se v době endosymbiotické události začaly vyskytovat aerobní biotopy či si pouze vyměňovat s buňkou metabolity.

4.1. Mitochondriální anatomie

Mitochondrie se skládá z několika kompartmentů. Jsou to vnější membrána, mezimembránový prostor, vnitřní membrána, kristy a matrix. Vnější membrána je podobná eukaryotické cytoplazmatické membráně, zejména poměrem proteinů k fosfolipidům. Přenos látek přes ni se uskutečňuje pomocí porinů u látek do 5-10kDa, nebo pomocí proteinů komplexu TOM (translocase of the outer membrane). Mezimembránový prostor je svým složením velice podobný cytoplazmě, od níž ho odděluje vnější membrána. Vnitřní membrána se vyznačuje vysokým poměrem proteinů k lipidům, obsahuje mimo jiné ATP syntázu, proteiny elektron-transportního řetězce, translokační komplex TIM (translocase of the inner membrane) a specifické transportní proteiny regulující výměnu metabolitů a iontů mezi matrix a cytoplazmou. Vnitřní membrána tvoří vychlípeniny, zvané kristy, které zvyšují 3-5násobně její povrch, čímž se podstatně zvyšuje kapacita oxidační fosforylace. Nejdůležitějším lipidem vnitřní membrány je glykolipid kardiolipin, který pomáhá snižovat propustnost membrány. Pomocí něho a dalších složek membrány vzniká bariéra pro většinu iontů, metabolitů a nízkomolekulárních sloučenin, které mohou být regulovaně specificky přenášeny. To prostorově odděluje metabolické děje mezi cytosolem a mitochondriemi a udržuje gradienty těchto látek. Hlavní je však udržení gradientu protonového, který je esenciální pro tvorbu ATP v procesu oxidační fosforylace. Vnitřek mitochondrie tvoří matrix, což je vlastně obdoba cytoplazmy. Ten obsahuje víc než polovinu všech mitochondriálních bílkovin, a dále obsahuje meziproducty energetického metabolismu, ribozomy, DNA a RNA. DNA, část RNA a některé mitochondriální proteiny (transkripční faktory, proteiny

asociované s DNA atd.) jsou v mitochondrii uloženy v takzvaném nukleoidu. Je to vlastně mitochondriální chromozom, podobný tomu prokaryotickému.

4.2. Mitochondriální genom

Podle endosymbiotické teorie je lidská mitochondriální DNA (mtDNA) pozůstatkem genomu symbiotické alfa-proteobakterie, ze které se vyvinuly mitochondrie. V průběhu evoluce se postupně jednotlivé geny přesouvaly z endosymbionta do jádra, kde je dnes kódována naprostá většina mitochondriálních genů. Lidská mtDNA se postupně zmenšila až na 16,6kbp (ovšem u rostlin může být až 400kbp dlouhá) a kóduje jen 37 genů, z nichž jen třináct jsou geny kódující proteiny. Sedm z těchto třinácti proteinů jsou složky komplexu I dýchacího řetězce, tedy NADH dehydrogenázy, tři jsou součástí komplexu III, dvě jsou podjednotky ATP syntázy a třináctý protein je cytochrom b. mtDNA dále kóduje geny pro 2 rRNA a 22 tRNA a tím se podílí na tvorbě vlastního proteosyntetického aparátu. Buňky jsou z hlediska mitochondriální DNA polyploidní, v jednotlivé buňce se vyskytují až tisíce molekul mtDNA. mtDNA v zárodečné buňce mají v naprosté většině případů stejnou sekvenci, ale v průběhu ontogeneze a stárnutí organismu dochází k nespecifické akumulaci mutací, takže ve tkáních i jednotlivých buňkách se pak vedle sebe vyskytují kopie mtDNA s různými sekvencemi. Tento stav se nazývá heteroplazmie. mtDNA je mnohem náchylnější k mutacím než jaderná DNA. To má více důvodů, mtDNA je mnohem méně chráněna bílkovinami, v mitochondrii probíhá oxidační fosforylace a proto se tu vyskytují ve větší míře kyslíkové radikály a opravné systémy pro mtDNA nejsou tak komplexní jako pro jadernou DNA. Heteroplazmie ale nepředstavuje problém, dokud množství chybných kopií nepřekročí určitou mez (asi 60-80% kopií mtDNA). Díky své polyploidii dokážou nezmutované DNA tyto vadné kopie zastoupit. Mitochondriální genom se dědí maternálně a případné mitochondrie, které se do vajíčka dostanou ve spermiu, jsou eliminovány autofagií (přes ubiquitinovou dráhu). Při oogenzi je eliminována většina mitochondrií, aby se dosáhlo homoplazmie u potomka. Mitochondrie nepoužívá stejný genetický kód jako v jádře. U saveců kóduje UGA tryptofan místo stop kodonu. Stop kodon zatím kódují AGA a AGG, čemuž v cytoplazmatickém systému odpovídá arginin. Kodony AUA, AUC a AUU jsou v mitochondrii iniciační. Anti-kodon párující systém je také zjednodušený a tudíž mitochondrii stačí pouze 22 tRNA.

4.2.1. Struktura mitochondriálního genomu

Mitochondriální DNA je cirkulární dvouvláknová molekula. Pro lepší popis jsou vlákna odlišena podle hustoty v denaturujícím gradientu způsobené odlišným obsahem G a T. Těžší vlákno se nazývá H-

vláknem (heavy) a lehčím L-vláknem (light). Většina genů je kódována H-vláknem, to obsahuje 2 rRNA (16S a 12S), 14 tRNA a 12 mRNA. Z mRNA H-vláknem vzniká cytochrom b a podjednotky komplexu NADH dehydrogenázy (ND1-5, ND4L), cytochrom c oxidázy (CO I, CO II, CO III) a ATP syntázy (ATP6 a 8). L-vláknem kóduje zbylých 8 tRNA a jen jeden protein, podjednotku ND6 NADH dehydrogenázy.

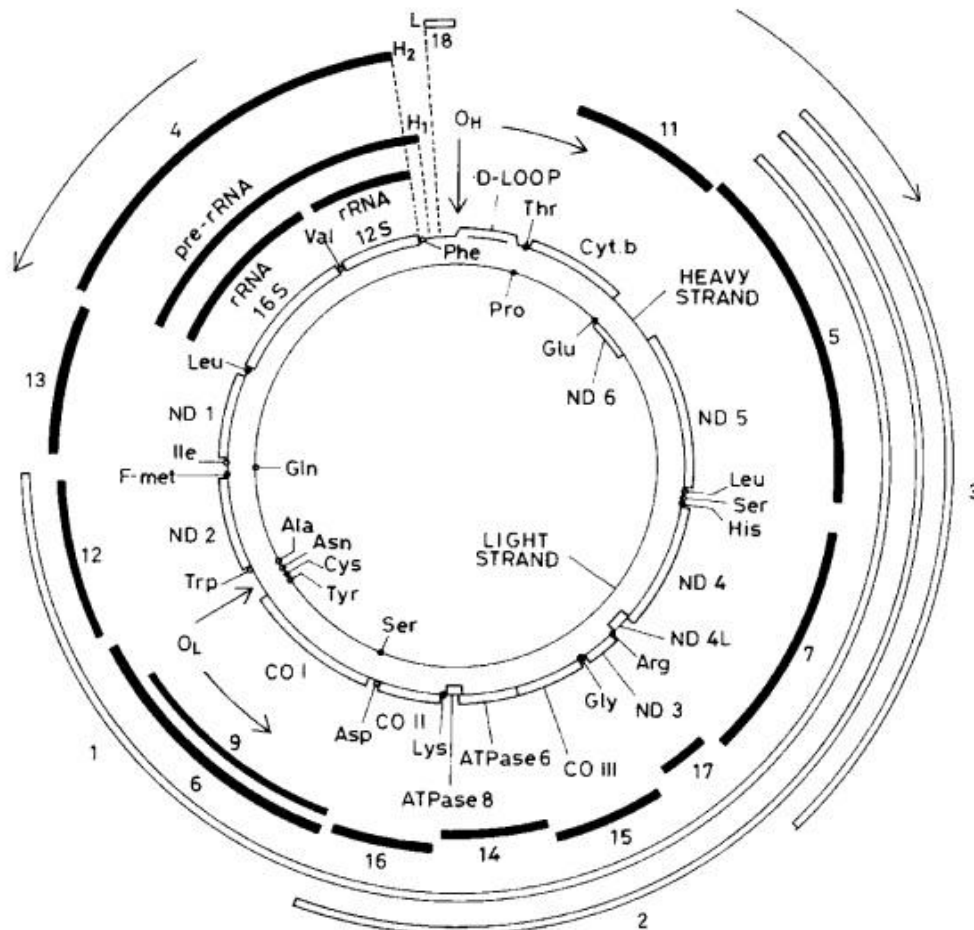


Schéma mitochondriálního genomu (Fernandez-Silva, Enriquez et al. 2003)

mtDNA tvoří nukleoidy navázané na membránu, s kterou asociuje prostřednictvím DNA vazebných proteinů. Vazebných bílkovin má ovšem mnohem méně než jaderná DNA. Zvláštností je přítomnost takzvané D-loop (displacement loop), což je třířetězcová struktura, kde třetí vláknem tvoří 7S DNA. D-loop je nejvýznamnější nekódující segment mtDNA. Nachází se zde replikační počátek pro H-vláknem (O_H), promotory pro replikaci H i L vláknem a regulační sekvence jako CSBs (conserved sequence blocks), TASs (termination-associated sequences) a také se tu tvoří sekundární struktury podobné tRNA, které nejspíše hrají roli v replikaci. Druhý nekódující element, dlouhý asi jen 30 nt, obsahuje replikační počátek pro L-vláknem (O_L) a nachází se přibližně 2/3 délky mtDNA ve směru replikace z O_H . Savčí mitochondriální genom je kompaktní, kódující sekvence na sebe navazují a neobsahují introny, některé geny dokonce přesahují do dalších (ATP6 a ATP8, ND4 a ND4L) či neobsahují v sekvenci

kompletní stopkodony, které jsou dotvořeny až polyadenylací mRNA. tRNA je pravidelně uspořádána mezi ostatní geny a hraje důležitou roli v sestřihu polycistronní RNA. Všechna eukaryota ovšem nemají takto uspořádaný mitochondriální genom. Například kvasinkový je 5x delší, obsahuje introny a tRNA nejsou pravidelně mezi geny, nýbrž pohromadě.

4.2.2. Replikace

Replikace probíhá v mitochondriální matrix, tedy nezávisle na buněčném cyklu a replikaci jaderné DNA, přesto ale podléhá buněčným signálům. Typická replikace mtDNA v myší buňce trvá cca 1 hodinu (Bogenhagen and Clayton 1977).

Pro replikaci byly vytvořeny 3 hlavní modely. Nejstarší a nejlépe popsany mechanismus je strand-displacement model (SDM). Probíhá jako asynchronní dislokační mechanismus s 2 jednosměrnými nezávislými počátky. Syntéza začíná na O_H , pokračuje po mateřském L-vlákně a tvoří tedy nové H-vlákně. Když replikace prvního vlákna dorazí až k O_L , iniciační místo na mateřském H-vlákně se odkryje a může začít replikace druhého vlákna (Shadel and Clayton 1997).

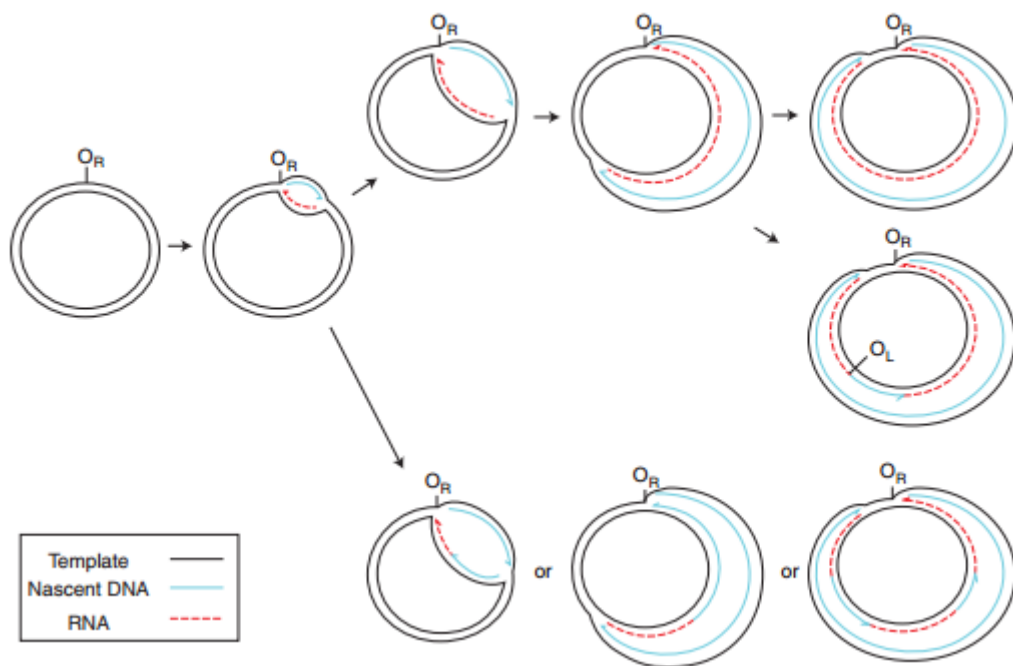
Iniciace replikace začíná na O_H , které je součástí D-loop. Nejprve je potřeba vytvoření replikačního RNA primeru. Mitochondriální RNA polymeráza (POLRMT) vytvoří při transkripci R-loop, což je RNA/DNA duplex v místě O_H . Ten je sestřižen RNázou MRP, která zkrátí konce RNA do správné velikosti. Pro iniciaci *in vitro* jsou potřeba jen tyto dva proteiny, tedy POLRMT a RNáza MRP (Lee and Clayton 1998), *in vivo* se iniciace replikace prvního vlákna účastní nejspíše i další proteiny.

Polymeráza γ je jediná mitochondriální DNA polymeráza, tudíž musí mít nejen polymerázovou, ale i DNA 3'-5' exonukleázovou a lyázovou aktivitu pro opravnou funkci. Ke správné replikaci samozřejmě nestačí jen polymeráza. Stejně jako u jaderné polymerázy jsou pro správnou a úplnou replikaci potřebné další proteiny, jako topoizomeráza, helikáza, mtSSB a ligáza. *Převzato z (Copeland and Longley 2003).*

Replikace je závislá na transkripci (vytvoření RNA primerů), cis-acting elementech, trans-acting faktorech potřebných pro transkripci L-vlákně a na dalších sekvencích v D-loop: CSB, důležitých pro syntézu primerů a TAS. TAS sekvence jsou důležité pro vytvoření D-loop. Mohou totiž terminovat replikaci na konci D-loop a tím se vytvoří krátké třetí vlákno, tedy 7S DNA. Replikace L-vlákně začíná až poté, co replikace H-vlákně dorazí k O_L a odkryje ho na jednořetězcové DNA. ssDNA je v této oblasti bohatá na T, vytvoří smyčku a POLRMT na ní vytvoří primery, z kterých začne replikace L-vlákně. *Převzato z (Fernandez-Silva, Enriquez et al. 2003).*

Druhý model replikace se nazývá RITOLS (ribonucleotide incorporation throughout the lagging strand). Je velmi podobný SDM. Oba modely předpokládají, že jednotlivá vlákna nejsou syntetizována zároveň, tedy že O_H leží v D-loop a O_L na opačné straně molekuly. I systém replikace je vlastně stejný jako SDM, jen na opožďujícím se vlákně jsou navíc RNA. V případě SDM je na

jednořetězcové DNA navázán místo RNA mitochondriální single-strand binding protein (mtSSB). Oproti tomuto proteinu má RNA v prostředí mitochondrie, kde je velká mutační rychlost značnou výhodou. RNA zachovává stejnou sekvenci a při náhodné mutaci je možnost ji jednoduše opravit. To u proteinu nejde, a když si uvědomíme, že jedno vlákno je samostatné po celou dobu než replikace přejde přes 2/3 chromozomu, bylo by to pro organismus zřejmě moc velké riziko. Tato ochrana se vyplatí hlavně v mitochondrii, protože je to proces samozřejmě mnohem pomalejší než pouhé nasednutí proteinu. Například eukaryotickou jadernou replikaci by to nepřiměřeně zpomalovalo (Yasukawa, Reyes et al. 2006).



Mechanismus RITOLS replikace (Holt and Reyes 2012)

Třetím modelem replikace je klasický jaderný mechanismus, tedy spojená syntéza vedoucí (leading) a opožděujícího se (lagging) vlákna. Byly objeveny intermediáty, u kterých se předpokládá, že mohou vznikat jen při tomto způsobu replikace. Tuto teorii ovšem nepodporují žádné jiné důkazy. (Holt, Lorimer et al. 2000)

4.2.3. Transkripce

Transkripce začíná stejně jako replikace vždy v D-loop. Pro transkripci byla objevena tři iniciační místa, H_1 , H_2 a L. Jak už názvy napovídají, dva počátky jsou pro H-vlákno a jeden pro L-vlákno. Mitochondrie tvoří tedy tři polycistronní transkripty. Z iniciačního místa H_1 , které začíná 12nt před $tRNA_{phe}$ a končí na 3' konci 16S rRNA, se transkribuje $tRNA_{phe}$, 12S rRNA, $tRNA_{val}$ a 16S rRNA.

Druhý počátek na H-vlákně, H₂, leží jen několik nukleotidů za H₁. Toto iniciační místo je využíváno asi 20 x méně než H₁, pokračuje přes celé vlákno a tvoří se z něj všechny RNA kódované H-vláknem. Důsledkem existence těchto 2 počátků je snadno regulovatelná produkce rRNA vůči mRNA H-vláknem. Transkripce L-vláknem začíná na jediném místě, na 5' konci 7S RNA, tedy asi 150nt od H₁ a sestříhem se z něj vytvoří 8 tRNA a mRNA pro podjednotku ND6 (Montoya, Christianson et al. 1982; Montoya, Gaines et al. 1983).

Transkripci provádí specifická mitochondriální polymeráza (mtRNAPol/POLRMT), homologní s fágovou polymerázou a kvasinkovou mtRNA polymerázou. *Převzato z (Arnold, Smidansky et al. 2012).* Tato polymeráza samozřejmě potřebuje ke své správné funkci transkripční faktory, z nichž nejdůležitější je zřejmě TFAM, který nasedá na vazebná místa v D-loop, ještě před samotnými promotory. V tomto místě nejspíše tvoří komplex s DNA a ohýbá jí tak, že polymeráza může nasednout. *Převzato z (Shi, Dierckx et al. 2012).* Další esenciální faktory jsou TFB1M a TFB2M, které tvoří heterodimer s polymerázou. TFB1M podporuje transkripci řádově více a působení jednoho či druhého se nejspíše využívá k regulaci transkripce (Falkenberg, Gaspari et al. 2002). Jak už bylo řečeno, transkripce z H₁ končí za 16S rRNA. To zajišťuje protein mTERF, který se v tom místě váže na DNA a způsobuje terminaci transkripce (Daga, Micol et al. 1993).

5. RNA

Mitochondrie jako buněčná organela s vlastní DNA také syntetizuje svoji RNA. Tato RNA se od jaderné liší a obsahuje rysy eukaryotických i prokaryotických RNA, stejně jako vlastní specifické mitochondriální znaky.

5.1. Druhy mitochondriální RNA

V mitochondrii vznikají všechny tři základní druhy RNA, tedy mRNA, tRNA a rRNA. Jak se ukazuje, obsahuje i jiné, nekódující RNA, o jejich funkci se zatím téměř nic neví. Mitochondrie obsahuje i malé množství jaderné RNA, především 5S rRNA a některé miRNA.

5.1.1. mRNA

V mitochondrii se tvoří mRNA pro 13 podjednotek komplexů dýchacího, veškeré ostatní bílkoviny jsou kódovány v jádře, kam byly v průběhu evoluce přesunuty. Dvanáct z těchto třinácti bílkovin je kódováno H-vláknem, zatímco L-vláknem obsahuje jen gen ND-6. Při transkripci v mitochondrii vznikají polycistronní transkripty a tudíž z nich musí být RNA vystřiženy. Mitochondriální mRNA na rozdíl od jaderných začínají na 5' konci rovnou iniciačním kodonem nebo před ním jsou maximálně tři nukleotidy (výjimka jsou bicistronní transkripty). Poly-A začíná hned za stopkodonem nebo ho dokonce doplňuje. Chybí tedy typické 5' a 3' nepřekládané oblasti, metylguanositová čepička. 3' polyadenylace v mitochondrii existuje, ale odlišná od té jaderné. Vyskytuje se tu jak stabilizační, tak polyadenylace označující RNA k degradaci. *Převzato z (Fernandez-Silva, Enriquez et al. 2003; Temperley, Wydro et al. 2010).*

Tabulka vlastností mitochondriálních transkriptů (Temperley, Wydro et al. 2010)

Protein	5'UTR	ORF	3'UTR	iniciační kodon	terminační kodon	A přidány do stopkodonu	délka poly-A konce
ND5	0	1811	568	AUA	UAA	0	0/8
COX1	3	1541	72	AUG	UAG	0	37
ND4	296	1377	0	AUG	UAA	2	48
CYTB	0	1140	0	AUG	UAA	2	40
ND2	0	1041	0	AUU	UAA	2	43
ND1	2	955	0	AUA	UAA	1	45
COX3	0	783	0	AUG	UAA	2	43
COX2	0	708	24	AUG	UAG	0	45
ATP6	161	679	0	AUG	UAA	1	45
ND6	0	524	?	AUG	UAG	0	-
ND3	0	345	0	AUA	UAA	2	44
ND4L	0	296	1371	AUG	UAA	0	48
ATP8	1	206	634	AUG	UAG	0	45

5.1.1.1. Sestřih RNA

Sestřih mitochondriálních RNA probíhá podle takzvaného tRNA punctuation modelu.

Mitochondrie tvoří dlouhé polycistronní transkripty, z kterých musí být jednotlivá RNA vystřižena.

Buňka pro tento účel využívá tRNA, které jsou rozmístěny mezi ostatní geny a tvoří sekundární struktury jednoduše rozpoznatelné RNázami. V několika případech nejsou na koncích mRNA žádné tRNA, ale předpokládá se, že jsou tam sekundární struktury podobné tRNA, které plní stejnou funkci. Po rozpoznání těchto struktur provedou RNázy jednoduché endonukleázové štěpení, na 3' konci tRNA provede štěpení RNáza Z, nejspíše ELAC2 a na 5' konci RNáza P. Mitochondriální RNáza P je bílkovina s třemi podjednotkami, mimo funkce v tomto štěpení funguje i jako metyltransferáza pro tRNA. *Převzato z (Fernandez-Silva, Enriquez et al. 2003; Temperley, Wydro et al. 2010).*

5.1.1.2. Polyadenylace mRNA

V cytosolu hraje polyadenylace důležitou roli v iniciaci translace, kde poly-A a metylguanosiňová čepička interagují přes další proteiny, cirkularizují mRNA a iniciují translaci. Mitochondriální mRNA žádnou čepičku neobsahuje, iniciační kodon je hned na začátku molekuly a role polyadenylace v ribozomální translaci je nejasná.

Hlavním důvodem proč dochází k polyadenylaci v mitochondrii je vytvoření stop kodonu UAA u 7 mRNA končících U nebo UA (Anderson, Bankier et al. 1981).

U jaderných RNA polyadenylace zvyšuje stabilitu, naopak u bakterií a chloroplastů stimuluje degradaci polyadenylovaných RNA. Polyadenylace u mitochondriální mRNA má velice různorodou funkci u různých organismů. U rostlin, stejně jako chloroplasty stimuluje polyadenylace degradaci, u kvasinek se nevyskytuje vůbec. U některých zástupců protistů probíhají dvě polyadenylace po sobě. První polyadenylace stabilizuje transkript a druhá je esenciální pro syntézu bílkoviny. *Převzato z (Rorbach and Minczuk 2012)*. Savčí mitochondrie se liší od všech těchto vyjmenovaných. Existují v ní totiž nejspíše dvě na sobě nezávislé polyadenylace. Eukaryotická stabilizující polyadenylace na 3' konci, ale také jako pozůstatek prokaryotického předka polyadenylace označující RNA pro degradaci. V mitochondrii byly totiž objeveny interně polyadenylované transkripty směřující k degradaci. Tato polyadenylace se ale nevyskytuje u všech transkriptů (Slomovic, Laufer et al. 2005). Polyadenylaci provádí v lidské mitochondrii protein hmtPAP (Tomecki, Dmochowska et al. 2004). Další enzym důležitý pro polyadenylaci, ale i degradaci a sestřih je PNPáza. Její silencing významně ovlivnil jak sestřih, tak polyadenylaci. Výsledky se ale velice liší gen od genu. V mitochondrii se však PNPáza nachází v mezimembránovém prostoru, kde se žádné mitochondriálně kódované RNA nevyskytují, polyadenylaci tudíž ovlivňuje nejspíše nepřímo. Při silencingu PNPázy společně s hmtPAP byly stále přítomny krátké oligo-A řetězce, což naznačuje, že existuje ještě nějaký neobjevený polyadenylující (nebo oligoadenilující) protein (Slomovic and Schuster 2008).

5.1.1.3. Translace

O mitochondriálních mRNA se obecně tvrdí, že nemají žádné nepřekládané úseky (UTR), toto tvrzení však platí jen pro čtyři z nich. Na 5' konci to ale jsou jen 1-3 nukleotidové úseky u tří mRNA. ND4 a ATP6 má velké 5'UTR, ale to jsou vlastně jen části ND4L, respektive ATP8, jakožto bicistronních transkriptů. To samé platí i obráceně a ND4L a ATP8 mají 3'UTR patřící ND4 a ATP6. CO2 obsahuje jedinou delší UTR než 3nt, která nemá nebo u ní ještě nebyla zjištěna pravá funkce. Tato UTR navíc ani není konzervovaná u všech druhů. Jelikož mitochondriální mRNA tedy neobsahují žádné regulační UTR, musí být všechny signály, například pro štěpení, polyadenylaci nebo translaci zakódovány už v sekvenci samotného genu. Translace začíná na iniciačním kodonu, který se nachází na začátku molekuly nebo za 3' UTR. Iniciačním kodonem je ve většinou AUG, ve třech případech AUA a u ND2 mRNA je to AUU. Z důvodu absence UTR a methylguanosinové čepičky musí mít mitochondrie odlišný způsob translace od jaderné, pro kterou jsou tyto struktury nezbytné. *Převzato z (Temperley, Wydro et al. 2010)*.

5.1.2. tRNA

Všech 22 mitochondriálních tRNA je v genomu rozmístěno na obou vláknech téměř pravidelně mezi ostatními geny. V mitochondrii mají tRNA mnohem více funkcí než v jádře. Mimo své hlavní funkce se totiž ještě účastní terminace transkripce, pomáhají iniciaci replikace L-vlákna a označují sestřihová místa na polycistronních transkriptech. Sestřih probíhá, jak už bylo popsáno, pomocí tRNA-punctuation modelu z polycistronního transkriptu. V lidské mitochondrii to nejpíše probíhá tak, že na 5' konci tRNA provede štěpení RNáza P a na 3' konci tRNáza Z a tím se tRNA uvolní. Role těchto tRNA se v translaci neliší od jaderných, jen pro iniciaci translace se stejně jako v bakterii využívá formyl-methionyl-tRNA. Ta se vyskytuje současně se svou neformylovanou verzí, která je využívána v elongaci. Mitochondriální tRNA zaujímají, stejně jako jaderné, strukturu jetelového listu. Tuto strukturu ovšem postrádá tRNA_{Phe(AGY)}, jelikož jí úplně chybí D-smyčka.

Na 3' konec tRNA musí být dodatečně přidán CCA triplet pomocí jaderné kódované aminoacyl-tRNA syntetázy. tRNA obsahují také posttranskripčně modifikované nukleotidy. Zatím bylo objeveno 16 různých modifikací na 11 tRNA, z nichž 3 se vyskytují právě jen v mitochondrii. Tyto modifikace jsou důležité k zaujetí jejich správné konformace. *Převzato z (Levinger, Morl et al. 2004; Suzuki and Nagao 2011).*

Mitochondriální tRNA na rozdíl od jaderných neobsahují 3' koncovou polyadenylaci, ale jsou polyadenylovány interně a tím jsou směřovány na degradující dráhu závislou na polyadenylaci (Slomovic, Laufer et al. 2005).

5.1.3. rRNA

Mitochondriální rRNA jsou v genomu jen na H-vláknech za sebou hned za iniciačním místem ohraničené jen tRNA pro fenylalanin, valin a leucin, které slouží k jejich vystřižení. Jsou menší než cytoplazmatické, 12S rRNA je dlouhá přibližně 1kbp a 16S 1,5kbp. Oblast kde jsou v genomu rRNA je přepisována ze dvou promotorů, H₁ a H₂, které začínají téměř na stejném místě. Z promotoru H₂ se transkribuje celé vlákno, zatímco transkripce z promotoru H₁ končí za genem pro 16S rRNA, tím je redukováno množství rRNA vůči mRNA z H-vlákna. (Montoya, Gaines et al. 1983) 3' konec transkriptů 16S rRNA z H₁ promotoru je díky nepřesnosti této terminace heterogenní a může obsahovat části mt-tRNA_{Leu}. 3' konec může být také polyadenylován, ale většinou ne více než tři nebo čtyři adeniny. (Van Etten, Bird et al. 1983) rRNA podléhá i dalším posttranskripčním úpravám. Některé nukleotidy jsou metylovány a jeden je přeměn na pseudouridin.

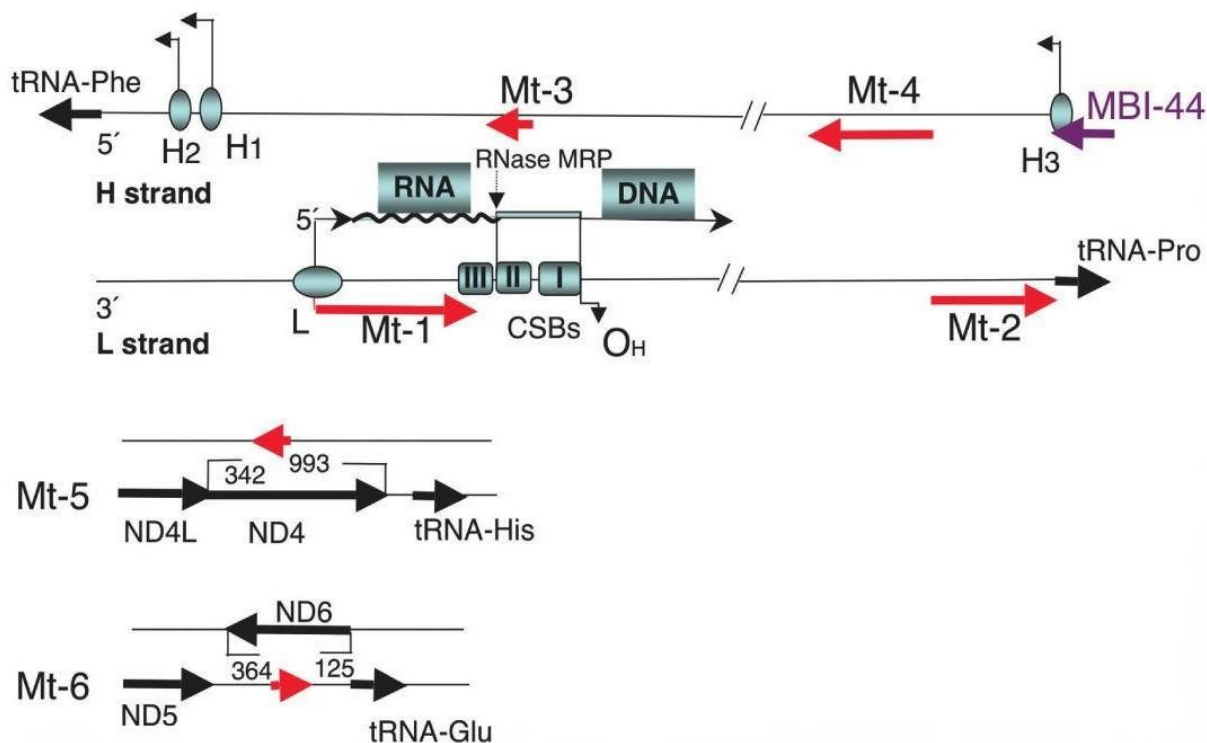
5.1.4. Nekódující RNA

Nekódující RNA tvoří až 15% z lidského mitochondriálního transkriptomu (tRNA a rRNA se neberou v úvahu). Z genu kódujícího protein mohou vzniknout teoreticky dva různé transkripty: jeden, z kterého se translací může vytvořit daný protein (sense), nebo jeho komplementární protějšek (anti-sense). Jelikož mitochondrie vytváří polycistronní transkripty celého vlákna, při sestřihu opačného vlákna vlastně vznikají anti-sense transkripty všech genů. Ty jsou však nejspíše velmi rychle degradovány a u člověka byly objeveny jen 3 dlouhé nekódující RNA, anti-sense transkripty genů ND5, ND6 a CYB. Tyto RNA jsou sestřihávány stejnými proteiny, jako normální RNA a vyskytují se až v polovičních koncentracích, než jejich sense protějšky. Jsou ovšem plné stopkodonů a slouží nejspíše k posttranskripční regulaci jejich komplementárních mRNA. To podporuje i zjištění, že v různých tkáních je jejich výskyt velmi odlišný. Nejvíce se vyskytují ve vaječnicích a varlatech (Rackham, Shearwood et al. 2011).

Malé nekódující RNA (ncRNA) byly identifikovány v širokém spektru organismů od bakterií po člověka. Z nekódujících RNA je v mitochondrii samozřejmě většina rRNA a tRNA. Dále jsou to meziproducty degradace, RNA z jádra (6,6%) a zbytek tvoří ostatní RNA, které by mohly být ncRNA. ncRNA objevené v mitochondrii myši jsou buď z D-loop nebo anti-sense RNA:

Mt-1 je sekvence začínající na predikovaném místě pro RNA primer replikace na L -vlákně. Jeho 3' konec je heterogenní a končí před místem působení RNázy MRP. Vzniká nejspíše předčasnou terminací transkripce primeru pro replikaci. Tím se znemožní sestřih RNázou MRP a reguluje tedy negativně replikaci. Mt-2 je kódováno L-vláknem v pozici těsně před tRNA_{Pro} a proto to bude nejspíše zbytek ze sestřihu této tRNA. Mt-3 je 23nt dlouhá sekvence z H-vlákna a z druhé strany než Mt-1 přechází místo štěpení RNázy MRP, proto nejspíše také ovlivňuje její aktivitu. Mt-4 je dlouhá 55 nt a také se nachází v D-loop.

Dále byly popsány anti-sense RNA genů pro ND4 a ND6, které se teoreticky mohou účastnit regulace genové exprese těchto genů, tak jak to funguje u bakterií (Lung, Zemmann et al. 2006).



Malé nekódující RNA v mitochondrii (Lung, Zemann et al. 2006)

5.1.5. Jaderné RNA

Savčí mitochondrie obsahuje také malé množství RNA z jádra. Naprostá většina z toho jsou různé rRNA, jako 28S, 5.8S, 5S a části 18S rRNA, jejich poměry se liší podle organismů. Byly nalezeny ale také fragmenty jaderné mRNA a miRNA, ovšem téměř v zanedbatelných množstvích (Lung, Zemann et al. 2006).

V mitochondrii probíhá také import 5S rRNA (i když není integrální součástí mitochondriálního ribozomu) dovnitř přes membránové proteiny a je energeticky závislý na ATP a membránovém potenciálu. Lidská mitochondrie má i prostředky na přenos některých tRNA, ale *in vivo* se to zřejmě neděje (Entelis, Kolesnikova et al. 2001).

5.2. Degradace RNA

RNA je obecně degradována velkými proteinovými komplexy, jako eukaryotický exozom nebo bakteriální degradozom. Tyto komplexy obsahují dvě základní bílkoviny, RNA helikázu, která rozplétá sekundární strukturu RNA a tím usnadňuje práci ribonukleáze rozkládající RNA.

U kvasinkových mitochondrií provádí degradaci RNA mtEXO komplex, jako helikáza funguje SUV3 a jako ribonukleáza DSS1. V buňkách bez degradozomu se akumulovaly nesprávně procesované

transkripty. Jako následek toho ztrácely buňky translaci a byly nekompetentní, což potvrzuje roli degradozomu v rozkladu RNA (Dziembowski, Piwowarski et al. 2003).

Lidský homolog SUV3 byl objeven a také jeho absence způsobuje hromadění zkrácených polyadenylovaných transkriptů a zhoršuje proteosyntézu. To vede ke snížení množství mtDNA, rozpadu mitochondriální sítě a nakonec k buněčné smrti. To naznačuje, že SUV3 je součástí degradozomu, podobně jako v kvasince (Khidr, Wu et al. 2008).

Exoribonukleáza není konzervovaná jako helikáza a její funkci může plnit několik možných proteinů. Jako nejlepší kandidát se jeví PNPáza, která byla objevena v mitochondrii a je schopná degradovat RNA ve 3'-5' směru (Piwowarski, Grzechnik et al. 2003). PNPáza je navíc přítomna i v degradozomu bakterií (Carpousis 2007).

Jelikož není dokázáno, že PNPáza je opravdu ten protein, který je hlavní pro degradaci RNA v mitochondrii, zkoumají se i jiní možní kandidáti, REXO2, EndoG, RNáza L. Některé další ještě nejspíše nebyly objeveny nebo nebyla dokázána jejich přítomnost v mitochondrii.

6. Ribozom

Ribozom je supramolekulární struktura obsahující jak RNA, tak proteiny a je to tedy ribonukleoproteinový komplex. Savčí mitochondriální ribozom tvoří 39S neboli velká ribozomální podjednotka (LSU), která vzniká z 16S rRNA a 28S, tedy malá ribozomální podjednotka (SSU), vznikající z 12S rRNA. Celý mitochondriální 55S ribozom vznikl z prokaryotického 70S ribozomu a je mu strukturně mnohem příbuznější, než eukaryotickému cytoplazmatickému 80S ribozomu. Savčí mitochondriální ribozomy jsou odlišitelné od těchto dvou dalších typů několika unikátními znaky. Mají podobnou velikost jako ribozomy bakteriální, ale obsahují asi dvakrát více bílkovin a jen polovinu rRNA. Mají dokonce více proteinů než mnohem větší eukaryotické cytoplazmatické ribozomy (Denslow and O'Brien 1984). rRNA savčích mitochondriálních ribozomů je asi o polovinu kratší než u bakterií a chybí jim úplně 5S část, která se nachází téměř ve všech známých ribozomech. rRNA obsahují méně modifikovaných nukleotidů než jiné známé rRNA. rRNA LSU mitochondrie obsahuje jen jediný pseudouridin, zatímco bakteriální 4-8 a savčí cytoplazmatická dokonce 57.

Savčí mitochondriální ribozom obsahuje 78 potvrzených jaderně kódovaných bílkovin.

Mitochondriální ribozomální proteiny (MRP) se v evoluci vyvíjely poměrně rychle, aby dorovnal změny v rychle mutující ribozomální rRNA. Velká mutační rychlost v mitochondrii v průběhu evoluce zkrátila rRNA, což muselo být kompenzováno proteiny z matrix. Tudíž v ribozomu převládají protein-proteinové interakce. Nové proteiny nejsou homologní s prokaryotickými ani eukaryotickými ribozomálními proteiny a mají i funkce mimo ribozom. *Převzato z (O'Brien 2003).*

6.1. Skládání ribozomu

Skládání jaderného ribozomu začíná v jádře syntézou rRNA a následuje její skládání a modifikace. Tohoto procesu se účastní více než 180 agregačních faktorů a 100 malých jaderných RNP (snoRNP) asociovaných s pre-rRNA, katalyzujících posttranskripční modifikace rRNA a tvorbu aktivních míst. Každá snoRNP obsahuje čtyři hlavní proteiny a unikátní snoRNA, která se páruje s pre-rRNA a po úpravě zase disociuje. Roli ve skládání hrají samozřejmě také ribozomální proteiny, které už zůstávají součástí ribozomu. Ribozom se utváří hierarchicky přes odděleně skládané subkomplexy, ty postupně nasedají na rRNA a vytvoří preribozom, který je následně ještě upraven a maturován.

Pro skládání ribozomu je potřeba mnoho GTPáz a ATPáz. Nasednutí a hydrolýza ATP či GTP může stabilizovat či destabilizovat bílkoviny asociované s preribozomem, může katalyzovat konformační změny RNA nebo RNP a nebo fungovat jako odstranitelné pojistky proti předčasné asociaci komplexů. Podobná funkce může být zajištěna i posttranslačními modifikacemi. Další regulace se provádí na úrovni kontroly kvality, kdy se při nesprávném skládání ribozomu tvoří nestabilní intermediáty. Tím se utváří několik úrovní regulace, což je pro takto složitý děj esenciální. *Převzato z (Staley and Woolford 2009).*

O skládání mitochondriálního ribozomu se toho ví mnohem méně. Základní principy budou nejspíše stejné a budou v něm hrát roli jak modifikace rRNA, tak mnoho proteinů pomáhajících skládání a mitochondriální ribozomální proteiny. Modifikace rRNA se v mitochondrii neúčastní snoRNP, ale metyltransferázy. Mitochondrie je organela oddělená od buňky dvěma membránami a tím pádem musí proteiny směřované do mitochondrie projít přes buňku a následně ještě přes složitý komplex membránových transportérů. Aby se tento energeticky i časově náročný transport co nejvíce minimalizoval, tak mnoho proteinů zastává více funkcí. V poslední době se ukazuje, že skládání ribozomu je velmi provázáno s replikací, transkripcí a dokonce i se skládáním respiračního řetězce.

6.1.1. Nastavení rovnováhy množství rRNA vůči MRP

Buňka musí nastavit mechanismy, jak koordinovat tvorbu mitochondriální rRNA s jaderně kódovanými ribozomálními proteiny. Jinými slovy, buňka se musí vypořádat se složitou situací, kdy nemůže plýtvat zbytečně energií tím, že bude nekoordinovaně vyrábět nadbytečné množství buď mitochondriálních rRNA nebo jaderných proteinů. Musí tedy regulovat z jádra společně expresi jak jadernou, tak mitochondriální.

Příkladem takové regulace, ač v tomto případě u mRNA je stabilizace mRNA cytochromu b pomocí jaderně kódovaného proteinu Cbp1. Gen CBP1 kóduje dva transkripty, jeden z nich zkrácený z 3' konce asi v polovině uvnitř kódující sekvence. Krátký transkript je nefunkční a jeho produkce tedy

snižuje množství mRNA cytochromu b. To je tedy jeden příklad, jakým jádro reguluje množství mRNA cytochromu b a možný způsob regulace dalších mitochondriálních RNA, tedy i rRNA (Sparks, Mayer et al. 1997).

Nejjednodušší možnost takovéto regulace je ale přes MTERF1. Ten, jakožto hlavní represor transkripce se váže na mtDNA za geny pro 12S a 16S rRNA a zastavuje ji, čímž reguluje expresi rRNA vůči ostatním RNA a nepřímo tedy i vůči jaderným proteinům (Montoya, Gaines et al. 1983). Všechny MTERF proteiny regulují transkripci, mají ale i další funkce. MTERF3 reguluje vztah mezi transkripcí a translací a pomáhá sestavit velkou ribozomální podjednotku (Wredenberg, Lagouge et al. 2013). MTERF4 kontroluje ribozomální biogenezi a translaci. Tvoří komplex s ribozomální metyltransferázou NSUN4 a je důležitý pro její přisednutí k LSU. Zároveň metyluje 12S rRNA v pozici C847. Jeho ztráta vede k špatnému složení ribozomu a drastické redukci translace (Camara, Asin-Cayuela et al. 2011).

Další z mechanismů, jak koordinovat ribozomální biogenezi a transkripci, kde transkripce rRNA musí být upravena v souladu s rychlostí importu a skládání jaderně kódovaných MRP, je využití enzymů, u kterých by se tato funkce na první pohled nečekala, například mitochondriální RNA polymerázy. Jak už bylo popsáno, pro transkripci je potřeba v základu POLRMT a TFB2M, které jsou aktivovány TFAMem. Na POLRMT ale také přímo nasedá mitochondriální ribozomální protein L7/L12 (MRPL12), čímž aktivuje transkripci. Tuto teorii podporuje fakt, že jeho silencing vede ke zmenšení množství transkriptů, ale na rozdíl od většiny jiných mitochondriálních proteinů to není způsobeno změnou jejich stability. MRPL12 na POLRMT nasedá nejspíše jen ve volné formě, tedy nenavázaný na ribozom. Nevyužitý MRPL12 tak zvyšuje produkci RNA, tedy i rRNA, s kterou poté vytváří ribozom (Surovtseva, Shutt et al. 2011).

POLRMT interaguje i s TFB1M, což je mimo transkripčního faktoru také 12S ribozomální RNA metyltransferáza důležitá pro skládání malé mitochondriální (28S) podjednotky. Asociují spolu v 28S ribozomálních komplexech, které se vůbec neúčastní transkripce a POLRMT nejspíše zvyšuje aktivitu TFB1M. POLRMT je tedy multifunkční protein, který nemá funkci jen polymerázy, ale účastní se i jiných dějů ovlivňujících genovou expresi (Surovtseva and Shadel 2013).

6.1.2. rRNA

Skládání ribozomu probíhá na několika úrovních. První je samozřejmě transkripce rRNA z mtDNA. Tato rRNA je poté postranskripčně modifikována. V mitochondrii jsou modifikace redukovány na minimum, zbyly jen ty, které jsou vysoce konzervované a tedy naprosto nezbytné pro správnou funkci rRNA.

První důležitý bod v procesu skládání ribozomu po transkripci rRNA je stabilizace RNA do doby, dokud se kolem této RNA nezačne skládat ribozom. Mimoto musí RNA zaujmout správnou

konformaci. Tuto funkci pro 12S rRNA zajišťuje GTPáza ERAL1, která slouží nejspíš jako mitochondriální RNA chaperon a váže se ke smyčce na 3' konci. Její ztráta totiž vede k rychlému rozpadu vznikajících 12S rRNA a následně k apoptóze, která může být ale způsobena i ztrátou mRNA, jelikož tato bílkovina zabraňuje i rozpadu většiny mitochondriální mRNA (Dennerlein, Rozanska et al. 2010).

6.1.2.1. Modifikace 12S rRNA

Modifikace rRNA byly u savců zkoumány na křečcích. U lidí nebyla většina těchto modifikací experimentálně potvrzena. U křečka se na 12S rRNA vyskytuje pět modifikovaných nukleotidů. Tři z těchto modifikací jsou jednoduché metylace a dvě jsou dvojité metylace.

Tabulka modifikací 12S rRNA, převzato z (Rorbach and Minczuk 2012)

<i>E. coli</i>			Kvasinková mitochondrie		
Pozice	Modifikace	Modifikující protein	Pozice	Modifikace	Modifikující protein
788	Nemodifikována	N/A	1243	Nemodifikována	N/A
1402	m ⁴ Cm	<i>RsmH</i> , <i>RsmI</i>	1862	Nemodifikována	N/A
1403	Nemodifikována	N/A	1863	Nemodifikována	N/A
1518	m ⁶ ₂ A	<i>KsgA</i>	2002	Nemodifikována	N/A
1519	m ⁶ ₂ A	<i>KsgA</i>	2003	Nemodifikována	N/A
Savčí mitochondrie					
Pozice u křečka	Modifikace u křečka	Modifikující protein	Pozice u člověka	Modifikace u člověka	Modifikující protein
426	m ⁵ U	Neidentifikován	429	Nepotvrzena	Neidentifikován
847	m ⁴ C	Neidentifikován	846	Nepotvrzena	Neidentifikován
848	m ⁵ C	Neidentifikován	847	Nepotvrzena	Neidentifikován
939	m ⁶ ₂ A	TFB1M (TFB2M)	936	m ⁶ ₂ A	TFB1M (TFB2M)
940	m ⁶ ₂ A	TFB1M (TFB2M)	937	m ⁶ ₂ A	TFB1M (TFB2M)

První metylace se nachází na pozici U429, tedy v centrální doméně ribozomu uprostřed konzervované sekvence. U bakterií tato sekvence tvoří smyčku, která katalyzuje bakteriální metyltransferázu *KgsA*, důležitou pro složení ribozomu. V této pozici ale nemá bakterie U modifikovaný (Desai, Culver et al. 2011). Funkce metylace na pozici C846 je zatím neznámá. Její bakteriální homolog je dimethylace, která zvyšuje iniciaci mimo AUG a sílu UGA stopkodonu (Kimura and Suzuki 2010). Hned na vedlejší nukleotidu se nachází stejná metylace C847, u této modifikace je známý metylující komplex, provádí ji MTREF4 s metyltransferázou NSUN4 (Camara, Asin-Cayuela et al. 2011).

3' konec 12S rRNA obsahuje dva vysoce konzervované dimetylované adeniny. V bakteriích a dalších organismech dimetyluje rodina KsgA/Dim1 proteinů tyto dva adenosinové zbytky blízko 3' konce SSU. Při metyltransferázové reakci se naváže holý enzym na SSU rRNA, kde vydrží, než se ribozom částečně maturuje a pak enzym musí postupně stabilizovat oba adenosiny v aktivním místě a na každý přidat dvě metylové skupiny. V některých říších se vyvinuly i další funkce jako procesing rRNA, skládání ribozomu a dokonce i role v transkripci (O'Farrell, Musayev et al. 2010).

Platí to například u savců, tam tuto dimetylací provádí TFB1M, což jsou s TFB2M také transkripční faktory a homology KsgA. Jeho ztráta je embryonálně letální a způsobuje kompletní absenci této dimetylace, zhoršené skládání ribozomu a přerušení mitochondriální translace. Tyto dva dimetylované adeniny jsou takto konzervované nejspíše pro svoji nepostradatelnou roli v údržbě ribozomu (Metodieva, Lesko et al. 2009).

6.1.2.2. Modifikace 16S rRNA

Podobně jako u 12S rRNA byly u savců modifikace 16S rRNA zkoumány na křečcích, kde byly objeveny 3 metylace.

Tabulka modifikací 16S rRNA, převzato z (Rorbach and Minczuk 2012)

<i>E. coli</i>			Kvasinková mitochondrie		
Pozice	Modifikace	Modifikující protein	Pozice	Modifikace	Modifikující protein
2251	Gm	<i>RlmB</i>	2270	Gm	<i>Pet56p</i>
2552	Um	<i>RrmJ</i>	2791	Um	<i>MRM2</i>
2553	Nemodifikována	N/A	2792	Nemodifikována	N/A
2580	Psi	<i>RluC</i>	2819	Psi	<i>PUS5</i>
Savčí mitochondrie					
Pozice u křečka	Modifikace u křečka	Modifikující protein	Pozice u člověka	Modifikace u člověka	Modifikující protein
1144	Gm	Neidentifikován	1145	Nepotvrzena	Neidentifikován
1370	Um	Neidentifikován	1369	Nepotvrzena	Neidentifikován
1371	Gm	Neidentifikován	1370	Nepotvrzena	Neidentifikován
1398	Nenalezena	Neidentifikován	1397	Psi	Neidentifikován

Kvasinkový homolog metylace guanosinu v pozici 1145 je u kvasinek potřebný pro složení LSU *in vivo* (Sirum-Connolly and Mason 1993), u *E. coli* ale nemá žádnou významnou roli (Lovgren and Wikstrom 2001). Dvě metylace za sebou v pozici 1369 a 1370 se nachází u 3' konce 12S rRNA, tedy v A-smyčce, což je část peptidyltransferázového centra, které interaguje s aminoacylovým A místem

tRNA. Homolog metylace U na pozici 1369 se vyskytuje i u kvasinek, kde je metylována proteinem Mrm2. Mutací se buňka stává termosenzitivní a ztrácí mtDNA (Pintard, Bujnicki et al. 2002). U bakterií tato modifikace negativně reguluje přesnost translace (Widerak, Kern et al. 2005). Funkce místa 1370 není známa.

Pseudouridin v pozici 1397 je jediná potvrzená modifikace 16S rRNA u člověka. Tato modifikace ale nebyla nalezena u křečka (Ofengand and Bakin 1997).

6.1.3. Proteiny

Složení ribozomu je velice složitý proces a neúčastní se ho jen rRNA, ale i mnoho bílkovin. Na stavbě ribozomu se podílí nejen proteiny, které po složení zůstanou jeho součástí, ale také mnoho pomocných enzymů. Tyto proteiny taky většinou zastávají i další funkce, například se účastní replikace, transkripce, postranskripčních úprav, translace nebo dokonce skládání proteinů dýchacího řetězce. Mohou to být například helikázy, modifikující enzymy, GTPázy (Ras-like a translační) a další.

Kvasinková GTPáza Mtg2p je jeden z proteinů potřebných ke správnému složení ribozomu, v tomto případě LSU, která je uložena ve vnitřní membráně. Jejím silencingem se ztrácí mtDNA a sníží se množství ribozomálních podjednotek. Overexprese zase vyvažuje ztrátu mtDNA při nesprávné funkci 21S rRNA metyltransferázy (Datta, Fuentes et al. 2005).

Buňka při skládání tak složitěho komplexu jako ribozom potřebuje i proteázu. Proteiny v mitochondrii upravují AAA-proteázy, což jsou membránově vázané proteázy, které se účastní kontroly kvality a regulace membránových proteinů v mitochondrii. Jedna z AAA-proteáz zkracuje Mrpl32 a tím pomáhá jeho navázání k ještě nesloženému ribozomálnímu prekomplexu (Nolden, Ehses et al. 2005). C7orf30 je další potvrzený protein, který asociuje s lidskou LSU a podílí se na jejím skládání.

Jeho silencing redukuje translaci v buňce bez znatelného vlivu na počet mRNA a rRNA. Při overexpresi dominantní negativní mutanty se špatně skládá LSU a snižuje se formace celých ribozomů. To ukazuje, že C7orf30 je lidský agregační a/nebo stabilizační faktor LSU (Rorbach, Gammage et al. 2012). Tento protein je z DUF134 rodiny, jejíž konzervovaná funkce je inhibice asociace velké a malé mitochondriální podjednotky. V lidských mitochondriích tedy ale hraje opačnou roli a je esenciální pro biogenezi ribozomu a translaci. Protein MRPL14 asociuje s C7orf30 a jeho vyřazení má stejný efekt. (Fung, Nishimura et al. 2013).

Je známo velmi málo savčích agregačních faktorů. Proto je dobré si při jejich hledání pomoci bakteriálními homology, které by mohly mít podobnou funkci, jelikož mají stejný původ. RbgA, což je bakteriální homolog mitochondriální proteinu Mtg1, je důležitý pro skládání LSU v *Bacillus subtilis*. Ani tady ovšem jeho přesná role není úplně vysvětlena. Jeho defekt zabraňuje maturaci LSU a tím pádem vede ke zvýšené koncentraci nezralých LSU v buňce. Je to GTPáza, která interaguje s 50S

podjednotkou bakteriálního ribozomu a 45S intermediátem. Navázání na 50S podjednotku ovšem na rozdíl od navázání na 45S zvyšuje GTPázovou aktivitu asi 55x, GTP je hydrolyzován na GDP a protein ztrácí vazebnou aktivitu. To naznačuje, že RbgA zastává roli v závěrečné části ribozomální biogeneze a při vytvoření 50S z 45S intermediátu proběhne hydrolyza GTP a dojde k uvolnění proteinu z ribozomu. Podobnou funkci by mohlo mít i mitochondriální Mtg1 (Achila, Gulati et al. 2012).

6.1.3.1. Asociace ribozomu s vnitřní mitochondriální membránou

Při mutaci proteinu Mrp20 lokalizovaného v místě výstupu nově tvořených proteinů, který je součástí kvasinkové mitochondriální LSU, se zastaví skládání ribozomu a vzniká subkomplex na vnitřní mitochondriální membráně. To ukazuje, že skládání ribozomu probíhá nejspíše na vnitřní mitochondriální membráně, která tvoří jednak platformu pro složení a navíc mnoho proteinů podílejících se na skládání ribozomu je s membránou asociovaných. Bakteriální ribozomy jsou na rozdíl od mitochondriálních nejen membránově vázané, ale jsou přítomny i volně v cytoplazmě. Mitochondriální ribozomy však slouží k translaci pouze membránových komponent dýchacího řetězce, takže by jejich volná forma neměla žádné využití (Kaur and Stuart 2011).

U kvasinek jsou ribozomy asociovány s membránou přes translační aktivátory specifické pro mRNA, které se podílí na rozpoznávání iniciačního kodonu. Nově syntetizované proteiny jsou pak přesunuty do membrány a složeny v respirační komplex za pomoci ribozomálních proteinů (Chacinska and Boguta 2000).

6.1.3.1.1. Funkce ribozomu ve skládání dýchacího řetězce

V mitochondrii se tedy vyvinul kolem ribozomu celý systém, který už neslouží jen k výrobě proteinu, ale rovnou upravuje vytvořené proteiny a sám je skládá do nadmolekulárních komplexů, tedy do dýchacího řetězce. V průběhu evoluce totiž mnoho ribozomálních proteinů získalo další domény pro specifické vlastnosti a funkce translační mašinérie v mitochondrii. Mrp136 je protein asociovaný s LSU, který na C-konci obsahuje specifickou doménu. Ta není přímo potřebná pro proteosyntézu, ale zvyšuje stabilitu Mrp136 a nově syntetizované proteiny jsou bez ní špatně inkorporovány do respiračních komplexů a degradovány. Overexprese tohoto proteinu dokonce zvyšuje účinnost translace. Mrp136 tedy nejspíš hraje důležitou roli v průběhu translace a nastavuje rychlost skládání respiračního řetězce. To je nejspíše provedeno pomocí stabilizační aktivity Mrp136 v interakci mezi malou a velkou podjednotkou, což zvyšuje přesnost translace (Prestele, Vogel et al. 2009).

Jeden z proteinů skládajících dýchací řetězec je také Nitric oxide associated-1 (NOA1). Je to GTPáza lokalizovaná do mitochondrie. Její silencing bývá letální a vede k mnoha defektům. Naruší se mitochondriální syntéza proteinů a skládání respiračního řetězce, čímž se navodí buněčná smrt. Jak se ale ukazuje, i tato GTPáza má roli v biosyntéze mitochondriálních ribozomů a jejím silencingem se naruší jejich skládání (Kolanczyk, Pech et al. 2011).

Další proteiny důležité pro translaci a skládání respiračního řetězce jsou ObgH1 a Mtg1, proteiny asociované s vnitřní mitochondriální membránou, ale stejně jako jejich bakteriální homology ObgE, respektive RbgA, pomáhají také tyto proteiny složit velkou podjednotku ribozomu. Takže jediný protein může být díky unikátnímu uspořádání a funkci mitochondriálního ribozomu důležitý ve všech částech od skládání ribozomu až po složení vytvořených proteinů do dýchacího řetězce (Kotani, Akabane et al. 2013).

6.1.3.2. Asociace ribozomu s nukleoidem

Ribozom neasociuje nejspíše jen s vnitřní mitochondriální membránou, ale i s nukleoidem, který je také navázaný na membránu. Tím se akumuluje celá biosyntéza mitochondrie na jedno místo, což přináší mnohé výhody, jako ušetření energie a času potřebných na přenos. Protein C4orf14 je homolog bakteriální proteinu YqeH, který pomáhá složit SSU. C4orf14 je GTPáza a byl izolován z lidských buněk společně s 28S podjednotkou. Jeho silencing ovlivňuje komponenty SSU a vede ke zpomalení proteosyntézy v mitochondrii. Byl také nalezen asociovaný s mitochondriálními nukleoidy a jeho silencing vede také k úbytku mtDNA. Asociace s mtDNA, mitochondriálními translačními faktory a zároveň se SSU naznačuje, že 28S podjednotka je sestavována na mitochondriálním nukleoidu, což umožňuje přímý přenos mRNA z nukleoidu na ribozom (He, Cooper et al. 2012).

7. Diskuze

Mitochondrie je organela s vlastním proteosyntetickým aparátem, který si i v eukaryotickém organismu zachovává některé rysy svého prokaryotického předka. Přestože mitochondriální genom ztratil v průběhu evoluce většinu genů, pořád je nezbytný pro syntézu třinácti podjednotek dýchacího řetězce.

Metabolismus RNA v mitochondrii je velmi provázaný a jednotlivé procesy se navzájem ovlivňují. POLRMT je mitochondriální RNA polymeráza a její hlavní úkol je tedy transkripce. V mitochondrii se však při transkripci tvoří také primery a ovlivňuje tím replikaci. Váže různé transkripční faktory, jako TFAM, nebo TFB1M a TFB2M, které v mitochondrii fungují i jako metyltransferázy pro modifikaci rRNA a pomáhají tedy sestavit ribozom (Metodieva, Lesko et al. 2009). POLRMT váže ale i volný MRPL12. Tento mitochondriální ribozomální protein aktivuje POLRMT, jako signál k transkripci rRNA (Surovtseva, Shutt et al. 2011). MRP se neúčastní jen regulace transkripce, ale také skládání ribozomu a translace. Jsou často membránově vázané a pomáhají i se složením proteinů do dýchacího řetězce (Prestele, Vogel et al. 2009; Kaur and Stuart 2011; Fung, Nishimura et al. 2013). Z tohoto jednoduchého příkladu je vidět velká vzájemná regulace všech mitochondriálních dějů, ale zároveň i křehkost tohoto systému.

Mitochondriální genom kóduje třináct podjednotek dýchacího řetězce. Jakákoli chyba v procesu replikace, transkripce či translace může způsobit defekty těchto proteinů a tedy i dýchacího řetězce a tím ovlivnit funkčnost výroby energie v buňce. Mutační rychlost DNA v mitochondrii je mnohem vyšší než v jádře. Naštěstí každá buňka obsahuje mnoho molekul mtDNA, které ty poškozené mohou zastoupit. Přesto se v průběhu lidského života může stát, že počet mutovaných mtDNA v buňce přesáhne kritickou úroveň. Nemusí však být zasaženy jen geny pro jednotlivé podjednotky dýchacího řetězce. Většina mutací v mtDNA nastává v genech pro tRNA, čímž dochází k narušení translace. Například diabetes mellitus II. typu může být také způsoben mutací genu pro tRNA_{Leu(UUR)} v mtDNA (Ma, Wang et al. 2000). Mutace rRNA můžou narušit skládání ribozomu či translaci. Mitochondriální choroby ale nemusí nastat jen při mutacích mtDNA. Mnoho dalších proteinů účastnících se mitochondriálních dějů je jaderně kódovaných. Všechny transkripční faktory, polymerázy, MRP, proteiny účastnící se skládání ribozomu, sestřihu nebo modifikací RNA mohou při svém defektu negativně ovlivnit produkci mitochondriálně kódovaných proteinů a způsobit tak množství chorob, které mohou být až letální. *Převzato z (Shutt and Shadel 2010 Liu; Suzuki and Nagao 2011; Chan et al. 2012).*

8. Závěr

Tato práce shrnuje poznatky z oblasti mitochondriální genetiky a snaží se poukázat na propojenost všech biosyntetických dějů odehrávajících se v mitochondrii. Výzkum mitochondriální biogeneze totiž zažívá v poslední době svoji malou renesanci. Nové a zajímavé téma rozepsané v této práci je skládání mitochondriálního ribozomu, který se nyní dostal do popředí zájmu vědců na celém světě, jelikož se o něm vědělo jen málo, ale jeho defekty jsou zdrojem mnoha chorob. V posledních letech vyšlo mnoho publikací na téma skládání lidských mitochondriálních ribozomů a tato práce se je snaží shrnout a dát do kontextu s ostatními mitochondriálními ději.

9. Seznam Literaturny

- Achila, D., M. Gulati, et al. (2012). "Biochemical characterization of ribosome assembly GTPase RbgA in *Bacillus subtilis*." J Biol Chem **287**(11): 8417-23.
- Anderson, S., A. T. Bankier, et al. (1981). "Sequence and organization of the human mitochondrial genome." nature **290**(5806): 457-65.
- Arnold, J. J., E. D. Smidansky, et al. (2012). "Human mitochondrial RNA polymerase: structure-function, mechanism and inhibition." Biochim Biophys Acta **1819**(9-10): 948-60.
- Bogenhagen, D. and D. A. Clayton (1977). "Mouse L cell mitochondrial DNA molecules are selected randomly for replication throughout the cell cycle." Cell **11**(4): 719-27.
- Camara, Y., J. Asin-Cayuela, et al. (2011). "MTERF4 regulates translation by targeting the methyltransferase NSUN4 to the mammalian mitochondrial ribosome." Cell Metab **13**(5): 527-39.
- Carpousis, A. J. (2007). "The RNA degradosome of *Escherichia coli*: an mRNA-degrading machine assembled on RNase E." Annu Rev Microbiol **61**: 71-87.
- Copeland, W. C. and M. J. Longley (2003). "DNA polymerase gamma in mitochondrial DNA replication and repair." ScientificWorldJournal **3**: 34-44.
- Daga, A., V. Micol, et al. (1993). "Molecular characterization of the transcription termination factor from human mitochondria." J Biol Chem **268**(11): 8123-30.
- Datta, K., J. L. Fuentes, et al. (2005). "The yeast GTPase Mtg2p is required for mitochondrial translation and partially suppresses an rRNA methyltransferase mutant, *mrm2*." Mol Biol Cell **16**(2): 954-63.
- Dennerlein, S., A. Rozanska, et al. (2010). "Human ERAL1 is a mitochondrial RNA chaperone involved in the assembly of the 28S small mitochondrial ribosomal subunit." Biochem J **430**(3): 551-8.
- Denslow, N. D. and T. W. O'Brien (1984). "Organization of proteins in mammalian mitochondrial ribosomes. Accessibility to lactoperoxidase-catalyzed radioiodination." J Biol Chem **259**(15): 9867-73.
- Desai, P. M., G. M. Culver, et al. (2011). "Site-directed mutants of 16S rRNA reveal important RNA domains for KsgA function and 30S subunit assembly." Biochemistry **50**(5): 854-63.
- Dziembowski, A., J. Piwowarski, et al. (2003). "The yeast mitochondrial degradosome. Its composition, interplay between RNA helicase and RNase activities and the role in mitochondrial RNA metabolism." J Biol Chem **278**(3): 1603-11.
- Entelis, N. S., O. A. Kolesnikova, et al. (2001). "5 S rRNA and tRNA import into human mitochondria. Comparison of in vitro requirements." J Biol Chem **276**(49): 45642-53.
- Falkenberg, M., M. Gaspari, et al. (2002). "Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA." Nat Genet **31**(3): 289-94.
- Fernandez-Silva, P., J. A. Enriquez, et al. (2003). "Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA." Exp Physiol **88**(1): 41-56.

- Fung, S., T. Nishimura, et al. (2013). "The conserved interaction of C7orf30 with MRPL14 promotes biogenesis of the mitochondrial large ribosomal subunit and mitochondrial translation." Mol Biol Cell **24**(3): 184-93.
- He, J., H. M. Cooper, et al. (2012). "Human C4orf14 interacts with the mitochondrial nucleoid and is involved in the biogenesis of the small mitochondrial ribosomal subunit." Nucleic Acids Res **40**(13): 6097-108.
- Holt, I. J., H. E. Lorimer, et al. (2000). "Coupled leading- and lagging-strand synthesis of mammalian mitochondrial DNA." Cell **100**(5): 515-24.
- Holt, I. J. and A. Reyes (2012). "Human mitochondrial DNA replication." Cold Spring Harb Perspect Biol **4**(12).
- Chacinska, A. and M. Boguta (2000). "Coupling of mitochondrial translation with the formation of respiratory complexes in yeast mitochondria." Acta Biochim Pol **47**(4): 973-91.
- Kaur, J. and R. A. Stuart (2011). "Truncation of the Mrp20 protein reveals new ribosome-assembly subcomplex in mitochondria." EMBO Rep **12**(9): 950-5.
- Khidr, L., G. Wu, et al. (2008). "Role of SUV3 helicase in maintaining mitochondrial homeostasis in human cells." J Biol Chem **283**(40): 27064-73.
- Kimura, S. and T. Suzuki (2010). "Fine-tuning of the ribosomal decoding center by conserved methyl-modifications in the Escherichia coli 16S rRNA." Nucleic Acids Res **38**(4): 1341-52.
- Kolanczyk, M., M. Pech, et al. (2011). "NOA1 is an essential GTPase required for mitochondrial protein synthesis." Mol Biol Cell **22**(1): 1-11.
- Kotani, T., S. Akabane, et al. (2013). "Human G-proteins, ObgH1 and Mtg1, associate with the large mitochondrial ribosome subunit and are involved in translation and assembly of respiratory complexes." Nucleic Acids Res **41**(6): 3713-22.
- Lee, D. Y. and D. A. Clayton (1998). "Initiation of mitochondrial DNA replication by transcription and R-loop processing." J Biol Chem **273**(46): 30614-21.
- Levinger, L., M. Morl, et al. (2004). "Mitochondrial tRNA 3' end metabolism and human disease." Nucleic Acids Res **32**(18): 5430-41.
- Liu, M. M., C. C. Chan, et al. (2012). "Genetic mechanisms and age-related macular degeneration: common variants, rare variants, copy number variations, epigenetics, and mitochondrial genetics." Hum Genomics **6**: 13.
- Lovgren, J. M. and P. M. Wikstrom (2001). "Hybrid protein between ribosomal protein S16 and RimM of Escherichia coli retains the ribosome maturation function of both proteins." J Bacteriol **183**(18): 5352-7.
- Lung, B., A. Zemann, et al. (2006). "Identification of small non-coding RNAs from mitochondria and chloroplasts." Nucleic Acids Res **34**(14): 3842-52.
- Ma, L., H. Wang, et al. (2000). "Mitochondrial gene variation in type 2 diabetes mellitus: detection of a novel mutation associated with maternally inherited diabetes in a Chinese family." Chin Med J (Engl) **113**(2): 111-6.

- Metodiev, M. D., N. Lesko, et al. (2009). "Methylation of 12S rRNA is necessary for in vivo stability of the small subunit of the mammalian mitochondrial ribosome." Cell Metab **9**(4): 386-97.
- Montoya, J., G. L. Gaines, et al. (1983). "The pattern of transcription of the human mitochondrial rRNA genes reveals two overlapping transcription units." Cell **34**(1): 151-9.
- Montoya, J., T. Christianson, et al. (1982). "Identification of initiation sites for heavy-strand and light-strand transcription in human mitochondrial DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(23): 7195-9.
- Nolden, M., S. Ehses, et al. (2005). "The m-AAA protease defective in hereditary spastic paraplegia controls ribosome assembly in mitochondria." Cell **123**(2): 277-89.
- O'Brien, T. W. (2003). "Properties of human mitochondrial ribosomes." IUBMB Life **55**(9): 505-13.
- O'Farrell, H. C., F. N. Musayev, et al. (2010). "Binding of adenosine-based ligands to the MjDim1 rRNA methyltransferase: implications for reaction mechanism and drug design." Biochemistry **49**(12): 2697-704.
- Ofengand, J. and A. Bakin (1997). "Mapping to nucleotide resolution of pseudouridine residues in large subunit ribosomal RNAs from representative eukaryotes, prokaryotes, archaeobacteria, mitochondria and chloroplasts." J Mol Biol **266**(2): 246-68.
- Pintard, L., J. M. Bujnicki, et al. (2002). "MRM2 encodes a novel yeast mitochondrial 21S rRNA methyltransferase." EMBO J **21**(5): 1139-47.
- Piowowski, J., P. Grzechnik, et al. (2003). "Human polynucleotide phosphorylase, hPNPase, is localized in mitochondria." J Mol Biol **329**(5): 853-7.
- Prestele, M., F. Vogel, et al. (2009). "Mrpl36 is important for generation of assembly competent proteins during mitochondrial translation." Mol Biol Cell **20**(10): 2615-25.
- Rackham, O., A. M. Shearwood, et al. (2011). "Long noncoding RNAs are generated from the mitochondrial genome and regulated by nuclear-encoded proteins." RNA **17**(12): 2085-93.
- Rorbach, J., P. A. Gammage, et al. (2012). "C7orf30 is necessary for biogenesis of the large subunit of the mitochondrial ribosome." Nucleic Acids Res **40**(9): 4097-109.
- Rorbach, J. and M. Minczuk (2012). "The post-transcriptional life of mammalian mitochondrial RNA." Biochem J **444**(3): 357-73.
- Shadel, G. S. and D. A. Clayton (1997). "Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates." Annu Rev Biochem **66**: 409-35.
- Shi, Y., A. Dierckx, et al. (2012). "Mammalian transcription factor A is a core component of the mitochondrial transcription machinery." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(41): 16510-5.
- Shutt, T. E. and G. S. Shadel (2010). "A compendium of human mitochondrial gene expression machinery with links to disease." Environ Mol Mutagen **51**(5): 360-79.
- Sirum-Connolly, K. and T. L. Mason (1993). "Functional requirement of a site-specific ribose methylation in ribosomal RNA." Science **262**(5141): 1886-9.
- Slomovic, S., D. Laufer, et al. (2005). "Polyadenylation and degradation of human mitochondrial RNA: the prokaryotic past leaves its mark." Mol Cell Biol **25**(15): 6427-35.

- Slomovic, S. and G. Schuster (2008). "Stable PNPase RNAi silencing: its effect on the processing and adenylation of human mitochondrial RNA." RNA **14**(2): 310-23.
- Sparks, K. A., S. A. Mayer, et al. (1997). "Premature 3'-end formation of CBP1 mRNA results in the downregulation of cytochrome b mRNA during the induction of respiration in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Cell Biol **17**(8): 4199-207.
- Staley, J. P. and J. L. Woolford, Jr. (2009). "Assembly of ribosomes and spliceosomes: complex ribonucleoprotein machines." Curr Opin Cell Biol **21**(1): 109-18.
- Surovtseva, Y. V. and G. S. Shadel (2013). "Transcription-independent role for human mitochondrial RNA polymerase in mitochondrial ribosome biogenesis." Nucleic Acids Res **41**(4): 2479-88.
- Surovtseva, Y. V., T. E. Shutt, et al. (2011). "Mitochondrial ribosomal protein L12 selectively associates with human mitochondrial RNA polymerase to activate transcription." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(44): 17921-6.
- Suzuki, T. and A. Nagao (2011). "Human mitochondrial tRNAs: biogenesis, function, structural aspects, and diseases." Annu Rev Genet **45**: 299-329.
- Temperley, R. J., M. Wydro, et al. (2010). "Human mitochondrial mRNAs--like members of all families, similar but different." Biochim Biophys Acta **1797**(6-7): 1081-5.
- Tomecki, R., A. Dmochowska, et al. (2004). "Identification of a novel human nuclear-encoded mitochondrial poly(A) polymerase." Nucleic Acids Res **32**(20): 6001-14.
- Van Etten, R. A., J. W. Bird, et al. (1983). "Identification of the 3'-ends of the two mouse mitochondrial ribosomal RNAs. The 3'-end of 16 S ribosomal RNA contains nucleotides encoded by the gene for transfer RNA^{Leu}UUR." J Biol Chem **258**(16): 10104-10.
- Widerak, M., R. Kern, et al. (2005). "U2552 methylation at the ribosomal A-site is a negative modulator of translational accuracy." Gene **347**(1): 109-14.
- Wredenberg, A., M. Lagouge, et al. (2013). "MTERF3 regulates mitochondrial ribosome biogenesis in invertebrates and mammals." PLoS Genet **9**(1): e1003178.
- Yasukawa, T., A. Reyes, et al. (2006). "Replication of vertebrate mitochondrial DNA entails transient ribonucleotide incorporation throughout the lagging strand." EMBO J **25**(22): 5358-71.