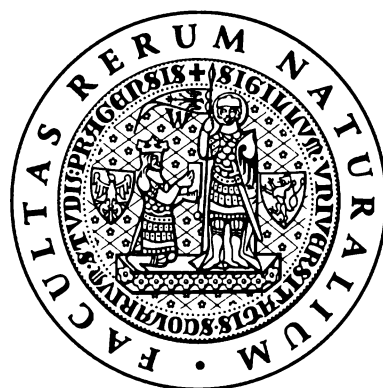


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA BIOCHEMIE



Cytochrom c oxidáza a její biogeneze

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2009

Jana Tesařová

Přírodovědecká fakulta UK
KNIHOVNA CHEMIE



3233137787

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Daniela Fornůsková

Laboratoř pro studium mitochondriálních poruch

Klinika dětského a dorostového lékařství 1.LF UK a VFN

Ke Karlovu 2, Praha 2

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně a že řádně cituji všechna převzatá data a skutečnosti.

V Praze 3.9.2009



Jana Tesařová

Obsah

OBSAH	3
PODĚKOVÁNÍ	4
SEZNAM ZKRATEK	5
ÚVOD	7
CÍL PRÁCE	8
1. MITOCHONDRIE	9
1.1. STRUKTURA A FUNKCE MITOCHONDRIÍ	9
1.2. MITOCHONDRIÁLNÍ GENOM	11
2. MITOCHONDRIÁLNÍ IMPORT PROTEINŮ	12
3. HOMEOSTÁZA MITOCHONDRIÁLNÍCH PROTEINŮ	14
4. SYSTÉM OXIDATIVNÍ FOSFORYLACE	15
4.1. PROTON-MOTIVNÍ SÍLA NA VNITŘNÍ MITOCHONDRIÁLNÍ MEMBRÁNĚ	16
4.2. DÝCHACÍ ŘETĚZEC	16
4.2.1. <i>Komplex I</i>	17
4.2.2. <i>Komplex II</i>	19
4.2.3. <i>Koenzym Q</i>	20
4.2.4. <i>Komplex III</i>	20
4.2.5. <i>Cytochrom c</i>	21
4.2.6. <i>Komplex IV</i>	22
4.3. ATP SYNTÁZA A OXIDATIVNÍ FOSFORYLACE.....	23
4.3.1. <i>ATP syntáza</i>	23
4.3.2. <i>Produkce ATP (oxidativní fosforylace)</i>	23
4.4. USPOŘÁDÁNÍ SYSTÉMU OXIDATIVNÍ FOSFORYLACE	26
4.5. REGULACE SYSTÉMU OXIDATIVNÍ FOSFORYLACE.....	27
4.6. PRAHOVÝ EFEKT A TKÁŇOVÁ SPECIFITA SYSTÉMU OXIDATIVNÍ FOSFORYLACE.....	29
5. CYTOCHROM C OXIDÁZA (KATALÝZA A BIOGENEZE)	31
5.1. STRUKTURA SAVČÍ CCO.....	31
5.2. KATALÝZA CCO	32
5.3. INHIBICE CCO	35
5.4. ASEMBLACE CCO.....	36
5.5. PORUCHY CCO.....	38
6. VYUŽITÍ RNA INTERFERENCE K REGULACI GENOVÉ EXPRESE	39
6.1. MECHANISMUS.....	39
6.2. POUŽITÍ RNAI V SAVČÍCH SYSTÉMECH	40
6.3. VYUŽITÍ RNAI K STUDIU FUNKCE STRUKTURNÍCH PODJEDNOTEK CCO	43
SOUHRN	47
ZÁVĚR	47
POUŽITÁ LITERATURA	48

Poděkování

Děkuji své školitelce Mgr. Daniele Fornůskové za odborné vedení a neocenitelné rady při sepisování této rešeršní práce. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. H. Hansíkové, CSc. a prof. RNDr. Marii Stiborové DrSc. rovněž za cenné poznatky a připomínky k této práci. Nakonec bych chtěla poděkovat skupině pracovníků Laboratoře pro studium mitochondriálních poruch za vytvoření přátelské atmosféry.

Seznam zkratek

ADP	adenosindifosfát
ATP	adenosintrifosfát
BN-PAGE	nativní polyakrylamidová elektroforesa (z ang. blue native polyacrylamide gel electrophoresis)
bp	páry basí (base pair)
CcO	komplex IV (cytochrom <i>c</i> oxidáza)
CoQ	koenzym Q (ubichinon)
dsRNA	dvouvláknová RNA (double-stranded RNA)
FAD	flavinadeninukleotid (oxidovaná forma)
FADH(2)	flavinadeninukleotid (redukováná forma)
FMN	flavinmononukleotid
IMM	vnitřní mitochondriální membrána (inner mitochondrial membrane)
IMS	mezimembránový prostor (intermembrane space)
miRNA	micro RNA
mtDNA	mitochondriální DNA
NAD	nikotinamidadeninukleotid (oxidovaná forma)
NADH	nikotinamidadeninukleotid (redukováná forma)
nDNA	jaderná DNA
nt	nukleotid
OMM	vnější mitochondriální membrána (outer mitochondrial membrane)
OxPhos	system oxidativní fosforylace
P/O	počet molů ADP fosforylovaných na ATP při průchodu 2 elektronů definovanou částí elektronového přenosu na kyslík
PCR	polymerázová řetězová reakce (z ang. polymerase chain reaction)
piRNA	PIWI interagující RNA
PIWI	(z ang. P-element induced wimpy testis)
pmf	proton-motivní síla (proton-motive force)
PTGS	posttranskripční snížení genové exprese (posttranscriptional gene silencing)
RISC	RNA-indukovaný umlčovací komplex (RNA-induced silencing complex)

RITS	RNA-indukované transkripční umlčení (z ang. RNA-induced transcriptional silencing)
RNAi	RNA interference
SDS-PAGE	denaturující polyakrylamidová elektroforesa s použitím dodecylsulfátu sodného (z ang. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
shRNA	malá vlásenková RNA (z ang. short hairpin RNA)
siRNA	malá interferující RNA (small interfering RNA)
ssRNA	jednovláknová RNA (single-strand RNA)
TIM	translokátor vnitřní membrány (translocase of the inner membrane)
TOM	translokátor vnější membrány (translocase of the outer membrane)

Úvod

Cytochrom *c* oxidáza (CcO) je terminální enzym dýchacího řetězce ve vnitřní mitochondriální membráně, který hraje důležitou roli v získávání energie pro aerobní organismy formou oxidativní fosforylace. Participuje na regulaci buněčných dějů, protože interaguje s dalšími komplexy mitochondrií. Jaderně nebo mitochondriálně kódované defekty CcO jsou dědičně podmíněné a obvykle velmi zásadní až neslučitelné se životem, proto jsou závažným zdravotnickým problémem. Projevují se především v tkáních s vysokými energetickými nároky jako jsou centrální nervová soustava, srdce, játra a svaly.

Cíl práce

Cílem této bakalářské práce je podat souhrn dosavadních poznatků mitochondriální problematiky se specifickým zaměřením na cytochrom *c* oxidasu; její strukturu, katalýzu, biogenezi a úlohu v systému oxidativní fosforylace (OxPhos). Práce dále podává možnosti využití RNA interference ke snížení genové exprese strukturních podjednotek CcO a stručný přehled, jak lze studovat a charakterizovat fenotyp CcO deficience na úrovni buněčných linií HEK293.

Podporováno projektem GAČR 303/07/0781.

1. Mitochondrie

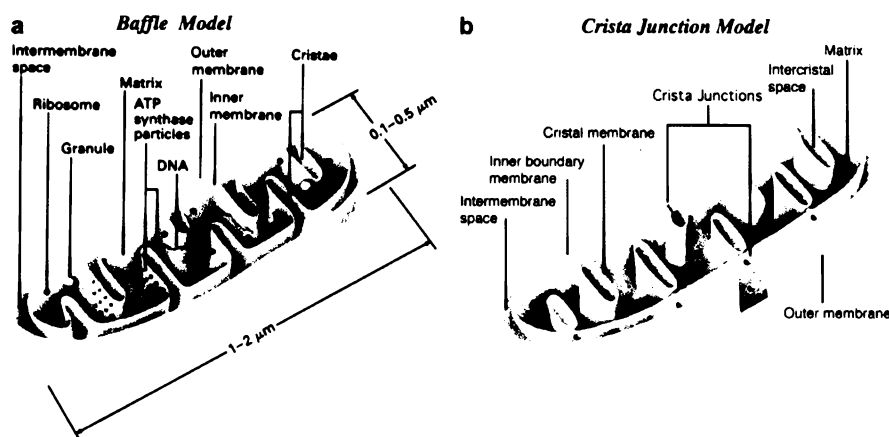
1.1. Struktura a funkce mitochondrií

Mitochondrie, objevené Altmanem roku 1890 [1], jsou jednou ze základních organel eukaryotní buňky a mohou tvořit až 25% objemu cytoplazmy. Jsou přítomné ve všech tkáních organismu (kromě maturovaných erythrocytů). Mitochondriální enzymy se účastní metabolismu aminokyselin, organických kyselin, mastných kyselin, porfyrinů, purinů a pyrimidinů. Nejdůležitější úloha mitochondrií spočívá v syntéze ATP, kreatinfosfátu, acetyl-CoA a prekurzorů glukoneogeneze k zajištění energetických požadavků živých systémů. Dále mitochondrie mohou ovlivňovat proces stárnutí, průběh buněčné apoptózy nebo se mohou podílet při termogenezi.

Ačkoliv se mitochondrie liší tvarem a velikostí, jejich uspořádání je velmi podobné. Odpovídá strukturám bakterií, které existovaly na planetě v době mitochondriální endosymbiosy do eukaryotické buňky [2]. Jsou tvořeny dvěma membránami, které v mitochondrii vyčleňují čtyři základní subkompartmenty (vnitřní a vnější membránu, mezimembránový prostor a matrix). Vnější a vnitřní membrána je oddělena mezimembránovým prostorem; vnitřní membránou obklopený prostor je označován jako matrix. Významnou složkou vnější mitochondriální membrány jsou poriny (transmembránové proteiny umožňující volný průchod iontům a molekulám do velikosti přibližně 5 kDa). Složení mezimembránového prostoru mitochondrie je proto velmi podobné prostředí cytosolu buňky. Vnitřní mitochondriální membrána je specifická velmi vysokým podílem proteinů (76%) vůči lipidické složce, který je mezi dosud analyzovanými membránami vůbec nejvyšší. Dále je zajímavá tím, že obsahuje fosfolipid kardiolipin (difosfatidylglycerol), který negativně ovlivňuje selektivní permeabilitu membrány pro ionty, zejména protony, čímž pozitivně přispívá k utváření proton-motivní síly. Povrch vnitřní mitochondriální membrány je výrazně zvětšen mnoha záhyby označovanými jako kristy a je přímo úměrný katalytické kapacitě mitochondrií. Mitochondriální matrix je zvláštní zejména tím, že, podobně jako buněčné jádro, obsahuje DNA (mtDNA). Mitochondrie spolu s jadernou DNA tvoří genetickou informaci organismu (viz kapitola 1.2).

Výše zmíněné čtyři hlavní subkompartmenty navrhuje tzv. Paladeho model (Baffle model) [1]. Někteří autoři vyčleňují v mitochondrii ještě další dva

subkompartmenty, membránu krist a interkristální prostor [3]. Členění subkompartmentů mitochondrií do těchto šesti funkčních oddílů odpovídá tzv. „Crista junction modelu“.



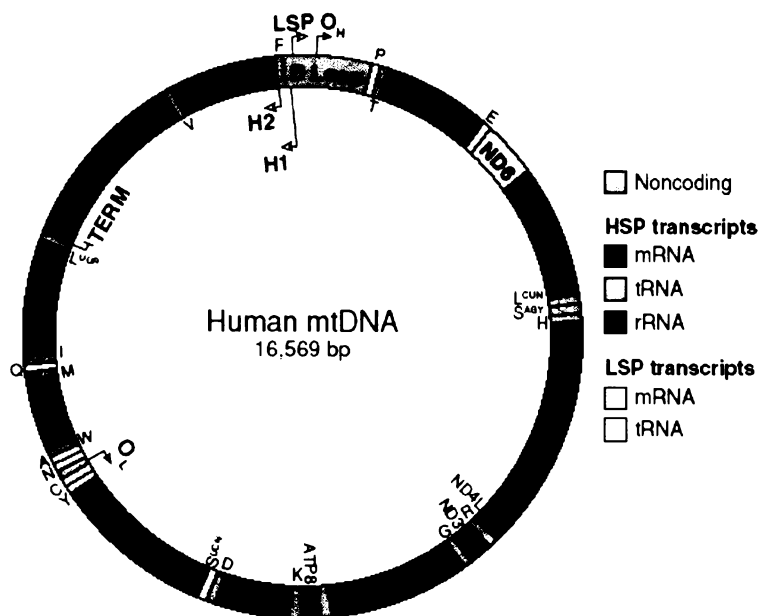
Obr.1.1. Modely mitochondriální membránové struktury. (a) Paladeho (Baffle) model a (b) „Crista junction model“ [1].

Mitochondrie se v buňce vyskytují v morfoloicky odlišných formách od izolovaných sférických částic po vysoce dynamické vodivé sítě (mitochondriální retikulum). Pokud jsou v podobě sítí, tak permanentně fúzí a dělí se, čímž je mitochondriím umožněna vzájemná výměna mitochondriálního obsahu a předávání informací o prostředí v buňce, na které tak mohou reagovat a zároveň ho ovlivňovat [4-8]. Mezi evolučně konzervované GTPázy důležité pro fúzi patří mitofuziny (fúze vnější mitochondriální membrány) [9, 10] a Opa1 (fúze vnitřní mitochondriální membrány) [11]. Pro dělení mitochondrií jsou důležité zejména GTPázy Drp1 a Fis1 [10]. Fúze a elongace mitochondrií je například chráněna před mitofágií (mitochondriální degradace) při ranných fázích hladovění buněk.

Mitofuziny (MFN2) se nacházejí také v membráně endoplazmatického retikula a vzájemnou homo/heterodimerizací s mitofuziny vnější mitochondriální membrány (MFN1, MFN2) fyzicky i funkčně propojují oba kompartmenty. Význam kooperace těchto kompartmentů souvisí zejména s metabolismem Ca^{2+} [12].

1.2. Mitochondriální genom

Savčí mtDNA je cirkulární dvouřetězcová molekula kódující geny pro 13 polypeptidů, 22 tRNA a 2 rRNA [13]. Všechny mtDNA kódované polypeptidy jsou podjednotky enzymů dýchacího řetězce. Ostatní potřebné proteiny jsou kódovány nDNA, překládány v cytoplazmě a do mitochondrií importovány (viz kap. 2.).



Obr. 1.2 Mapa lidské mtDNA. LSP - promotor lehkého vlákna (z ang. light-strand promoter); HSP- promotor těžkého vlákna (z ang. heavy-strand promoter); COI - COIII – geny pro podjednotky I - III cytochrom c oxidasy; Cytb – gen pro cytochrom b; ND1-6 –geny pro podjednotky 1 - 6 NADH dehydrogenasy; A-Y – geny pro mitochondriální tRNA; O_H – replikační počátek H-řetězce (směr syntézy DNA naznačen šipkou); O_L – replikační počátek L-řetězce (směr syntézy DNA naznačen šipkou); H1, H2 – místa iniciace transkripce (směr transkripce naznačen šipkami); TERM – vazebná oblast mitochondriálního transkripčního terminačního faktoru [14].

Celkově lidské buňky obsahují přibližně 1000-10 000 kopií mtDNA, což je stav označovaný z genetického hlediska jako polyplazmie. Mutace mtDNA se pak dělí na homoplasmické, pokud jsou v buňce přítomny pouze mutované kopie mtDNA, a heteroplasmické, pokud mutované kopie mtDNA koexistují s normálními kopiemi [15]. Genetika mtDNA je dále charakteristická maternální dědičností, tedy při pohlavním rozmnožování mitochondrie potomek získává od samice. Samčí mitochondrie jsou zničeny v oocyту krátce po oplodnění, pravděpodobně mechanismem zahrnujícím ubiquitinilaci a následnou proteolysu [16]. Přenos malého množství otcovské mtDNA však nelze vyloučit (alespoň u myši) [17].

2. Mitochondriální import proteinů

Protože mtDNA kóduje pouze několik podjednotek systému OxPhos (viz kap. 1.2), jsou mitochondrie plně závislé na mitochondriálním importu proteinů kódovaných jadernou DNA. Předpokládá se, že většina mitochondriálních jaderně kódovaných proteinů je syntetizovaná v cytosolu na volných ribozomech. Vzniklé prekurzory se v cytosolu nacházejí v komplexu s faktory (zejména chaperony Hsp70 a Hsp90) zodpovědnými za jejich stabilizaci. Mechanismy rozpoznání, navázání a uvolnění prekurzorových proteinů chaperony jsou stále nejasné. Samotný import většinou probíhá posttranslačně, nicméně i kotranslační průběh není vyloučen. Existují dokonce studie nasvědčující, že přímo mRNA pro mitochondriální proteiny je směřována k vnější mitochondriální membráně, kde probíhá její translace na k ní vázaných ribozomech [18].

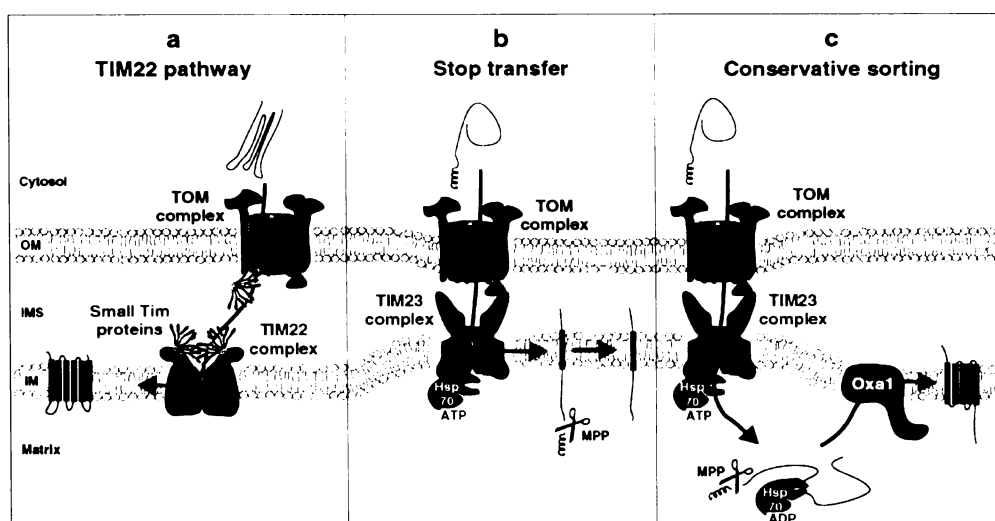
Cytosolické prekurzory mitochondriálních proteinů obsahují informaci potřebnou k jejich nasměrování do mitochondrií. Ve většině případů je tato signální adresující informace zahrnuta v N-koncovém úseku, někdy označovaném také jako pre-sekvence nebo pre-peptid, případně jako matrix adresující sekvence, neboť je zodpovědná za import proteinu nebo pouze jeho N-konce přes vnitřní mitochondriální membránu do matrix. Sekvence je většinou odstraňována matrixovou procesující peptidázou hned, jak dosáhne cílové struktury. Mnoho prekurzorů však N-terminální adresující pre-sekvenci postrádá a obsahují pouze vnitřní adresující signál/y, které nemají konzistentně danou strukturu. Samotný proces translokace membránami je dán kooperací translokáz vnější (TOM komplex) a vnitřní (TIM komplex) membrány.

TOM komplex je zodpovědný za translokaci téměř všech proteinů do mitochondrií. Je schopný zajistit rozpoznání prekurzorových proteinů v cytosolu, usnadňuje uvolnění cytosolických vazebných faktorů (Hsp) a přispívá k rozbalení cytosolických proteinových domén. Receptorové proteiny TOM komplexu jsou Tom20 a s ním kooperující Tom22, které rozpoznávají N-koncové pre-sekvence, nebo Tom70 specifický hlavně pro prekurzory obsahující vnitřní adresující signály. V obou případech jsou preproteiny následně postoupeny hlavnímu importnímu póru TOM komplexu, který je tvořen centrální komponentou (Tom40) a třemi malými asociovanými podjednotkami.

Za translokaci prekurzorů matrixových proteinů, většiny proteinů IMM a mnoha proteinů IMS je zodpovědný translokázový komplex vnitřní membrány TIM23. Translokace proteinu komplexem TIM23 je energeticky řízená membránovým potenciálem na vnitřní membráně a hydrolýzou ATP.

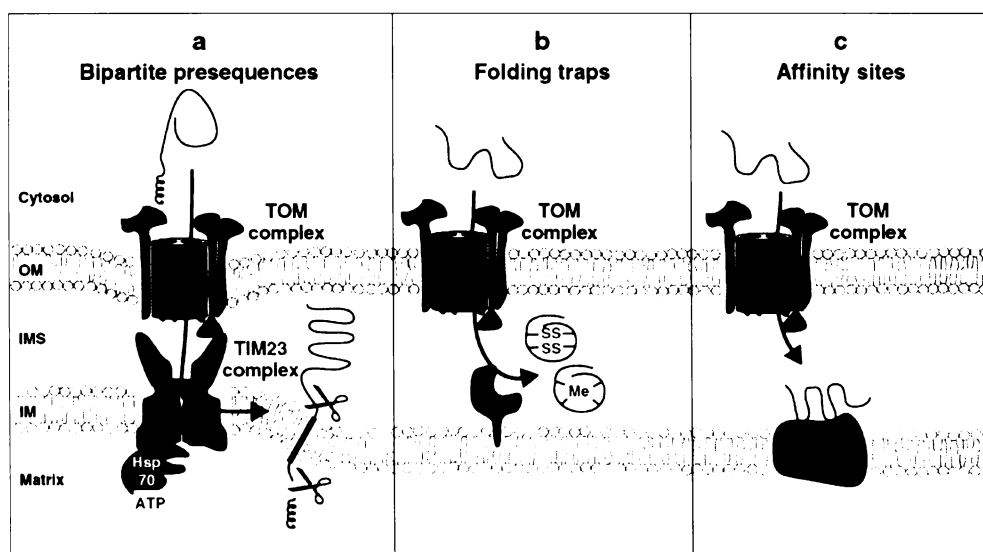
Proteiny importované do vnější mitochondriální membrány tvoří dvě hlavní skupiny. Jde jednak o proteiny zakotvené v membráně přes transmembránový helix v blízkosti N-konce, jejichž import je zajištěn TOM translokázou (nevyužívají specifických receptorů). Druhou skupinu tvoří membránové proteiny β -barelové struktury, jejichž inserce je zajišťována kromě TOM komplexu, kterým jsou translokovány přes vnější membránu do IMS, ještě TOB/SAM komplexem podílejícím se na inserci prekurzoru do OMM a jeho assemblaci (TOB – translocase of outer membrane β -barrel proteins; SAM – sorting and assembly machinery complex).

Import proteinů do IMM je dán třemi hlavními způsoby. První translokuje proteiny s interními hydrofobními signály prostřednictvím specializovaného translokačního komplexu TIM22 (obr. 2.1.a). Druhý způsob, kdy dochází k zastavení translokace komplexem TIM23 a laterální integraci proteinu do vnitřní membrány, je označován jako „stop-transfer“ mechanismus (obr. 2.1.b). Třetí způsob, označovaný také jako „konzervativní třídící dráha“ (název je odvozen od prokaryotních předků mitochondrií, jejichž mechanismus třídění a importu je podobný), je dán translokací preproteinu nejprve do matrix a odtud dále do IMM (obr. 2.1.c). Tohoto děje se v některých případech účastní Oxa1 (asemblační faktor).



Obr. 2.1 Import proteinů do vnitřní mitochondriální membrány. (a) TIM22 translokásová cesta, (b) „stop transfer“ třídící cesta, (c) konzervativní třídící cesta [18].

Import proteinů do intermembránového prostoru je stále do značné míry málo znám. Proteiny buď obsahují N-koncové kanonické sekvence následované hydrofobní sekvencí, jejichž import je zajišťován TOM a TIM23 komplexy (a je tedy závislý na membránovém potenciálu a většinou i ATP). Tyto sekvence jsou nakonec proteolyticky odstraněny, čímž je protein uvolněn do IMS (obr. 2.2.a). U mnoha malých proteinů mezimembránového prostoru je jednosměrnost importu do mezimembránového prostoru dána po translokaci TOM komplexem získáním kofaktoru nebo tvorbou disulfidických můstků a sbalením do nativní struktury, které brání jejich zpětnému pohybu z mitochondrie (obr. 2.2. b). Některé proteiny IMS jsou permanentně asociovány s komponentami IMS. Afinita k těmto komponentám s největší pravděpodobností řídí jejich import (obr. 2.2.c).



Obr. 2.2 Import proteinů do mezimembránového prostoru. (a) Proteiny s N-koncovými kanonickými sekvencemi, (b, c) jednosměrný import malých proteinů [18].

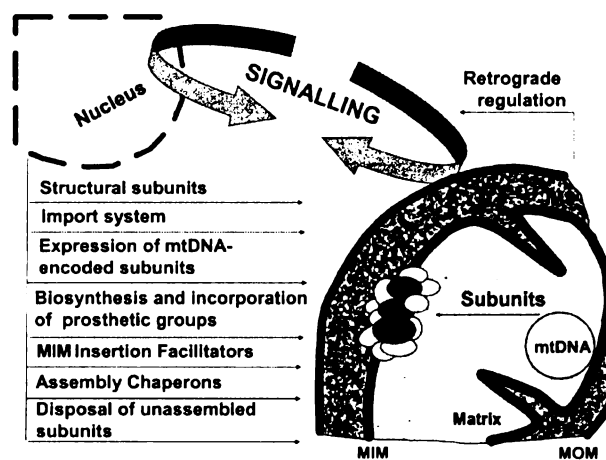
3. Homeostáza mitochondriálních proteinů

Kontrolu kvality a kvantity proteinů v mitochondriích zastávají mitochondriální proteasy, které tak pomáhají udržet pro mitochondrie životně důležitou homeostasu. Významnou skupinou jsou mitochondriální procesující peptidasy, které se podílejí na odštěpení adresující signální sekvence během importu proteinů (viz kap. 2). Mitochondrie musí být dále schopné eliminovat peptidy nadbytečné nebo špatně sbalené nebo peptidy s abnormální konformací, způsobenou

mutací nebo oxidativním poškozením. Poškozené nebo staré organely jsou degradovány lysozomální autofagií (označována také jako mitofagie) [19], která tvoří 25-30% průměrného mitochondriálního katabolismu [20]. Další možností degradace poškozených a již nepotřebných mitochondriálních proteinů, selektivním způsobem uvnitř organely, je intramitochondriální proteolytická dráha. Existují dva základní typy mitochondriálních proteas. První jsou stimulované ATP (Lon proteáza, Clp proteasový komplex, AAA proteasy a mitochondriální proteasy mezimembránového rostoru I), druhé jsou na ATP nezávislé (mitochondriální procesující peptidasy, mitochondriální intermediátová peptidáza a proteáza vnitřní membrány I) [21, 22].

4. Systém oxidativní fosforylace

Hlavními složkami systému OxPhos jsou komplexy dýchacího řetězce a ATP syntáza, jejichž funkčním propojením dochází k produkci většiny energie (ATP) aerobních organismů. Systém se nachází ve stěněch aerobních bakterií a ve vnitřní mitochondriální membráně většiny eukaryotických buněk. V druhém případě je proces specifického utváření systému OxPhos složitý a vysoce regulovaný proces, který vyžaduje spleť komunikaci jádra a mitochondrií zahrnující mimo jiné i koordinaci exprese mitochondriálního genomu s jaderným (obr. 4.1.).



Obr. 4.1 Schéma interakce a koordinace dvou genomů (*nDNA* a *mtDNA*) v procesu biogeneze systému oxidativní fosforylace. *IMS* -mezimembránový prostor; *MIM* - mitochondriální vnitřní membrána a *MOM* - vnější mitochondriální membrána [23].

4.1. Proton-motivní síla na vnitřní mitochondriální membráně

Proton-motivní síla IMM je dána součtem složky elektrické, která vyplývá z napět'ového gradientu a chemické, která je dána rozdílem pH. Je vlastním zdrojem Gibbsovy energie a je důležitá pro všechny mitochondriální děje (závisí na ní např. produkce ATP nebo vůbec import proteinů do mitochondrií). Její velikost závisí na propustnosti membrány pro další ionty kromě H^+ . Významný napět'ový gradient může vzniknout pouze pokud je IMM málo propustná pro další kationty a anionty. Oproti tomu významný gradient pH vznikne pouze, pokud je membrána propustná pro hlavní anionty např. Cl^- nebo pokud je proton vyměněný za jiný kation např. K^+ . Tato druhá možnost nevede k napět'ovému gradientu přes membránu, protože se rovnají koncentrace kladných a záporných iontů na obou stranách membrány.

Pokud je rozdíl $\Delta pH = 1$, tak je z definice pH zřejmé, že je rozdíl v množství H^+ desetinásobný a při $T=293K$ odpovídá elektrickému potenciálu 59 mV. Poté lze definovat proton-motivní sílu pmf :

$$pmf = \psi - \left(\frac{RT}{F} \right) \cdot \Delta pH = \psi - 59 \cdot \Delta pH$$

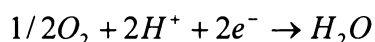
kde $\psi [mV]$ je transmembránový elektrický potenciál, R je plynová molární konstanta, $T [K]$ je teplota, F je Faradayova konstanta. Respirující mitochondrie má elektrický potenciál na vnitřní mitochondriální membráně přibližně 160 mV (s negativním nábojem ze strany matrix) a $\Delta pH \approx 1,0$ (ekvivalentní $\approx 60mV$). Celková proton-motivní síla je tedy 220 mV, tvořená ze 73% transmembránovým potenciálem [24, 25].

4.2. Dýchací řetězec

Dýchací řetězec je tvořen čtyřmi multipodjednotkovými enzymovými komplexy, které se nacházejí ve vnitřní mitochondriální membráně. Představuje oxidoredukční kaskádu vektorového toku elektronů, která je řízená afinitou daných redoxních center k elektronům. Při postupném zvyšování redoxního potenciálu se uvolňuje energie, která je využita komplexy I, III a IV pro přenos protonů proti

koncentračnímu gradientu z matrix do intermembránového prostoru. Komplexy dýchacího řetězce tak přispívají k utváření protonového gradientu na IMM a z něj vyplývající proton-motivní síly (viz kap. 4.1). Pokud by elektrony ztratily svou energii najednou, mimo tuto kaskádu, nestihla by ji buňka zachytit a většina energie by se přeměnila na teplo.

Elektrony vstupují do dýchacího řetězce z NADH na komplex I (NADH:ubichinon oxidoreduktháza), nebo z FADH na komplex II (sukcinát dehydrogenáza) a odtud se dále dostávají přes koenzym Q (ubichinon) na komplex III (ubichinol:cytochrom *c* oxidoreduktáza). Další tok elektronů z komplexu III je zajištěn prostřednictvím periferního elektronového přenašeče, cytochromu *c*, na terminální enzym dýchacího řetězce, komplex IV (cytochrom *c* oxidáza), který elektrony využívá k redukci molekulárního kyslíku za vzniku vody podle následující rovnice:



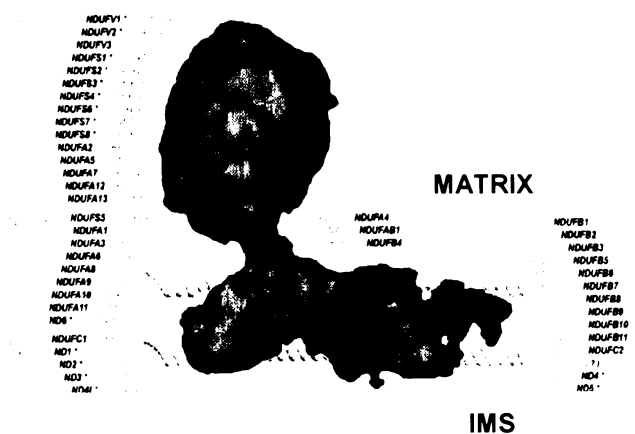
4.2.1 Komplex I

Komplex I (EC.1.6.5.3) neboli NADH:ubichinon oxidoreduktáza je největší a nejvíce komplikovaný enzym dýchacího řetězce čítající okolo 1 MDa. Spolu s komplexem II tvoří vstupy pro vodíky z redukčních činidel NAD a FAD. Celý komplex I se skládá ze 7 podjednotek kódovaných mtDNA a z přibližně 40 podjednotek kódovaných nDNA. Dále obsahuje redoxní kofaktory FMN, chinony a FeS klastry. Struktura komplexu I má tvar písmene L, kde jedno z ramen, hydrofobního charakteru, je transmembránové a druhé periferní rameno, hydrofilního charakteru, vyčnívá do matrix [26]. Přenos dvou elektronů z NADH na elektronový akceptor koenzym Q je iniciován periferní částí. Tento děj je spřažen s přenosem 4 protonů nebo Na^+ přes vnitřní mitochondriální membránu z matrix (negativní náboj) do mezimembránového prostoru (pozitivní náboj) podle rovnice:



Současně jsou 2 elektrony přemístěny z NADH na FMN (primární elektronový akceptor komplexu I). Z něj jsou elektrony přesunuty přes redoxní centrum na ubichinon. Redoxní centrum se skládá z 8 Fe-S klastrů – dvou binukleárních a šesti tetranukleárních. Bakteriální komplex I má odlišné značení a je složen z 9-ti tetranukleárních klastrů. Membránová část poté provádí redukci koenzymu Q a transport iontů.

Existují dva modely mechanismu pumpování protonů. První model předpokládá přímé, redoxně řízené spřažení, následované tzv. Q-cyklem mechanismem, což znamená, že vazebné místo pro ubichinon a pro protonovou translokaci jsou v těsném kontaktu s redoxním centrem v periferním rameni a tudíž dovolují přesnou interakci. Druhý model předpokládá nepřímé, konformačně řízené spřažení, takže centrum je na periferním rameni spřaženo s proton přenášející komponentou lokalizovanou na konci membránového ramene a pracuje na principu konformačních změn na velké vzdálenosti [27]. Další velmi diskutovanou možností je kombinace obou modelů. V tomto případě by hydrogenáza působila jako redoxně řízená a transport fungoval jako konformačně řízená protonová pumpa. Poté by existovala dvě energeticky spřažená místa [28]. Přesný mechanismus je stále předmětem bádání.

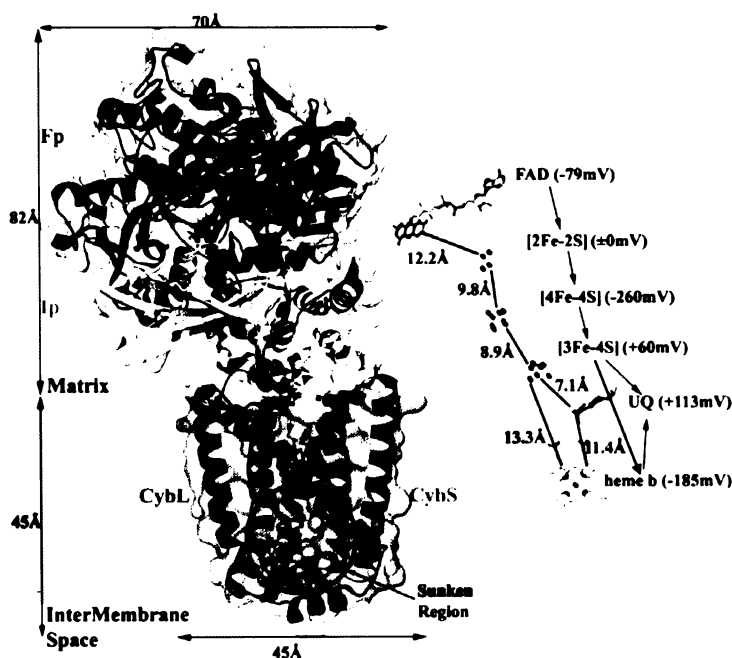


Obr. 4.2 *Struktura savčího komplexu I dýchacího řetězce. Nomenklatura po stranách je označená tmavě modře pro lidské a světle modře pro hovězí podjednotky [29].*

4.2.2. Komplex II

Sukcinát:ubichinon oxidoreduktáza (EC 1.3.5.1) nazývaná také sukcinátdehydrogenáza o molekulové hmotnosti 127 kDa se skládá ze 4 podjednotek a je zodpovědná za propojení Krebsova (citrátového) cyklu s dýchacím řetězcem. Oxidací sukcinátu na fumarát jsou uvolněné elektrony přeneseny přes FAD a FeS proteiny na ubichinon, který je redukován na ubichinol. Jako jediný z enzymů dýchacího řetězce není schopen pumpovat protony přes vnitřní mitochondriální membránu a nepřispívá tak ke vzniku membránového potenciálu. Komplex II je tvořen dvěma hydrofilními proteiny (flavoprotein – Fp a Fe-S vazebný protein – Ip) a dvěma transmembránovými proteiny (CybL a CybS). Elektrony jsou přenášeny ze sukcinátu na ubichinon přes prostetické skupiny FAD; klastry [2Fe-2S], [4Fe-4S] a [3Fe-4S] a hem, který tvoří integrální část komplexu [30]. Oproti zbývajícím komplexům systému oxidativní fosforylace má všechny podjednotky kódované nDNA.

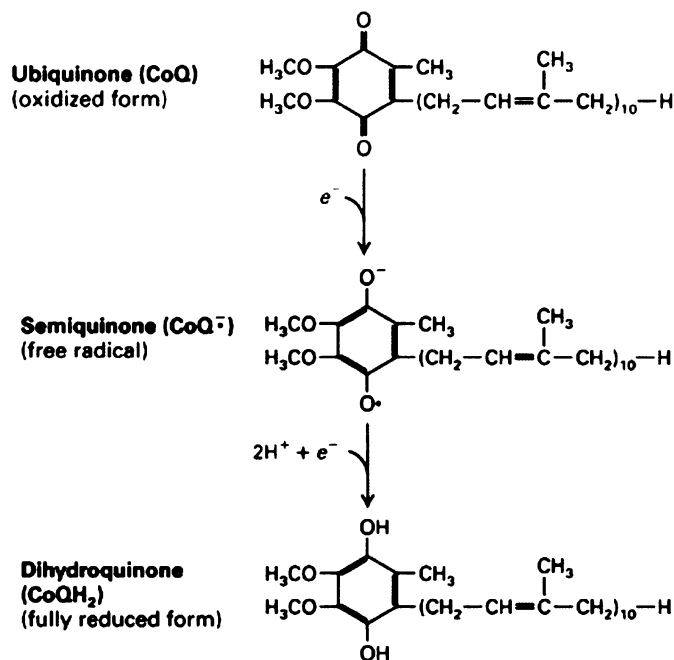
Regulace aktivity komplexu II je pravděpodobně dána buněčnou signalizací, což bylo nedávno nepřímo dokázáno v rostlinných a živočišných mitochondriích, kde byly nalezeny v komplexu II podjednotky schopné fosforylace [31, 32].



Obr. 4.3 Struktura komplexu II (vepřové srdce). Protein Fp označen tmavě modře, Ip krémově, CybL růžově, CybS žlutě. Šedý pruh naznačuje předpokládanou transmembránovou oblast. Schéma přenosu elektronu přes komplex II zakreslen vpravo [30].

4.2.3. Koenzym Q

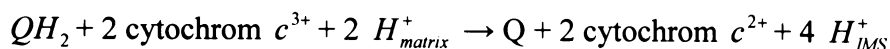
Systematický název je 2,3-dimethoxy-5-methyl-6-polyprenyl-1,4-benzochinon, kdy polyprenylový řetězec je tvořen 6-10 jednotkami; lidský koenzym Q obsahuje deset jednotek [33] a je proto označován také jako Q_{10} . Z redoxního hlediska se může nacházet ve třech základních stavech, buď jako plně oxidovaný ubichinon, nebo částečně redukovaný semichinon či plně redukovaný ubichinol, což rozšiřuje jeho redoxní možnosti [34] a fyzikální vlastnosti (může být přítomen jako agregát, rozpuštěn v lipidové membránové dvojvrstvě nebo vázat proteiny) [35, 36]. Koenzym Q je mobilní přenašeč vodíkových atomů (protonů a elektronů), který je redukován komplexem I nebo II a následně se oxiduje redukcí komplexu III [37].



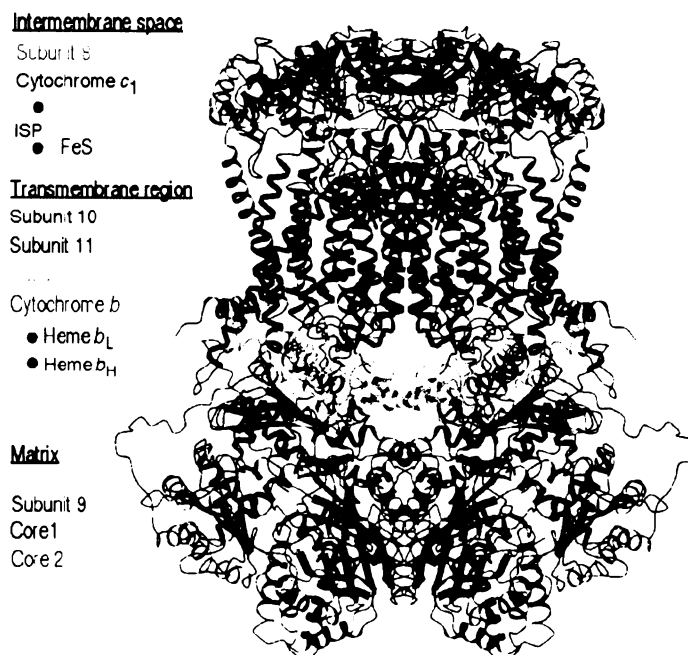
Obr. 4.4 Jednotlivé redoxní formy koenzymu Q [25].

4.2.4. Komplex III

Ubichinol:cytochrom *c* oxidoreduktáza nebo také komplex bc_1 (EC: 1.10.2.2) a katalyzuje přenos elektronů z ubichinolu na cytochrom *c* mechanismem Q-cyklu a současně působí jako protonová pumpa. Přenáší protony přes vnitřní mitochondriální membránu z negativní strany na pozitivní podle rovnice:



Savčí holoenzym obsahuje 11 podjednotek (obr. 4.4.) z nichž jedna (cytochrom *b*) je kódována mtDNA [38]. Funkční enzym představuje dimer o hmotnosti 480 kDa.



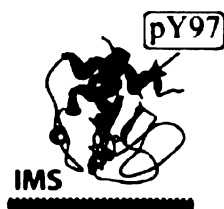
Obr. 4.5 Dimerní struktura komplexu III (hovězí srdce). Podjednotky (vypsány po levé straně) utvářející část v mezimembránovém prostoru (nahore), transmembránovou část (střed) a v matrix (dole) [38].

4.2.5. Cytochrom *c*

Cytochrom *c* je přenašeč elektronů mezi komplexem III a IV. Savčí cytochrom *c* je tvořen z ~100 aminokyselinových zbytků s kovalentně vázanou hemovou skupinou. Hemové železo je vázané histidylovým a methionylovým zbytkem. Cytosolická forma cytochromu *c*, apocytochrom *c*, má shodnou sekvenci aminokyselin jako enzym v aktivní formě, avšak postrádá kovalentní vazby v hemové skupině. Apocytochrom *c* volně prochází vnější mitochondriální membránou do intermembránového prostoru pravděpodobně pomocí P70 (malý,

porinu podobný protein), kde je hemovou lyasou cytochromu *c* přidána hemová skupina, která způsobí konformační změny, díky kterým již nemůže procházet zpět.

Zásadní úlohu má cytochrom *c* také v apoptoze [39].

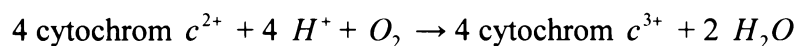


MATRIX

Obr. 4.6 *Struktura cytochromu c (koňské srdce). Pozice aminokyselinového zbytku který je pravděpodobně fosforylován znázorněna žlutým rámečkem [31].*

4.2.6. Komplex IV

Komplex IV, neboli cytochrom *c* oxidáza nebo cytochrom *c*: oxygen oxidoreduktáza (EC 1.9.3.1) je terminální enzym dýchacího řetězce mitochondrií a mnoha bakterií, který se podílí na redukci více než 95% molekulárního kyslíku přijatého aerobně rostoucími vyššími organismy na vodu. Uvolněná energie reakce je opět využita k pumpování protonů proti koncentračnímu gradientu přes IMM. Reakce probíhá podle rovnice:



Savčí holoenzym se skládá z 13 různých podjednotek, z nichž tři největší jsou kódované mtDNA (viz kap. 5).

4.3. ATP syntáza a oxidativní fosforylace

4.3.1. ATP syntáza

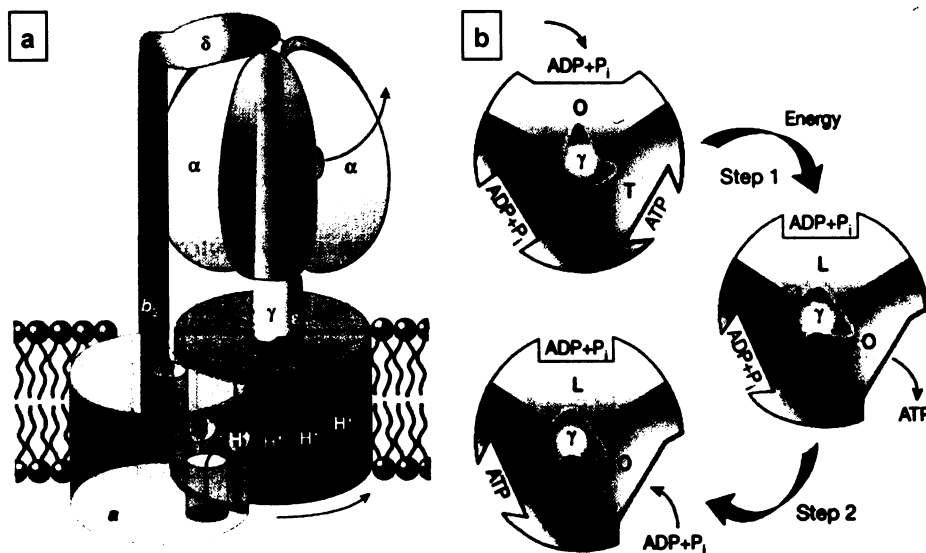
ATP syntáza, nebo také ATPáza (EC 3.6.3.14) je enzym o molekulové hmotnosti přibližně 600 kDa zodpovědný za tvorbu ATP, pro kterou využívá membránový gradient; je však schopný i hydrolýzy ATP, čímž přispívá ke vzniku membránového potenciálu. Struktura komplexu ATP synthasy je navzdory své komplexnosti evolučně konzervovaná. Celkem se skládá ze 16 podjednotek. V principu jde o nanomotor skládající se ze dvou částí: F_1 části, která je v matrix a obsahuje katalytická vazebná místa $ATP/ADP/P_i$ a F_o části, která je zapuštěna ve vnitřní mitochondriální membráně a její funkcí je řídit zpětný tok protonů přes periferní a rotační centrální stopku k synthese ATP. Část F_1 se skládá z pěti podjednotek ve stechiometrickém poměru $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$ a jádro F_o obsahuje podjednotky ab_2c_{10-14} . Byla zkoumána krystalová struktura domén F_1 (savci) a F_o (bakterie). Podjednotky α (510 aminokyselin) a β (482 aminokyselin) tvoří globulární část a podjednotky γ , δ a ε tvoří spojnicí obou základních částí neboli centrální stopku a část F_o je tvořena jednopodjednotkovým rotorem (obr. 4.7. a, c-podjednotka), vícepodjednotkovým statorom a postranní stopkou. Postranní stopka se skládá z částí b, d, F6 (spřahovací faktor) a OSCP (z ang. oligomycin sensitive conferring protein). U savčího (hovězího) enzymu byla potvrzena přítomnost dalších proteinů např. MLG a AGP (podle jejich prvních sekvencí aminokyselin) [40]. Dvě podjednotky jsou kódované mtDNA, obě se nacházejí v F_o části.

4.3.2. Produkce ATP (oxidativní fosforylace)

Produkce ATP je děj spřažený s translokací protonů přes IMM. Podle studií pomocí vazby aktinových filamentů na γ podjednotku ATP synthasy bylo zjištěno, že během jednoho pootočení (120°) motoru F_1 vůči statoru F_o vzniká točivá síla o hodnotě $40\text{ pN} \cdot \text{nm}^{-1}$, což dává motoru F_1 téměř 100% účinnost [41]. Takto vysoké účinnosti je dosaženo rozdělením děje na několik menších kroků podobně jako přenos elektronů v dýchacím řetězci. Protony z intermembránového prostoru

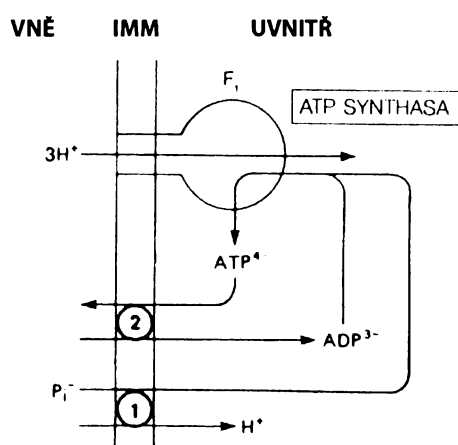
procházejí částí F_o po směru koncentračního gradientu a tím uvádějí do chodu rotor (c-podjednotka) vůči statoru. To je dáno hydrofilním charakterem zbytků aminokyselin v transmembránové části podjednotky F_o sektoru jinak hydrofobního charakteru. Po protonaci dochází na podjednotce F_o ke kaskádě vazeb, které následně způsobí pootočení c-podjednotky. Protonovaná isoforma F_o je stabilizována vodíkovými můstky. Následnými reakcemi mezi podjednotkami dochází k dalšímu pootočení, což ústí k deprotonaci. Tři katalytická místa F_1 na rozhraní podjednotek α a β se nacházejí v daném čase ve třech různých stavech: T (z ang. tight), O (z ang. open) a L (z ang. loose) (obr. 4.7. b). Princip syntézy ATP byl navržen Boyerem a zahrnuje 3 kroky:

- 1) vazba ADP a P_i k L-místu
- 2) konformační změna L-místa na T-místo. Na jedné z podjednotek T-místa pravděpodobně dochází k exergonické translokaci protonů a syntéze ATP. K syntéze jedné molekuly ATP je třeba translokace tří protonů po směru elektrochemického gradientu.
- 3) Následně se T-místo obsahující ATP přemění na O-místo, odkud ATP disociuje.



Obr. 4.7 Struktura ATP synthasy (a); šipky naznačují průchod protonů enzymem za vzniku ATP. Schéma syntézy ATP v ATP systému (b) – každá z modře nebo zeleně značených oblastí znázorňuje dvojici α - a β -podjednotek na jejichž rozhraní (hlavně však na β -podjednotce) se nacházejí katalytická místa; rotací γ -podjednotky o 120° dochází ke konformačním změnám v okolí všech tří katalytických míst (O, L a T), které mění jejich afinity k substrátům a produktům (Step1). ATP vzniká spontánně z pevně navázaného ADP a anorganického fosfátu (P_i)(Step2) [42].

Aby buňka mohla obnovovat ATP spotřebované mimo mitochondrie a využít při tom oxidativní fosforylaci, musí do mitochondriální matrix být schopna z cytosolu dopravit produkty cytosolické hydrolyzy ATP (ADP a P_i ; substráty ATP syntasy) a zároveň je nutné poskytnout vyprodukované ATP opět i mimo mitochondrii. Tato výměna je dána součinností fosfátového transportéru s transportérem adeninových nukleotidů (ATP/ADP antiport) (obr. 4.8). Kompletní transakce je provedena opět na úkor elektrochemického gradientu (investicí jednoho protonu), který je sumárně na jedno vyprodukované a vytransportované ATP menší o 4 protony.

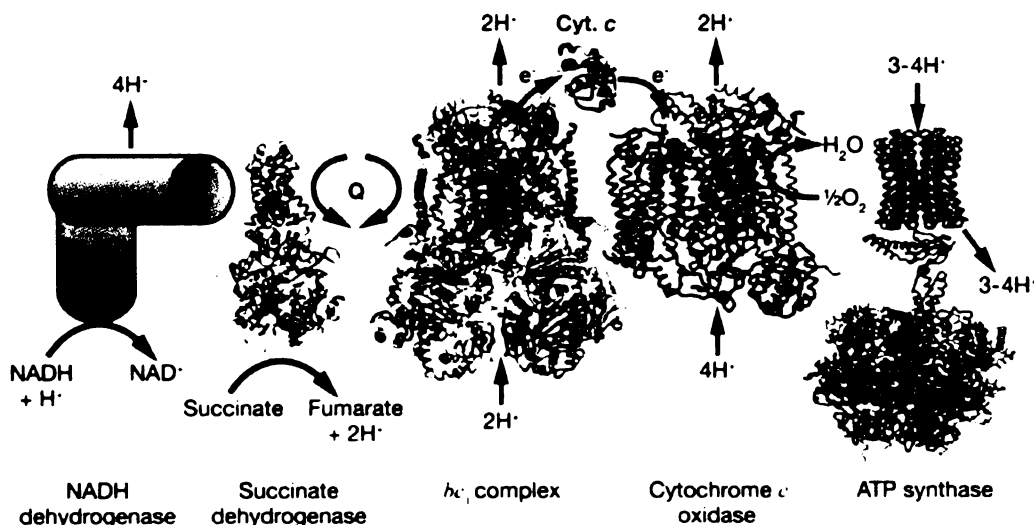


Obr. 4.8 Součinnost fosfátového transportéru (1) s transportérem adeninových nukleotidů (2) při synthese a exportu ATP [43].

Celková protonová (a nábojová) translokační stechiometrie pro transfer $2e^-$ z ubichinolu na kyslík je $6/2e^-$. Pokud elektrony pochází z NADH, tudíž prochází komplexem I, který se podílí na translokaci čtyř protonů membránou na transfer dvou elektronů, celková protonová a nábojová stechiometrie je $10/2e^-$. Pokud intaktní mitochondrie požaduje na produkci a export jednoho ATP čtyři protony (viz výše), měl by být P/O poměr pro oxidaci NADH $10/4 (=2,5)$ a pro sukcinát $6/4 (=1,5)$. Jinými slovy, komplex I a III každý přispívají k produkci jedné molekuly ATP a komplex IV k produkci půl molekuly ATP. Oxidací jedné molekuly glukosy na oxid uhličitý a vodu lze tedy získat 36 molekul ATP (2 ATP z glykolýzy a 34 ATP oxidativní fosforylací).

4.4. Uspořádání systému oxidativní fosforylace

Dlouhou dobu převládal názor, že jednotlivé enzymové komplexy jsou nahodile uspořádány ve vnitřní mitochondriální membráně a přenos elektronů je dán na základě pravidel náhody a pravděpodobnosti kolizí malých propojujících molekul (koenzym Q a cytochrom c). Tomuto modelu se říká Random Liquid (Fluid)-State (obr. 4.9) [44]. Laterální difúzní koeficienty pro komplexy mitochondriální membrány jsou funkcí vzdálenosti difuze a jsou v rozsahu od 10^{-9} po $10^{-10} \text{ cm}^2 / \text{s}$. Mobilní nosič CoQ má difúzní koeficient přibližně $10^{-6} \text{ cm}^2 / \text{s}$, což by poté znamenalo, že tento děj by byl rychlost limitujícím dějem celého procesu [45]. Teorii volně pohyblivých částic podporují také studie rotační pohyblivosti, které ukazují, že rotace komplexu IV v čase je stejná ať je přítomen komplex III a cytochrom c nebo nikoliv [46].



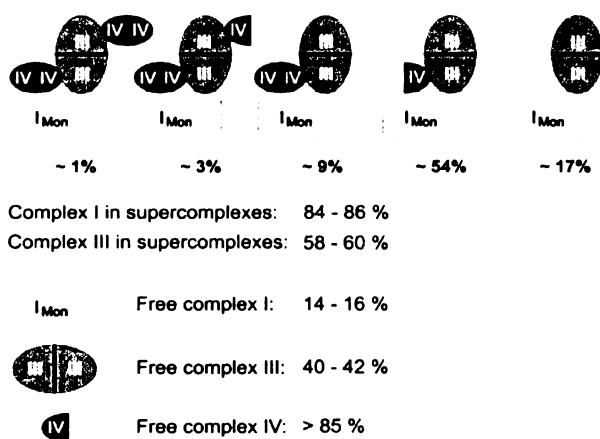
Obr.4.9 Schéma difusního modelu uspořádání systému oxidativní fosforylace (Random Liquid (Fluid)-State) [47].

Již během výzkumu na prvním typu modelu se začaly postupně shromažďovat poznatky, které ukazovaly na možnost tvorby superkomplexových struktur některých komplexů mezi sebou, což dalo základ druhému modelu uspořádání systému OxPhos, který je označován jako „Solid-State“. Prvním strukturně analyzovaným superkomplexem byl $I + III_2$ z *Arabidopsis thaliana* [48]. Asemblace superkomplexů je dočasně zastavena do okamžiku asemblace jednotlivých komplexů [49] a je charakteristická druhovou specifitou. Superkomplexy izolované z *Paracoccus denitrificans* [50] a *Sulfolobus* [51] byly

právě typické pro tyto bakterie. Kvasinky jsou typické tím, že holoenzym komplexu IV se nachází asociovaný s komplexem III; volná forma je velmi minoritní [52]. Analýza superkomplexů z mitochondrií hovězího srdce (obr. 4.10) a později i dalších savčích systémů prokázala naopak, že >85% komplexu IV se nachází ve volné formě. Dále se ukázalo, že téměř veškerý komplex I je asociován s komplexem III [53]. Pro tato pozorování dokonce existují i patologické konsekvence, např. že absence komplexu III podmiňuje deficienci komplexu I [54].

Mezi funkční výhody superkomplexů se počítá efektivnější postupování katalytických intermediátů specifickým enzymům eliminující kompetici s jinými enzymy a vylepšení katalýzy redukcí difuzní doby intermediátu (koenzym Q nebo cytochrom c). Asociace komplexů I a III může být užitečná také jako prevence interakce mezi reaktivním meziproductem ubisemichinonu s kyslíkem a vzniku superoxidového aniontového radikálu [55].

Existují studie zásadně upravující koncepci fluidního modelu [49] nebo připouštějící existenci volně se pohybujících komplexů v rovnováze se superkomplexy [56].



Obr. 4.10 Rozložení jednotlivých komplexů dýchacího řetězce a superkomplexů v mitochondriích z hovězího srdce [53].

4.5. Regulace systému oxidativní fosforylace

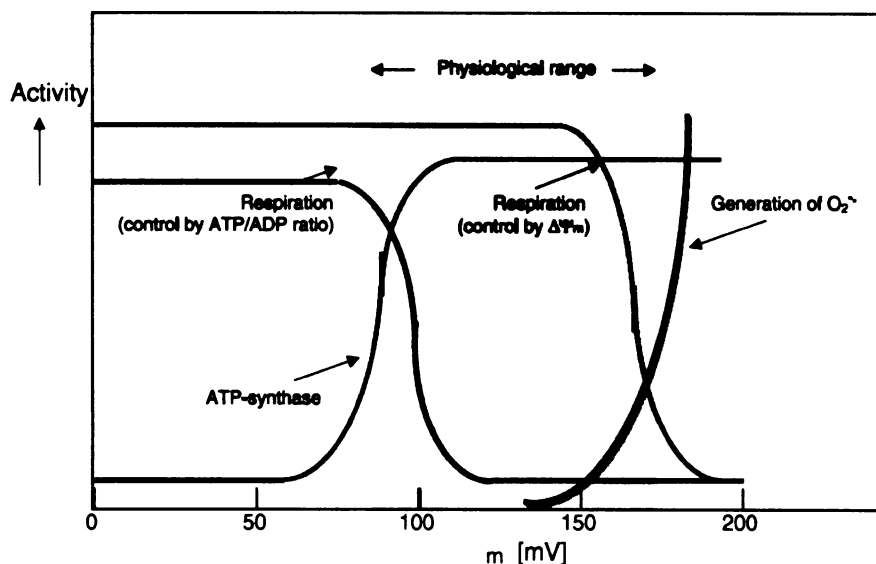
Systém OxPhos je regulován účinností systému (dána dodáváním redukčních ekvivalentů do mitochondrií), na úrovni syntesy ATP zpětnovazebným

mechanismem respirační kontroly a membránovým potenciálem (obr. 4.11). Redukční ekvivalenty importují do mitochondrií malát-aspartátový člunek (z ang. shuttle) a glycerol-fosfátový člunek. Glycerol-fosfátový člunek vynechává komplex I, čímž snižuje poměr P/O (tudíž účinnost), ale zvyšuje rychlost respirace a podporuje termogenezi.

Respirační kontrola zahrnuje dva hlavní mechanismy. První mechanismus respirační kontroly vysvětluje chemiosmotická teorie. Je dána stimulací aktivity ATP synthasy vstupem ADP do mitochondrií, což je doprovázeno produkcí ATP a poklesem gradientu protonů, což v důsledku stimuluje aktivitu pump dýchacího řetězce a tudíž mitochondriální respiraci [24]. Protonové pumpy dýchacího řetězce jsou inhibovány vysokým mitochondriálním membránovým potenciálem (150-200mV). Druhý mechanismus respirační kontroly je založen na allosterické inhibici komplexu IV zprostředkované ATP při vysokém intramitochondriálním poměru ATP/ADP. Jaderně kódované podjednotky komplexu IV obsahují sedm vysoce afinitních vazebných míst pro ATP nebo ADP a další tři místa pouze pro ADP. Druhý mechanismus respirační kontroly, jak se předpokládá, udržuje membránový potenciál na nízkých hodnotách blízkých optimu pro syntézu ATP (100-140 mV) [57]. Biologické membrány jsou více či méně nepropustné pro protony, ale pokud hodnota mitochondriálního membránového potenciálu stoupne nad 140 mV, permeabilita membrány pro protony začne exponenciálně růst [58]. Pokud jsou hodnoty membránového potenciálu větší než 140 mV, v mitochondriích jsou produkovány kyslíkové radikály. Obecně se předpokládá, že superoxidový radikálový anion vzniká přenosem nespárovaného radikálu ubisemichinonu z komplexu I nebo III na molekulární kyslík.

U NADH dehydrogenasy a CcO byl pozorován další typ regulace OxPhos prostřednictvím reverzibilní fosforylace, velmi často cAMP-dependenční [59, 60].

Thyroidní hormony představují hlavní regulační prvek bazálního metabolismu savců, což zahrnuje také OxPhos. Existují 2 způsoby jimi zprostředkované regulace. Při cestě T3 se váže 3,5,5'-trijodo-L-thyronin na receptory pro thyroidní hormony a stimuluje nebo inhibuje expresi specifických genů. Tato cesta trvá 1-3 dny a zvyšuje katabolické a snižuje anabolické enzymy. Cesta T2 je založena na přímé reakci 3,5-dijodo-L-thyroninu s enzymy a výsledkem je okamžité zvýšení bazálního metabolismu. T2 vzniká vnitrobuněčně z T3 dejodací [61].

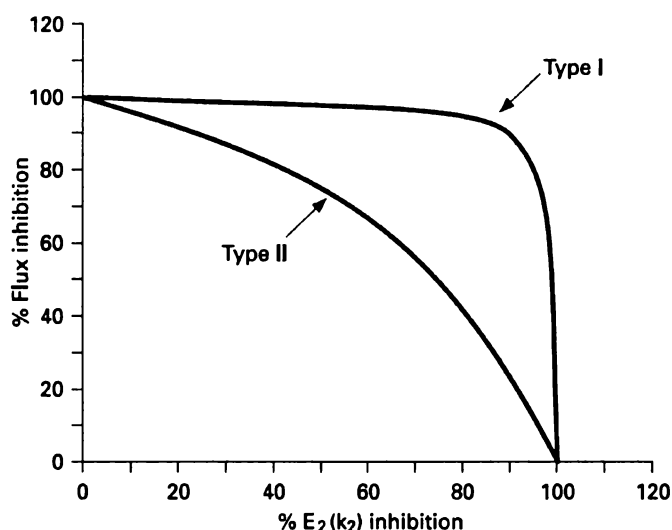


Obr. 4.11 Provázanost dějů regulujících aktivitu systému oxidativní fosforylace. Inhibice respirace při vysokém membránovém potenciálu prvním mechanismem respirační kontroly (červená křivka), inhibice respirace při vysokém ATP/ADP poměru allosterickou inhibicí cytochrom c oxidasy ATP (druhý mechanismus respirační kontroly, zelená křivka), závislost aktivity ATP synthasy na membránovém potenciálu (modrá křivka) a závislost mitochondriálního membránového potenciálu na produkci reaktivních forem kyslíku (fialová křivka) – podrobnosti viz text [61].

4.6. Prahový efekt a tkáňová specifita systému oxidativní fosforylace

Prahový efekt (z ang. threshold effect) systému OxPhos je dán schopností enzymu udržet normální respiraci (tok elektronů) i při velmi výrazném snížení jeho specifické aktivity, ovšem od určité hranice další, již velmi minimální pokles jeho specifické aktivity má za následek zhroucení celého toku elektronů. Prahový efekt lze stanovit z prahové křivky (z ang. threshold curve), která s využitím inhibitoru specifického pro daný enzym systému OxPhos sleduje respiraci v závislosti na titrační inhibiční křivce specifického enzymu [62] (obr. 4.12). Z hlediska prahového efektu lze získat dva hlavní typy prahových křivek. Křivka typu I je charakteristická „plato“ fází následovanou prudkým zlomem, který je prahovou hodnotou. Ta je v případě křivky typu I velmi zřetelně a přesně determinovatelná. Prahová křivka typu II je velmi mírná s téměř nezřetelným zlomem; hodnotu prahového efektu proto z této křivky lze velmi těžko stanovit. Sledováním prahových křivek různých tkání potkana (kosterní sval, srdce, mozek, játra, ledviny) se ukázalo, že prahová křivka typu I je specifická pro komplex I a komplex III, bez ohledu na typ tkáně. Komplex IV je typický tkáňovou specifikou prahových křivek, kdy křivka typu I byla

pozorována v játrech, mozku a ledvinách, kdežto typ II v kosterním svalu a srdci. Zbývající kroky oxidativní fosforylace jsou typické prahovou křivkou typu II vyjma pyruvátového přenašeče v ledvinách a translokátoru adeninových nukleotidů v játrech [63].



Obr. 4.12 *Respirace v závislosti na inhibici specifické aktivity enzymu – prahové křivky [62].*

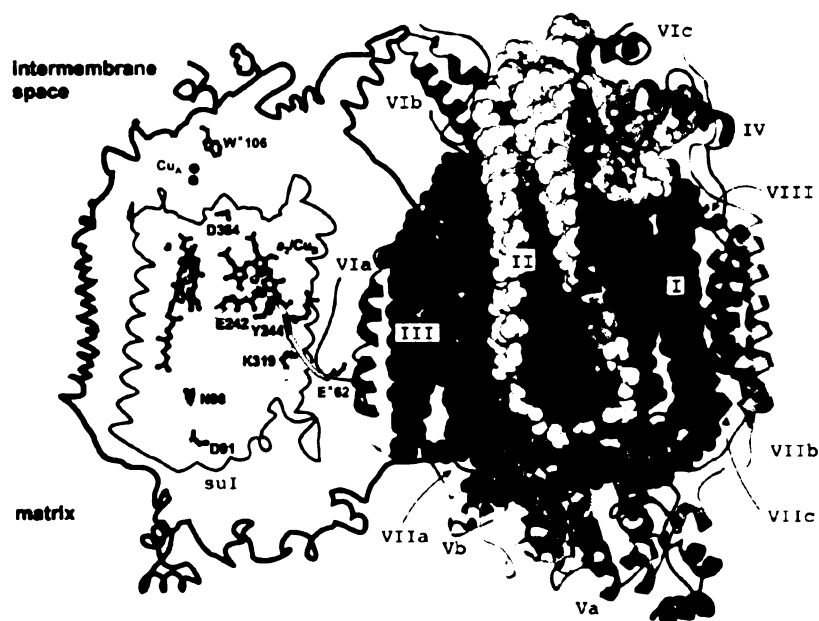
Sledováním specifické inhibiční titrační křivky (reziduální aktivity konkrétního enzymu) a celkové respirace mitochondrií po přidání specifického inhibitoru lze stanovit také koeficient respirační kontroly [64]. Na základě měření koeficientu respirační kontroly v různých tkáních potkana se ukázalo, že kosterní sval a srdce, jsou kontrolovány hlavně na úrovni dýchacího řetězce, kdežto játra, ledviny a mozek jsou kontrolovány hlavně na fosforylační úrovni přes ATP syntasou a fosfátový přenašeč.

Je tedy zřejmé, že mitochondrie jsou tkáňově specifické buněčné organely s odlišnou konstitucí systému OxPhos.

5. Cytochrom *c* oxidáza (katalýza a biogeneze)

5.1. Struktura savčí CcO

Savčí cytochrom *c* oxidáza (CcO) se skládá celkem z 13 podjednotek [65], které se v holoenzymu nacházejí v ekvimolárním množství [66] (obr. 5.1). Holoenzym tak čítá kolem 205 kDa. Cox1 a Cox2 podjednotky tvoří katalytické centrum a spolu s podjednotkou Cox3 představují strukturální jádro enzymu. Struktura těchto tří největších podjednotek je evolučně konzervovaná a všechny jsou kódovány mtDNA. Zbývajících deset strukturálních podjednotek, kódovaných jadernými geny, jsou malé, evolučně mladší peptidy důležité pro stabilitu a/nebo assemblaci CcO. Nacházejí se na povrchu strukturálního jádra tvořeného mtDNA kódovanými podjednotkami. Většina strukturálních podjednotek CcO je tvořena jednou nebo více transmembránovými doménami vyjma podjednotek Cox5a a Cox5b lokalizovaných na matrixové straně a Cox6b, která se váže ke komplexu ze strany IMS. U celé řady strukturálních podjednotek byla popsána vazebná místa pro adeninový nukleotid a/nebo fosforylační místa [60], která umožňují modulovat aktivitu CcO v rámci buněčných potřeb (viz druhý mechanismus respirační kontroly, kap. 4.5). Pro podjednotky Cox4, Cox6a, Cox6b, Cox7a a Cox8 byly popsány u savců tkáňově specifické isoformy [67, 68].



Obr. 5.1 Schéma cytochrom *c* oxidasy znázorněné jako dimer. Nalevo jsou nakreslena katalytická místa enzymu a vpravo části obrázku proteinová struktura [69].

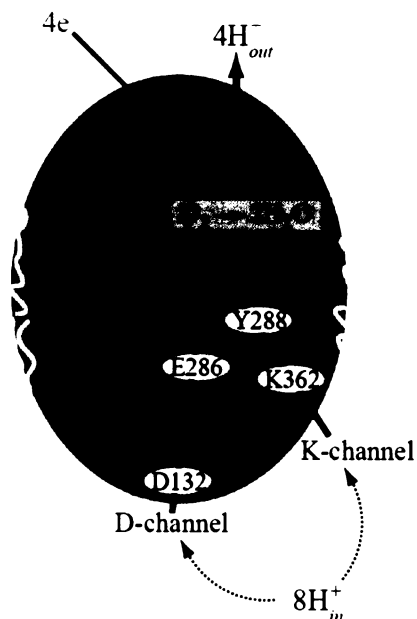
Kromě strukturních podjednotek obsahuje CcO pro katalýzu nezbytné kofaktory z nichž nejvýznamnější jsou atomy mědi a hemy a a a_3 (viz kapitola 5.2).

CcO krystalizuje jako dimer [66], který je obecně považován za funkční jednotku vnitřní mitochondriální membrány, nicméně velmi málo se ví o strukturní a funkční významnosti dimerní struktury [70].

5.2. Katalýza CcO

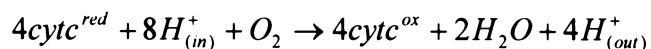
Katalytické centrum CcO je tvořeno dvěma hemy a třemi měďnatými ionty, které jsou obsaženy v konzervovaných doménách podjednotky Cox1 (a , a_3 , Cu_B) a Cox2 (Cu_A). Cu_A centrum se nachází v globulární doméně Cox2 podjednotky, která ční do intermembránového prostoru. Je tvořeno dvěma atomy mědi s odlišnou valencí v klastru s atomy síry a vytváří tak binukleární centrum. Hemové skupiny jsou vmezeřeny mezi některé z 12 transmembránových α -helixů podjednotky Cox1. Hem a je o něco blíže Cu_A centru, než hemu a_3 . Chemické složení hemů a a a_3 je identické, liší se spektroskopicky, neboť jedna z axiálních koordinačních pozic železa hemu a_3 není obsazena aminokyselinovým zbytkem a je volná. Jde o pozici, do které se váže kyslík před jeho redukcí na vodu. K hemu a_3 bezprostředně přiléhá třetí atom mědi CcO, označovaný jako Cu_B, který je v podjednotce Cox1 vázán třemi histidinovými ligandy. Opět se předpokládá, že čtvrtá koordinační pozice je okupována reakčním produktem během určité fáze katalýzy redukce kyslíku. Četné studie ukázaly, že jeden z koordinačních histidinových ligandů Cu_B je propojen se sousedícím tyrosylovým zbytkem [71-74], který díky svým neobvyklým redoxním schopnostem umožňuje tvorbu radikálového stavu po rozštěpení kovalentní vazby v molekule kyslíku [75-77]. Atom železa hemu a_3 tvoří s atomem mědi Cu_B heterobimetalické (binukleární) centrum.

Obecně se předpokládá, že mechanismus přenosu elektronů v oxidativním procesu se skládá z několika kroků, které se neustále opakují. Studie na bakteriálních i mitochondriálních enzymech ukázaly, že vstup elektronů z cytochromu c na komplex IV probíhá přes binukleární centrum Cu_A [78] a vazba cytochromu c na CcO je dána elektrostatickou interakcí na delší vzdálenosti mezi vysoce basickým cytochromem c a kyselými zbytky na Cox2 podjednotce [79-82]. Dalším krokem je přenos elektronu z redukovaného vazebného místa Cu_A na železo hemu a , která probíhá rychlostí 10^{-4} s [83] a dále do heterobimetalického centra (obr. 5.2).



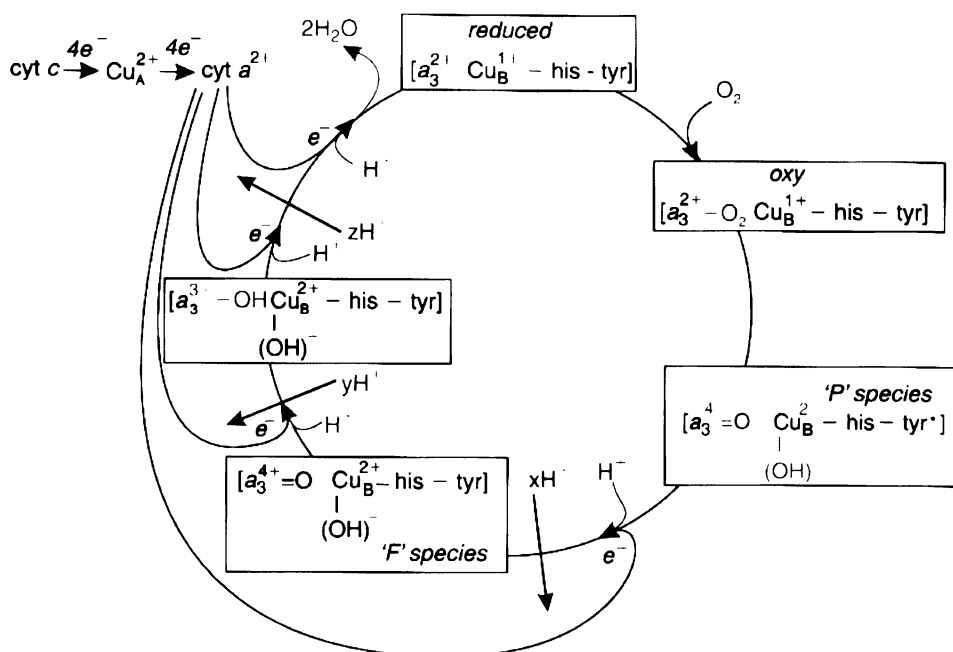
Obr. 5.2 Schématické znázornění koordinace vektorového toku elektronů při redukci kyslíku na vodu (červené šipky) a pumpování protonů (černé šipky) cytochrom c oxidasou [84].

Reakce probíhá jako úplná redukce molekuly kyslíku za vzniku dvou molekul vody [85]. Celková bilance reakce je dána rovnicí:



Přístup kyslíku do heterobimetalického centra je usnadněn nejen jeho rozpustností v hydrofobní membránové části, ale existují teorie, že jeho vstup usnadňují i kanály podjednotek I a III. Způsob vazby molekuly kyslíku do heterobimetalického centra je dán dvěma hlavními teoriemi. První, v současnosti méně přijímaná, předpokládá že kyslík je vmezeřen mezi a_3 a Cu_B . Druhá je založena na předpokladu, že molekula kyslíku je nejprve navázána na a_3 za vzniku transientní *oxy* formy (obr. 5.3.). Následuje rozštěpení O-O vazby v molekule kyslíku, které je velmi rychlé ($<200\mu\text{s}$), a po kterém má kyslík formální oxidační číslo stejné jako v molekule vody (každý kyslík tedy má $-II$). Na tento děj jsou potřeba dohromady čtyři elektrony, z nichž tři jsou získány z reakcí $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{4+} / \text{Cu}^{1+} \rightarrow \text{Cu}^{2+}$ a čtvrtý je velmi pravděpodobně poskytnut tyrosylovým zbytkem propojeným kovalentně s histidinovým ligandem vážícím Cu_B (viz výše). Vzniklý tyrosylový radikál je

nenabitý, neboť poskytuje kyslíkovému atomu také proton za vzniku hydroxylové skupiny vázané na Cu_B . Kyslík tedy může být redukován v jednom velmi rychlém kroku, což předchází produkci a případnému uvolnění reaktivních forem kyslíku. Další kroky reakčního cyklu vyžadují vždy po jednom elektronu z dýchacího řetězce a jednom protonu z matrix k rekonstituci tyrosylového zbytku a stejně tak k tvorbě hydroxylové skupiny i na a_3 (obr. 5.3.). K dokončení cyklu jsou potřeba ještě další dva elektrony a protony k uvolnění dvou molekul vody a přechodu katalytického centra CcO do plně redukovaného stavu. Během těchto redukčních procesů dochází k translokaci čtyř protonů z matrix do intermembránového prostoru (obr. 5.3.). V současné době jsou známy dvě hlavní protonové cesty, označované jako D a K podle aminokyselinových zbytků, se kterými se předpokládá, že významně souvisí. Princip protonové pumpy přes membránu byl studován u bakterií i mitochondrií a pravděpodobně se vyvíjel rozdílnou mechanistickou strategií. Přesný molekulární mechanismus protonové translokace nicméně není dosud příliš znám.



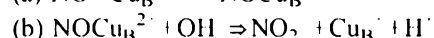
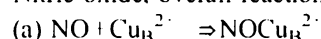
Obr. 5.3 Zjednodušené schéma katalýzy redukce kyslíku na vodu cytochrom *c* oxidasou. Fáze katalýzy, se kterými je nejpravděpodobněji spřažena translokace protonů přes membránu, je naznačena (kde kroky x , $y = 1$ proton a $z=2$ protony, celkem tedy 4 protony) [24].

5.3. Inhibice CcO

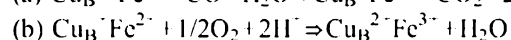
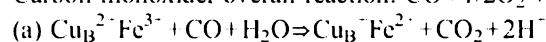
Mezi fyziologicky významné inhibitory CcO patří plyny oxid uhelnatý (CO), oxid dusnatý (NO), sulfan (H₂S) a kyanovodík (HCN), které mohou ve velkém množství být toxické. Zejména oxid dusnatý a sulfan jsou CcO velmi ochotně metabolizovány (tab. 5.1.)

Tab. 5.1 *Metabolismus plynných inhibitorů cytochrom c oxidasy [86].*

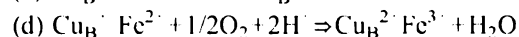
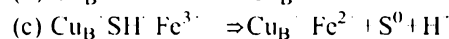
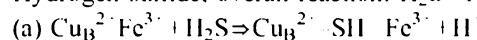
Nitric oxide, overall reaction: $\text{NO} + \text{OH}^- \Rightarrow \text{NO}_2^- + \text{e}^- + \text{H}^+$



Carbon monoxide, overall reaction: $\text{CO} + 1/2\text{O}_2 \Rightarrow \text{CO}_2$



Hydrogen sulfide, overall reaction: $\text{H}_2\text{S} + 1/2\text{O}_2 \Rightarrow \text{S}^0 + \text{H}_2\text{O}$



Molekulární mechanismus inhibice oxidem uhelnatým je nejjednodušší a nejlépe charakterizovaný. Kyslík ani oxid uhelnatý nejsou schopné vazby do katalytického místa CcO dokud není plně redukováno a vzájemně o něj kompetují. Z pohledu buněčné fyziologie je oxid uhelnatý produkován hemovou oxygenasou přímo v savčích tkáních, kde může mít celou řadu fyziologických funkcí [87]. Vysoká hladina CO je toxická a může vést k otravě a smrti. Zásadní je v tomto procesu, kromě kompetice oxidu uhelnatého a kyslíku o vazbu na CcO, hypoxie (CO má vysokou vazebnou afinitu k hemoglobinu a myoglobinu).

Inhibice CcO oxidem dusnatým je v porovnání s oxidem uhelnatým mnohem komplexnější [88]. NO se nejspíš, kromě vazby do redukováného katalytického místa CcO, váže také na oxidovaný [89] a částečně redukováný enzym [90]; CcO je pak redukována a NO oxidován na dusitan [91]. Inhibice CcO oxidem dusnatým je tedy některými autory považována z kinetického hlediska spíše jako nekompetitivní [92], přestože někteří autoři se přiklánějí ke kompetitivnímu typu inhibice [93]. V savčích buňkách je NO produkován z L-argininu třemi odlišnými NO syntázami a podílí se na regulaci mnoha fyziologických funkcí [94]. Z hlediska buněčné fyziologie je toxicita vysoké hladiny NO velmi komplexní a heterogenní, neboť

kromě CcO má NO za fyziologických podmínek mnohem silnější (50x vyšší) afinitu ke guanylát cyklase.

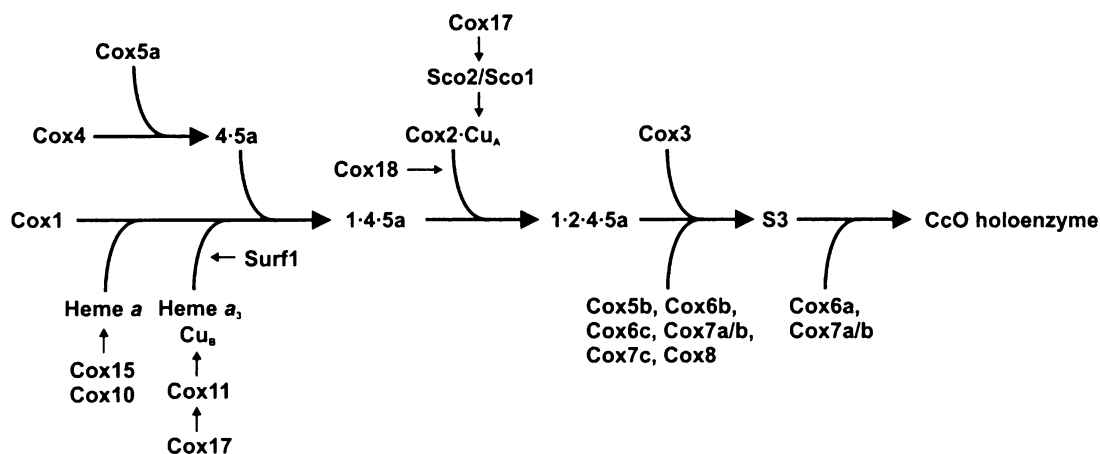
Sulfan je nekompetitivní inhibitor CcO. Váže katalytické centrum v oxidovanému stavu a podobně jako u NO tato interakce vede k oxidaci plynu (podle všeho na elementární síru) a redukci enzymu; finální inhibovaný stav zahrnuje vazbu jedné molekuly H₂S na redukované Cu_B a jedné na oxidovaný hem a_3 [95]. Přestože je izolovaná CcO sulfanem reverzibilně inhibována, dosud nebylo prokázáno, že by endogenní H₂S významně inhiboval respiraci. V savčích systémech je H₂S syntetizován z L-cysteinu cystathionin β -synthasou nebo cystathionin γ -lyasou a předpokládá se, že působí jako endogenní signální molekula s mnoha fyziologickými funkcemi.

Kyanovodík je také schopen silně inhibičně interagovat s CcO, ale velmi pravděpodobně není CcO dále metabolizován. Interakce kyanidů s CcO v redukovaném stavu je jen velmi slabá. Naopak, velmi silně jsou schopny se vázat na CcO v plně oxidovaném nebo částečně redukovaném ($Fe_{a_3}^{3+} - Cu_B^+$) stavu [96]. Bylo popsáno, že HCN může být produkován mozkovými buňkami [97, 98], a neutrofilů [99], kde by mohl fungovat jako neuromodulátor. Intoxikace organismu kyanidy může iniciovat kaskádu vedoucí k neurologickým a srdečním dysfunkcím až smrti, pokud inhibice není bezprostředně odvrácena. Výsledkem inhibice mitochondriálního elektronového transportu kyanidy je generován nadbytek reaktivních forem kyslíku komplexu I a III a vytváří tak intenzivní stres, který přispívá k buněčným dysfunkcím.

5.4. Asemblace CcO

Asemblace CcO ve vnitřní mitochondriální membráně je postupný, relativně pomalý proces, při kterém lze detekovat před vznikem kompletního holoenzymu specifické asemblační intermediáty, které naznačují, že při regulaci biogeneze CcO existují různé kroky limitující tento proces [100]. Definici těchto klíčových fází složitěho procesu biogeneze CcO dovolil fakt, že je v savčích buňkách umožněno subkomplexům CcO se výrazněji hromadit (obr. 5.4) (např. u kvasinek je těžké detekovat subkomplexy CcO neboť podléhají rychlé proteolytické degradaci [101]). Předpokládá se, že poločas života holoenzymu CcO je okolo tří dní [102]. Intramitochondriální ustálená hladina jednotlivých neasemblovaných podjednotek

CcO se zdá být velmi odlišná. Hladina volných podjednotek Cox1 a Cox5a je relativně vysoká, oproti velmi nízkému množství volné podjednotky Cox4 a zejména pak Cox2 v mitochondriích mnoha tkání [103].



Obr. 5.4 Asemblační schéma cytochrom c oxidasy, převzato z [102] a upraveno podle [104]. Ze studie [100] pochází značení asemblačních intermediátů cytochrom c oxidasy písmenem „S“ a číslem (S1-S4); „S“ znamená zkratku anglického slova „species“ a číslo roste od samotné strukturní podjednotky Cox1 (S1) po 13ti podjednotkový holoenzym CcO (S4); asemblační intermediát 1.4.5a je označován jako S2.

Prvním krokem asemblace CcO je asociace Cox1 podjednotky s heterodimerem podjednotek Cox4 a Cox5a za vzniku subkomplexu někdy označovaného jako S2 [100]. Tento subkomplex je schopen se hromadit v podmínkách zastavené/narušené asemblace, což svědčí o jeho relativně vysoké vnitřní stabilitě. Kromě této interakce dochází buď během vzniku S2 nebo ještě na volné Cox1 podjednotce k inzerci hemů a a a_3 (s čímž pravděpodobně souvisí asemblační kofaktory Cox10, Cox15 a Surf1) a Cu_B (s čímž pravděpodobně souvisí asemblační kofaktory Cox17 a Cox11). Teprve po inzerci hemových skupin a vytvoření Cu_B centra podstupuje S2 spojení s Cox2 podjednotkou, která by již měla obsahovat Cu_A centrum (k jeho vytvoření přispívají asemblační kofaktory Cox17, Sco1 a Sco2). Bez vytvoření Cu_A centra není interakce s S2 možná a Cox2 podjednotka podléhá rychlé proteolytické degradaci [103, 105]. Správná asociace Cox2 podjednotky s S2 je nezbytnou podmínkou k navázání podjednotky Cox3 [106], po které následuje navázání dalších strukturních podjednotek s výjimkou Cox7a nebo Cox7b a Cox6a za vzniku jedenáctipodjednotkového asemblačního intermediátu S3. Ten je oproti S2 i za nepatologických podmínek charakteristický

svou značnou stabilitou a lze ho velmi snadno v savčích buňkách mnoha tkání detekovat. Asociace zbylých dvou podjednotek dokončuje asemblaci holoenzymu CcO, která je velmi pravděpodobně následována vytvořením kovalentního můstku mezi jedním z histidinových ligandů vázících CuB a sousedním tyrosylovým zbytkem (viz kap. 5.2). Maturovaný holoenzym CcO je dále velmi pravděpodobně asociován s komplexy dýchacího řetězce za vzniku superkomplexů (viz kap. 4.4), ve kterých se nachází také v dimerní formě. Interakci monomerů CcO v dimeru zprostředkovávají podjednotky Cox6a a Cox6b a k jeho stabilizaci dopomáhá kardiolipin [107, 108].

5.5. Poruchy CcO

Za správnou funkci CcO jsou zodpovědné geny v nDNA i mtDNA pro třináct strukturních podjednotek a celou řadu faktorů podílejících se na jejich asemblaci [109].

Asemblace CcO, podmiňující CcO deficienci, souvisí s majoritní skupinou nDNA genů. Hlavně mezi ně patří ty, které jsou zodpovědné za vazbu kofaktorů (hemy a atomy mědi) do katalytického centra CcO (např. Surf1, Sco1 a Sco2). Mutace v genech pro jaderně kódované podjednotky CcO byly popsány teprve nedávno a jde v současnosti o pouhé dvě, jedna v genu pro podjednotku Cox6b1 [110] a druhá v genu pro podjednotku Cox4i2 [111]. Většina mutací v strukturních podjednotkách CcO (přestože jsou také velmi vzácné) byla popsána v mtDNA genech všech tří strukturních podjednotek (Cox1, Cox2 a Cox3). Popsané mutace jsou heteroplasmické a oproti autozomálně recesivním izolovaným CcO deficiencím se fenotypový projev choroby většinou dostavuje až v pozdním dětství. Každá jednotlivá mutace a její klinická prezentace jsou výrazně odlišné dokonce i mezi pacienty s identickou mutací [112].

Deficience CcO může být dále podmíněna dysfunkcí systému zajišťujícího integritu mitochondriálního genomu (ta vede například k depleci nebo rozsáhlejší delecím mtDNA), nebo bodovými mutacemi genů pro mitochondriální rRNA a tRNA. V případě obou skupin lze předpokládat komplexnější postižení systému OxPhos v rámci kterého je velmi pravděpodobné, že bude postižena také CcO.

6. Využití RNA interference k regulaci genové exprese

RNA interference (RNAi) je proces snížení genové exprese na posttranskripční úrovni prostřednictvím malých nekódujících dvouřetězcových (ds) RNA [113], který ovlivňuje celou řadu procesů v buňce (viz kap. 6.1). Kromě toho se RNAi stala významným nástrojem studia funkce genů (viz kap. 6.2).

6.1. Mechanismus

RNAi a s ní související dráhy genového utišení (z ang. gene silencing) jsou iniciovány produkcí malých (~21-25 nt) nekódujících RNA komplementárních (kompletně nebo do značné míry) s transkripty jimi regulovaných genů. Jsou produkovány endonukleázou Dicer (z rodiny RNasIII), která se nachází v cytoplazmě buňky a je zodpovědná za štěpení dlouhé dsRNA, pre-miRNA, případně shRNA za vzniku siRNA (short interfering RNA) nebo miRNA (micro RNA).

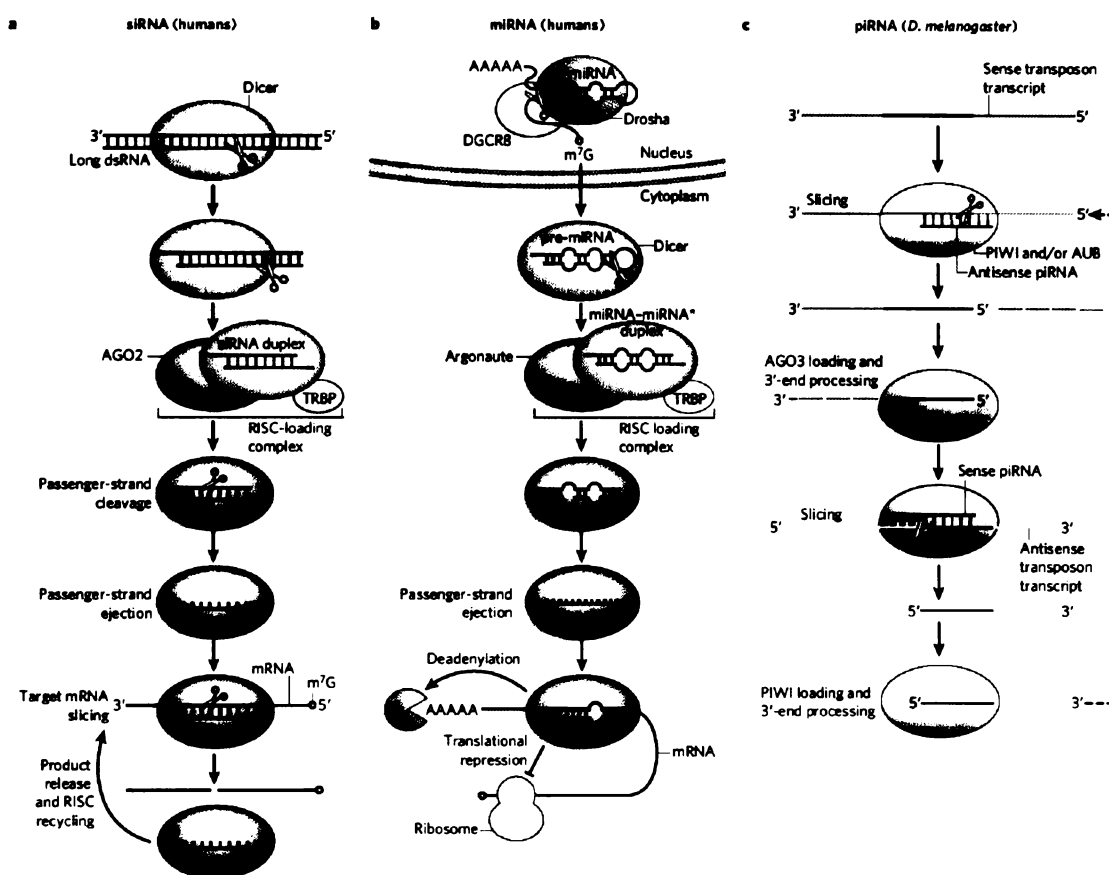
Vznik dsRNA v buňkách je dán replikací RNA virů, transkripcí konvergentních buněčných genů nebo mobilních genetických elementů a intramolekulární hybridizací buněčných transkriptů.

MiRNA jsou buňkou endogenně kódované a velmi významně přispívají k regulaci buněčné genové exprese (u člověka se předpokládá, že regulují expresi až 30% genů) [114]. Přepsané transkripty (pri-miRNA) jsou mikroprocesorovým komplexem štěpeny za vzniku prekurzorového transkriptu (pre-miRNA) podstupujícího export z jádra do cytoplasmy, kde je substrátem enzymu Dicer. Hlavní komponentou mikroprocesorového komplexu je Drosha, další endonukleáza z rodiny RNasIII.

Produkty Dicer endonukleázy (siRNA, miRNA) asociují s proteiny Argonautové rodiny, které představují hlavní proteiny komplexu označovaného RISC (z ang. RNAi-induced silencing complex). Poté, co je jedno z vláken duplexu malých RNA zavzato do RISC, vzniká aktivní komplex schopný sekvenčně specificky rozpoznat cílovou mRNA, kterou rozštěpí nebo je jí zabráněna translační asociace s ribosomy; v obou případech je mRNA nakonec degradována (obr. 6.1). Působíštěm aktivních RISC je buněčná cytoplazma. U některých organismů byly navíc identifikovány specializované jaderné komplexy obsahující také proteiny

z Argonautové rodiny, známé jako RITS (RNA-induced transcriptional silencing complex). RITS zajišťují transkripční utišení genů formací heterochromatinu.

Do skupiny malých nekódujících RNA patří kromě siRNA a miRNA ještě piRNA (PIWI-interacting RNA). Jejich biogeneze také zahrnuje proteiny Argonautové rodiny, ale významně se od siRNA a miRNA liší (obr. 6.1).

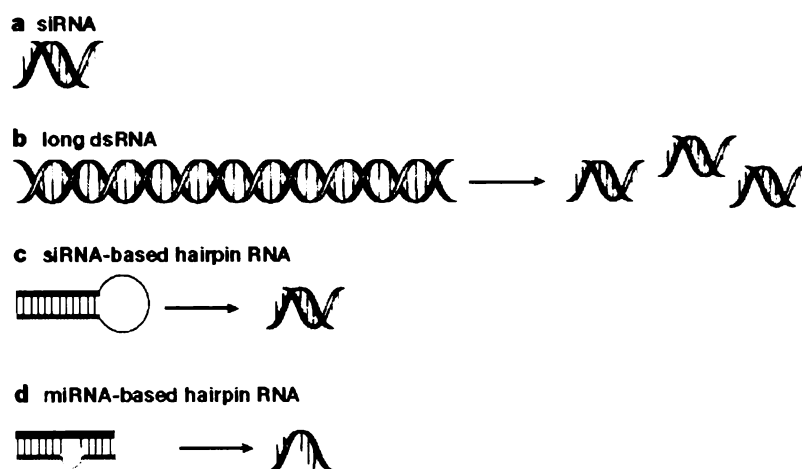


Obr. 6.1 Biogeneze tří hlavních tříd malých nekódujících RNA včetně mechanismu jejich působení. (a) siRNA, (b) miRNA a (c) piRNA – podrobnosti viz tex [114].

6.2. Použití RNAi v savčích systémech

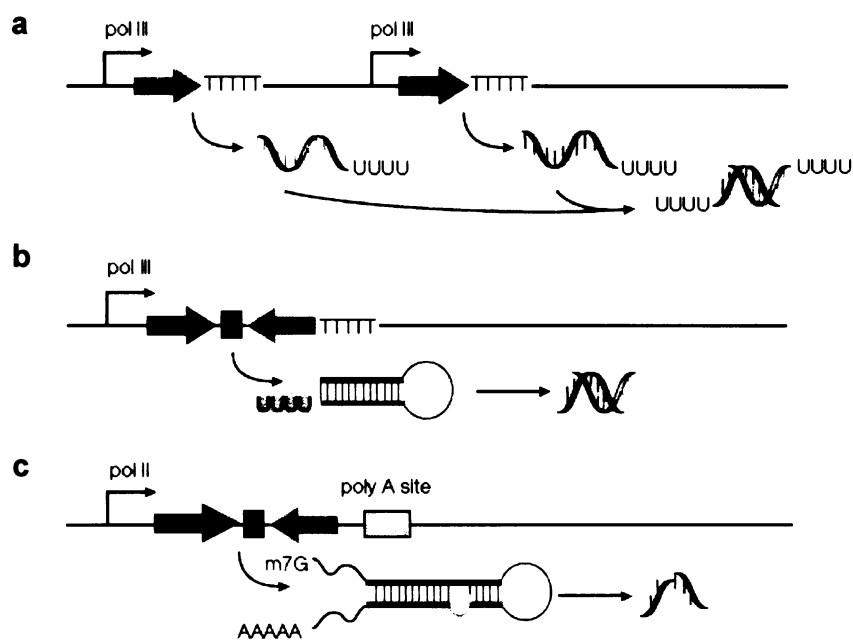
RNAi našla významné využití v reverzní genetice, kdy biologická funkce specifického genu je sledována díky značnému omezení jeho genové exprese. Delší dsRNA podmiňuje produkci sady siRNA (s různou sekvencí), které jsou schopné velmi účinného utišení genové exprese, což lze s výhodou využít u mnoha modelových organismů (např. *Drosophila*, *Caenorhabditis* nebo u rostlin). V savčích buňkách je aplikace tohoto přístupu limitována. DsRNA delší než 30nt spouští

sekvenčně nespecifickou interferonovou odezvou [115]. Interferony jsou malé, vysoce potentní, autokrinně a parakrinně působící molekuly stimulující v buňkách ochranné mechanismy proti replikaci virů tím, že aktivují enzymy zodpovědné za nespecifickou degradaci buněčné mRNA a globální inhibici translace mRNA [116]. Savčí buňky je proto nutné transfekovat přímo siRNA. Příprava siRNA *in vitro* zahrnuje možnosti komerčně dostupné chemické synthesy siRNA nebo štěpení specifické dsRNA, shRNA nebo miRNA Dicer enzymem (obr. 6.2). Kromě štěpení delší dsRNA enzymem Dicer jsou ostatní možnosti limitované znalostí pravidel zajišťujících účinné snížení genové exprese navržených siRNA. Mezi hlavní tato pravidla patří zajištění asymetrického výběru vlákna siRNA duplexu komplementárního k cílové mRNA do aktivního RISC (jde většinou o to vlákno, které má méně stabilní 5'koncové párování s komplementárním vláknem) [117], cílová mRNA v místě rozpoznávaném aktivním RISC také nesmí vytvářet stabilní vlásenkovité struktury ani výrazně vázat proteinové faktory (to je typické zejména pro 5'nepřekládanou oblast mRNA kde dochází k iniciaci translace) [118]. Významnou výhodou siRNA, je nenáročnost jejich získání, zejména při využití komerčně dostupných služeb synthesy siRNA. Hlavním limitem transfekce buněk malými nekódujícími RNA připravenými *in vitro* je dočasný (transientní) charakter.



Obr. 6.2 Schématické znázornění metod k vytváření RNAi-indukujících krátkých nekódujících RNA *in vitro*. (a) Chemicky syntetisované siRNA, (b) specifická dlouhá dsRNA, ze které je *in vitro* generována sada sekvenčně odlišných siRNA Dicer enzymem, (c) malá vlásenkovitá RNA (shRNA) s plně komplementárním ramenem, (d) malá vlásenkovitá RNA s neúplně komplementárním ramenem (analogická prekurzoru miRNA). Formy malých nekódujících RNA (c) a (d) jsou prekurzorového charakteru a až po transfekci jsou v buňkách procesovány endogenním Dicer enzymem [119].

Druhou hlavní možností je navození RNAi prostřednictvím malých nekódujících RNA exprimovaných a tvořících se *in vivo*. Pro tyto účely jsou konstruovány specifické RNAi-indukující plazmidy [119, 120]. Exprese vlásenek je většinou zajišťována DNA-dependentní RNA polymerasou II (enzym transkribující mRNA a většinu malých jaderných RNA v eukaryotech ve spojení s celou řadou transkripčních faktorů) nebo III (enzym transkribující RNA, která není překládána na proteiny, zejména tRNA). K často používaným promotorům RNA polymerázy II patří CMV promotor (z ang. CytoMegalovirus), kdežto pro přepis RNA polymerázou III jsou často užívány promotory H1 nebo U6 (obr. 6.3).



Obr. 6.3 Schématické znázornění metod k vytváření RNAi-indukujících krátkých nekódujících RNA generovaných *in vivo*. (a) Exprese sense a antisense vláken siRNA ze dvou tandemově umístěných promotorů polymerasy III, která asociují následně po přepisu (tr. trans způsob asociace), (b) expresní kazeta pro shRNA pod promotorem RNA polymerasy III, (c) expresní kazeta pro shRNA (s neúplně komplementárním ramenem) pod promotorem RNA polymerasy II [119].

Plasmid může obsahovat tandemově uspořádané U6 (nebo H1) promotory vedoucí k expresi sense a antisense vláken ze dvou separátních transkripčních jednotek, která se následně spojí (*in vivo*) za vzniku 19nt duplexu s čtyřnukleotickými přesahy. Plasmid může také kódovat prekursorové shRNA nebo vlásenky v kontextu endogenních miRNA, které jsou po exportu z jádra

rozpoznávány a následně štěpeny Dicer enzymem (tento způsob je v porovnání s prvně zmíněným efektivnější). Ektopická exprese prekurzorů RNAi-indukujících malých nekódujících RNA z plazmidu je výhodná z hlediska mnoha dalších možností využití, z nichž nejdůležitější je příprava stabilních buněčných linií, pokud je součástí plazmidu také selekční marker. Dále je možné do plazmidu zahrnout virové elementy umožňující transdukcii, nebo zvolit tkáňově specifický nebo inducibilní promotor a připravit buněčný organismus s tkáňově specifickou nebo regulovaně spouštěnou RNAi.

Mezi významná rizika využití RNAi k specifickému snížení genové exprese, zejména v případě siRNA, patří sekvenčně specifické utišení nesprávného genu (z ang. „off-target“ transcript silencing), které je podmíněno schopností aktivního RISC interferovat i na základě částečné komplementarity (nad 11bp) 5'konce siRNA vlákna RISC a cílové mRNA [121, 122]. Tomuto problému je dobré se vyvarovat volbou vhodné kontroly, např. sledovat zda se fenotyp daný sekvenčně odlišnými siRNA shoduje, případně specificky modifikovat siRNA [123]. V rámci proteinových rodin s konzervovanými doménami je třeba navrhovat siRNA mimo tyto domény do nehomologických oblastí mRNA. Mezi další popsané, sekvenčně nespecifické efekty související s RNAi, patří kromě možné slabé interferonové odezvy (viz výše) také potenciální přetížení buněčného systému RNAi transfekovanými nebo ektopicky exprimovanými malými nekódujícími RNA, které může narušit funkci endogenních miRNA [124].

6.3. Využití RNAi k studiu funkce strukturních podjednotek CcO

Jednou z nejčastějších příčin poruch systému OxPhos u člověka jsou defekty CcO. U pacientů s poruchou CcO již byly popsány mutace ve všech třech genech pro strukturní podjednotky CcO (Cox1, Cox2 a Cox3) kódovaných mtDNA. Pouze dvě mutace v podjednotkách Cox4i1 a Cox6b1 však byly dosud zjištěny v souboru jedenácti jaderně kódovaných strukturních podjednotek CcO (viz kap. 5.5). Na základě studií u kvasinkových mutantů a několika dalších modelových organismů (*Drosophila*, *Danio*, *Caenorhabditis*, *Mus*) lze nicméně předpokládat, že také u člověka jsou pro biogenezi CcO nepostradatelné. Podrobné studie vlivu absence konkrétní strukturní podjednotky na proces assemblace CcO, neboli zjištění

asemblačního profilu specifického pro absenci dané podjednotky, by mohl být užitečný pro zjišťování podstaty CcO deficiencie u pacientů.

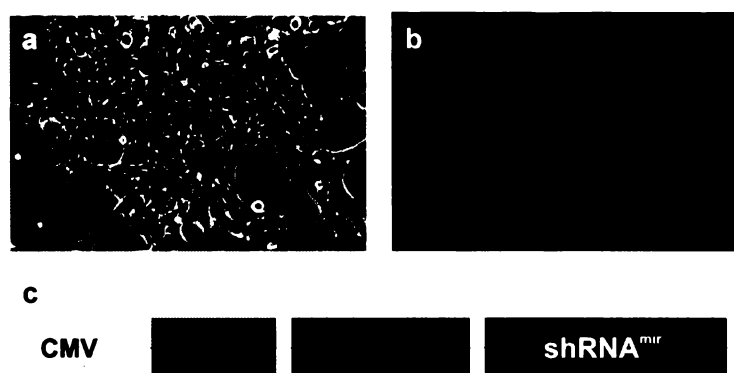
Pro výše zmíněné účely je nutné zvolit vhodný postup zajišťující depleci specifické podjednotky (z kapitol 6.1 a 6.2 je zřejmé, že takovouto metodou může být RNAi) a vhodnou buněčnou linií na které budou experimenty realizovány. HEK293 (Human Embryonic Kidney) je lidská buněčná linie, původně embryonální ledvinné tkáně, experimentálně velmi oblíbená pro svou dobrou genovou manipulovatelnost (má vysokou transfekční účinnost) [125] a rychlý adherentní růst za relativně nenáročných podmínek. Jde o buňky obsahující fragmenty lidského adenoviru typu 5 inkorporovaného v chromozomu 19 hostitelského genomu. Buněčná linie je komerčně dostupná např. u firmy American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA) pod číslem CRL-1573.

Navození RNAi v buňkách pomocí specifického plazmidu umožňujícího přípravu stabilních buněčných linií je pro účely studia mitochondriálních proteinů výhodný. Předně, mitochondriální proteiny mají obecně poměrně dlouhou dobu stability (2-5 dní). Proto u buněk transientně transfekovaných siRNA/shRNA^{mir} může být i po 48 hodinách od transfekce hladina původního proteinu výrazně nezměněná, přestože daná siRNA/shRNA^{mir} je schopna po potřebné době genovou expresi účinně snížit. Další výhodou přípravy stabilních buněčných linií je značné množství materiálu, který je možné z „nakultivovaných“ buněk získat. Celá řada následných experimentů vyžaduje izolaci mitochondrií, pro kterou je vhodné mít větší množství buněk.

Plazmid pCMV-GIN-ZEO (Open Biosystems) je velmi vhodný k navození RNAi z několika důvodů. RNAi-indukující expresní kazeta zahrnuje vlásenku specifickou pro daný cílový gen v kontextu lidské miRNA miR30 (miR30). miR30 kontext zvyšuje více než 10x množství produktů Drosha a Dicer enzymů [126], tudíž i množství aktivních RISC komplexů, a tím i celkovou efektivitu systému. Kódující sekvence pro GFP a neomycin fosfotransferasu (GFP-IRES-Neo^r)*, které jsou expresně v přímé vazbě s vlásenkou (obr. Xyz.c), zvyšují RNAi potenciál kazety (Stegmeier et al. 2005), exprese kazety je vidět již pod fluorescenčním mikroskopem

* GFP znamená zkratku ang. Green Fluorescent Protein; IRES znamená zkratku ang. Internal Ribosomal Entry Site; Neo^r je zkratka pro neomycinovou rezistenci. GFP a Neo^r jsou kódující sekvence; IRES je sekvence navádějící ribosom eukaryotického systému k překladu čtecího rámce za ní obsaženého a umožňuje tak translaci druhého čtecího rámce bicistronního transkriptu.

a umožňují velmi specifickou selekci polyklonální populace buněk rezistentních ke G418[†]. Protože populace buněk vyselektovaných na základě rezistence ke G418 může z hlediska míry exprese transgenů vykazovat značný rozsah, lze pomocí třídění buněk dle intenzity exprese GFP metodou FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting) omezit analyzovaný materiál pouze na buňky se silnou expresí transgenů, čímž je možné přiblížit výslednou kvalitu experimentu kvalitě dosažené na monoklonální populaci buněk (buňky pocházející z jediné původní, získané subklonováním transfekční reakce, což je proces dosti zdlouhavý a náročný).



Obr. 6.4 Struktura HEK293 buněk ve světelném mikroskopu (a). HEK293 buňky ve fluorescenčním mikroskopu po transfekci pCMV-GIN-ZEO plasmidem (b). Schéma RNAi-indukující expresní kazety pCMV-GIN-ZEO plasmidu (z manuálu firmy Open Biosystems) (c): CMV – promotor DNA-dependentní RNA polymerasy II, GFP – fluorescenční marker (Green Fluorescent Protein), IRES-Neo^r – selekční marker neomycinové rezistence, shRNA^{mir} – vlásenka v kontextu miR30 (kontext čítá od pozice samotné vlásenky ještě dalších přibližně 125bp v obou směrech).

K získání požadovaného buněčného materiálu je nutno provést několik dílčích úkolů:

- prostřednictvím specifického programu navrhnout kandidátní shRNA^{mir} zacílené do různých pozic cílové mRNA (7-12 v závislosti na délce cílové mRNA)
- zkonstruovat pCMV-GIN-ZEO deriváty kódující kandidátní shRNA^{mir} v rámci RNA-indukující expresní kazety

[†] G418 je aminoglykosidové antibiotikum svou strukturou podobné gentamicinu, neomycinu nebo kanamycinu, které blokuje syntézu polypeptidů inhibicí elongace translace. Je používán pro selekci a udržování eukaryotických buněk stabilně transfekovaných plasmidem s genem neomycinové rezistence.

- transfekovat HEK293 buňky zkonstruovanými plazmidy pCMV-GIN-ZEO a selektovat buňky rezistentní ke G418 (neboli příprava stabilně transfekovaných buněk)
- vybrat buněčnou linii HEK293 s nejnižší reziduální hladinou cílového proteinu (kombinací SDS-PAGE a imunodetekce); protože lze v souvislosti se systémem OxPhos velmi často pozorovat prahový efekt (viz kap. 4.6) je někdy vhodné vybrat pro následné experimenty i buněčnou linii s mírnější deplecí cílového proteinu, která pak umožňuje sledovat například jak se pokles podjednotky projevuje na hladině holoenzymu, kterého je podjednotka součástí

Po vybrání vhodných buněčných linií HEK293 následuje samotná analýza fenotypu buněk s deplecí cílového genu, která zahrnuje následující možnosti:

- studovat dopad snížení genové exprese cílové podjednotky u jednotlivých vybraných shRNA^{mir} na množství celého holoenzymu (kombinací BN-PAGE a imunodetekce) a jeho reziduální specifickou aktivitu (spektrofotometrie)
- studovat vliv snížení genové exprese cílové podjednotky na buněčnou respiraci (polarografie)
- studovat vliv deplece cílové podjednotky na assemblaci holoenzymu (BN-PAGE v kombinaci s imunodetekcí) a identitu případných assemblačních intermediátů (BN/SDS/PAGE v kombinaci s imunodetekcí)
- studovat dopad snížení genové exprese cílové podjednotky na ultrastrukturu mitochondrií (elektronová a konfokální mikroskopie), případně na množství mtDNA (kvantitativní PCR)
- studovat dopad snížení genové exprese cílové podjednotky na buňky (rychlost růstu buněk a jejich vitalita/letalita, produkce laktátu)

Souhrn

V rámci teoretické, rešeršní podstaty této bakalářské práce byla diskutována následující problematika:

- byl charakterizován význam mitochondrií v buněčném energetickém metabolismu
- byly charakterizovány hlavní děje zajišťující funkci mitochondrií
- byl charakterizován systém OxPhos a jeho souvislost s energetickým metabolismem
- byla charakterizována role CcO v systému OxPhos a podrobně specifikována struktura, katalýza a biogeneze tohoto enzymu
- byl podán podrobný teoretický základ využití RNAi k studiu role strukturních podjednotek CcO v její biogenezi a tím vymezen podklad pro následující experimentální fázi studia

Závěr

Mitochondrie hrají klíčovou roli v energetickém metabolismu buňky, jehož dysfunkce se projevuje zejména v tkáních s vysokými energetickými nároky. Jednou z nejčastějších příčin poruch systému OxPhos u člověka jsou defekty CcO. Struktura a funkce CcO je dnes důkladně známá, přesto určení primární podstaty CcO deficience není lehké. Podrobné studie vlivu absence konkrétní strukturní podjednotky na proces assemblace CcO by mohl být užitečný při zjišťování podstaty poruch CcO u pacientů.

Použitá literatura

- 1 D. C. Logan. (2006) *J Exp Bot* **57**, 1225-43
- 2 M. Passamonti and F. Ghiselli. (2009) *DNA Cell Biol* **28**, 79-89
- 3 C. A. Mannella. (2006) *Biochim Biophys Acta* **1762**, 140-7
- 4 K. S. Dimmer, S. Fritz, F. Fuchs, M. Messerschmitt, N. Weinbach, W. Neupert and B. Westermann. (2002) *Mol Biol Cell* **13**, 847-53
- 5 B. Westermann. (2002) *EMBO Rep* **3**, 527-31
- 6 K. L. Cervený, Y. Tamura, Z. Zhang, R. E. Jensen and H. Sesaki. (2007) *Trends Cell Biol* **17**, 563-9
- 7 S. B. Berman, F. J. Pineda and J. M. Hardwick. (2008) *Cell Death Differ* **15**, 1147-52
- 8 H. Chen and D. C. Chan. (2005) *Hum Mol Genet* **14 Spec No. 2**, R283-9
- 9 O. M. de Brito and L. Scorrano. (2009) *Mitochondrion* **9**, 222-6
- 10 (2008) *Antioxid Redox Signal* **10**, 621-33
- 11 C. Frezza, S. Cipolat, O. Martins de Brito, M. Micaroni, G. V. Beznoussenko, T. Rudka, D. Bartoli, R. S. Polishuck, N. N. Danial, B. De Strooper and L. Scorrano. (2006) *Cell* **126**, 177-89
- 12 O. M. de Brito and L. Scorrano. (2008) *Nature* **456**, 605-10
- 13 J. Wang and Y. Y. Lu. (2009) *Chin Med J (Engl)* **122**, 431-6
- 14 M. Falkenberg, N. G. Larsson and C. M. Gustafsson. (2007) *Annu Rev Biochem* **76**, 679-99
- 15 J. Smeitink, L. van den Heuvel and S. DiMauro. (2001) *Nat Rev Genet* **2**, 342-52
- 16 P. Sutovsky, R. D. Moreno, J. Ramalho-Santos, T. Dominko, C. Simerly and G. Schatten. (1999) *Nature* **402**, 371-2
- 17 H. Kaneda, J. Hayashi, S. Takahama, C. Taya, K. F. Lindahl and H. Yonekawa. (1995) *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 4542-6
- 18 W. Neupert and J. M. Herrmann. (2007) *Annu Rev Biochem* **76**, 723-49
- 19 D. Kim and J. Rossi. (2008) *Biotechniques* **44**, 613-6
- 20 U. Pfeifer. (1978) *J Cell Biol* **78**, 152-67
- 21 D. A. Bota and K. J. Davies. (2001) *Mitochondrion* **1**, 33-49
- 22 I. Arnold and T. Langer. (2002) *Biochim Biophys Acta* **1592**, 89-96
- 23 F. Fontanesi, I. C. Soto, D. Horn and A. Barrientos. (2006) *Am J Physiol Cell Physiol* **291**, C1129-47
- 24 D. Nicholls, Ferguson, SJ. (2002) *Bioenergetics* **3**
- 25 H. Lodish, Berk, A, Zipursky, SL, Matsudaira, P, Baltimore, D. (1999)
- 26 L. A. Sazanov and J. E. Walker. (2000) *J Mol Biol* **302**, 455-64
- 27 P. J. Holt, D. J. Morgan and L. A. Sazanov. (2003) *J Biol Chem* **278**, 43114-20
- 28 T. Friedrich. (2001) *J Bioenerg Biomembr* **33**, 169-77
- 29 R. J. Janssen, L. G. Nijtmans, L. P. van den Heuvel and J. A. Smeitink. (2006) *J Inherit Metab Dis* **29**, 499-515
- 30 F. Sun, X. Huo, Y. Zhai, A. Wang, J. Xu, D. Su, M. Bartlam and Z. Rao. (2005) *Cell* **121**, 1043-57
- 31 M. Huttemann, I. Lee, L. Samavati, H. Yu and J. W. Doan. (2007) *Biochim Biophys Acta* **1773**, 1701-20
- 32 N. V. Bykova, H. Egsgaard and I. M. Moller. (2003) *FEBS Lett* **540**, 141-6
- 33 G. Lenaz, R. Fato, G. Formiggini and M. L. Genova. (2007) *Mitochondrion* **7 Suppl**, S8-33

- 34 A. V. Kozlov, H. Nohl and L. Gille. (1998) *Bioorganic Chemistry* **26**, 334-344
- 35 A. D. Vinogradov, V. D. Sled, D. S. Burbaev, V. G. Grivennikova, I. A. Moroz and T. Ohnishi. (1995) *FEBS Lett* **370**, 83-7
- 36 G. Y. Lee, D. Y. He, L. Yu and C. A. Yu. (1995) *J Biol Chem* **270**, 6193-8
- 37 E. J. Lesnefsky and C. L. Hoppel. (2006) *Ageing Res Rev* **5**, 402-33
- 38 S. Iwata, J. W. Lee, K. Okada, J. K. Lee, M. Iwata, B. Rasmussen, T. A. Link, S. Ramaswamy and B. K. Jap. (1998) *Science* **281**, 64-71
- 39 D. R. Green. (2000) *Cell* **102**, 1-4
- 40 B. Meyer, I. Wittig, E. Trifilieff, M. Karas and H. Schagger. (2007) *Mol Cell Proteomics* **6**, 1690-9
- 41 K. Kinoshita, Jr., R. Yasuda, H. Noji and K. Adachi. (2000) *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **355**, 473-89
- 42 R. L. Cross. (2004) *Nature* **427**, 407-8
- 43 R. Murray, Granner, DK, Mayes, PA. (2002)
- 44 C. R. Hackenbrock, B. Chazotte and S. S. Gupte. (1986) *J Bioenerg Biomembr* **18**, 331-68
- 45 G. Lenaz, R. Fato, S. Di Bernardo, D. Jarreta, A. Costa, M. L. Genova and G. Parenti Castelli. (1999) *Biofactors* **9**, 87-93
- 46 B. P. Dixit, A. J. Waring, K. O. Wells, 3rd, P. S. Wong, G. V. Woodrow, 3rd and J. M. Vanderkooi. (1982) *Eur J Biochem* **126**, 1-9
- 47 J. P. Hosler, S. Ferguson-Miller and D. A. Mills. (2006) *Annu Rev Biochem* **75**, 165-87
- 48 N. V. Dudkina, H. Eubel, W. Keegstra, E. J. Boekema and H. P. Braun. (2005) *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 3225-9
- 49 R. Acin-Perez, P. Fernandez-Silva, M. L. Peleato, A. Perez-Martos and J. A. Enriquez. (2008) *Mol Cell* **32**, 529-39
- 50 E. A. Berry and B. L. Trumpower. (1985) *J Biol Chem* **260**, 2458-67
- 51 T. Iwasaki, K. Matsuura and T. Oshima. (1995) *J Biol Chem* **270**, 30881-92
- 52 H. Schagger and K. Pfeiffer. (2000) *Embo J* **19**, 1777-83
- 53 (2001) *J Biol Chem* **276**, 37861-7
- 54 H. Schagger, R. de Coo, M. F. Bauer, S. Hofmann, C. Godinot and U. Brandt. (2004) *J Biol Chem* **279**, 36349-53
- 55 A. B. Kotlyar, V. D. Sled, D. S. Burbaev, I. A. Moroz and A. D. Vinogradov. (1990) *FEBS Lett* **264**, 17-20
- 56 C. M. Cruciat, S. Brunner, F. Baumann, W. Neupert and R. A. Stuart. (2000) *J Biol Chem* **275**, 18093-8
- 57 B. Kadenbach and S. Arnold. (1999) *FEBS Lett* **447**, 131-4
- 58 P. S. O'Shea, G. Petrone, R. P. Casey and A. Azzi. (1984) *Biochem J* **219**, 719-26
- 59 Z. Technikova-Dobrova, A. M. Sardanelli, F. Speranza, S. Scacco, A. Signorile, V. Lorusso and S. Papa. (2001) *Biochemistry* **40**, 13941-7
- 60 S. Helling, S. Vogt, A. Rhiel, R. Ramzan, L. Wen, K. Marcus and B. Kadenbach. (2008) *Mol Cell Proteomics* **7**, 1714-24
- 61 B. Kadenbach. (2003) *Biochim Biophys Acta* **1604**, 77-94
- 62 J. P. Mazat, R. Rossignol, M. Malgat and T. Letellier. (2000) *Dev Neurosci* **22**, 399-403
- 63 R. Rossignol, M. Malgat, J. P. Mazat and T. Letellier. (1999) *J Biol Chem* **274**, 33426-32

- 64 R. Rossignol, T. Letellier, M. Malgat, C. Rocher and J. P. Mazat. (2000) *Biochem J* **347 Pt 1**, 45-53
- 65 B. Kadenbach, J. Jarausach, R. Hartmann and P. Merle. (1983) *Anal Biochem* **129**, 517-21
- 66 T. Tsukihara, H. Aoyama, E. Yamashita, T. Tomizaki, H. Yamaguchi, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono and S. Yoshikawa. (1996) *Science* **272**, 1136-44
- 67 B. Kadenbach, M. Huttemann, S. Arnold, I. Lee and E. Bender. (2000) *Free Radic Biol Med* **29**, 211-21
- 68 M. Huttemann, B. Kadenbach and L. I. Grossman. (2001) *Gene* **267**, 111-23
- 69 O. M. Richter and B. Ludwig. (2003) *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **147**, 47-74
- 70 J. Stanicova, E. Sedlak, A. Musatov and N. C. Robinson. (2007) *Biochemistry* **46**, 7146-52
- 71 C. Ostermeier, A. Harrenga, U. Ermler and H. Michel. (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 10547-53
- 72 S. Yoshikawa, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono, E. Yamashita, N. Inoue, M. Yao, M. J. Fei, C. P. Libeu, T. Mizushima, H. Yamaguchi, T. Tomizaki and T. Tsukihara. (1998) *Science* **280**, 1723-9
- 73 G. Buse, T. Soulimane, M. Dewor, H. E. Meyer and M. Bluggel. (1999) *Protein Sci* **8**, 985-90
- 74 P. Hellwig, U. Pfitzner, J. Behr, B. Rost, R. P. Pesavento, W. V. Donk, R. B. Gennis, H. Michel, B. Ludwig and W. Mantele. (2002) *Biochemistry* **41**, 9116-25
- 75 D. A. Proshlyakov, M. A. Pressler, C. DeMaso, J. F. Leykam, D. L. DeWitt and G. T. Babcock. (2000) *Science* **290**, 1588-91
- 76 F. MacMillan, A. Kannt, J. Behr, T. Prisner and H. Michel. (1999) *Biochemistry* **38**, 9179-84
- 77 E. Pinakoulaki, U. Pfitzner, B. Ludwig and C. Varotsis. (2002) *J Biol Chem* **277**, 13563-8
- 78 F. Malatesta, F. Nicoletti, V. Zickermann, B. Ludwig and M. Brunori. (1998) *FEBS Lett* **434**, 322-4
- 79 V. Drosou, F. Malatesta and B. Ludwig. (2002) *Eur J Biochem* **269**, 2980-8
- 80 B. Reincke, C. Perez, P. Pristovsek, C. Lucke, C. Ludwig, F. Lohr, V. V. Rogov, B. Ludwig and H. Ruterjans. (2001) *Biochemistry* **40**, 12312-20
- 81 V. A. Roberts and M. E. Pique. (1999) *J Biol Chem* **274**, 38051-60
- 82 D. Flock and V. Helms. (2002) *Proteins* **47**, 75-85
- 83 I. Szundi, J. A. Cappuccio, N. Borovok, A. B. Kotlyar and O. Einarsdottir. (2001) *Biochemistry* **40**, 2186-93
- 84 ISB-2. (last changed 07.03.2009) in Institute of Structural Biology and Biophysics, Juelich, pp. http://www.fz-juelich.de/isb/isb-2/topics/energy_conversion/cytochrome_c
- 85 I. Szundi, G. L. Liao and O. Einarsdottir. (2001) *Biochemistry* **40**, 2332-9
- 86 C. E. Cooper and G. C. Brown. (2008) *J Bioenerg Biomembr* **40**, 533-9
- 87 W. Durante, F. K. Johnson and R. A. Johnson. (2006) *J Cell Mol Med* **10**, 672-86
- 88 M. G. Mason, P. Nicholls, M. T. Wilson and C. E. Cooper. (2006) *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 708-13
- 89 C. E. Cooper and C. Giulivi. (2007) *Am J Physiol Cell Physiol* **292**, C1993-2003

- 90 A. Giuffre, M. C. Barone, M. Brunori, E. D'Itri, B. Ludwig, F. Malatesta, H. W. Muller and P. Sarti. (2002) *J Biol Chem* **277**, 22402-6
- 91 J. Torres, M. A. Sharpe, A. Rosquist, C. E. Cooper and M. T. Wilson. (2000) *FEBS Lett* **475**, 263-6
- 92 L. L. Pearce, E. L. Bominaar, B. C. Hill and J. Peterson. (2003) *J Biol Chem* **278**, 52139-45
- 93 F. Antunes, A. Boveris and E. Cadenas. (2004) *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 16774-9
- 94 W. K. Alderton, C. E. Cooper and R. G. Knowles. (2001) *Biochem J* **357**, 593-615
- 95 B. C. Hill, T. C. Woon, P. Nicholls, J. Peterson, C. Greenwood and A. J. Thomson. (1984) *Biochem J* **224**, 591-600
- 96 H. B. Leavesley, L. Li, K. Prabhakaran, J. L. Borowitz and G. E. Isom. (2008) *Toxicol Sci* **101**, 101-11
- 97 P. G. Gunasekar, J. L. Borowitz, J. J. Turek, D. A. Van Horn and G. E. Isom. (2000) *J Neurosci Res* **61**, 570-5
- 98 P. G. Gunasekar, K. Prabhakaran, L. Li, L. Zhang, G. E. Isom and J. L. Borowitz. (2004) *Neurosci Res* **49**, 13-8
- 99 T. Stelmazynska. (1986) *Int J Biochem* **18**, 1107-14
- 100 L. G. Nijtmans, J. W. Taanman, A. O. Muijsers, D. Speijer and C. Van den Bogert. (1998) *Eur J Biochem* **254**, 389-94
- 101 S. Horan, I. Bourges, J. W. Taanman and B. Meunier. (2005) *Biochem J* **390**, 703-8
- 102 L. Stiburek, H. Hansikova, M. Tesarova, L. Cerna and J. Zeman. (2006) *Physiol Res* **55 Suppl 2**, S27-41
- 103 L. Stiburek, K. Vesela, H. Hansikova, P. Pecina, M. Tesarova, L. Cerna, J. Houstek and J. Zeman. (2005) *Biochem J* **392**, 625-32
- 104 L. Stiburek, D. Fornuskova, L. Wenchich, M. Pejznochova, H. Hansikova and J. Zeman. (2007) *J Mol Biol* **374**, 506-16
- 105 S. L. Williams, I. Valnot, P. Rustin and J. W. Taanman. (2004) *J Biol Chem* **279**, 7462-9
- 106 V. Tiranti, P. Corona, M. Greco, J. W. Taanman, F. Carrara, E. Lamantea, L. Nijtmans, G. Uziel and M. Zeviani. (2000) *Hum Mol Genet* **9**, 2733-42
- 107 E. Sedlak and N. C. Robinson. (1999) *Biochemistry* **38**, 14966-72
- 108 K. Shinzawa-Itoh, H. Aoyama, K. Muramoto, H. Terada, T. Kurauchi, Y. Tadehara, A. Yamasaki, T. Sugimura, S. Kurono, K. Tsujimoto, T. Mizushima, E. Yamashita, T. Tsukihara and S. Yoshikawa. (2007) *Embo J* **26**, 1713-25
- 109 P. Pecina, H. Houstkova, H. Hansikova, J. Zeman and J. Houstek. (2004) *Physiol Res* **53 Suppl 1**, S213-23
- 110 V. Massa, E. Fernandez-Vizarra, S. Alshahwan, E. Bakhsh, P. Goffrini, I. Ferrero, P. Mereghetti, P. D'Adamo, P. Gasparini and M. Zeviani. (2008) *Am J Hum Genet* **82**, 1281-9
- 111 E. Shteyer, A. Saada, A. Shaag, F. A. Al-Hijawi, R. Kidess, S. Revel-Vilk and O. Elpeleg. (2009) *Am J Hum Genet* **84**, 412-7
- 112 E. A. Shoubridge. (2001) *Am J Med Genet* **106**, 46-52
- 113 M. K. Montgomery, S. Xu and A. Fire. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 15502-7
- 114 M. Jinek and J. A. Doudna. (2009) *Nature* **457**, 405-12

- 115 S. M. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber and T. Tuschl. (2001) *Nature* **411**, 494-8
- 116 G. R. Stark, I. M. Kerr, B. R. Williams, R. H. Silverman and R. D. Schreiber. (1998) *Annu Rev Biochem* **67**, 227-64
- 117 D. S. Schwarz, G. Hutvagner, T. Du, Z. Xu, N. Aronin and P. D. Zamore. (2003) *Cell* **115**, 199-208
- 118 K. Yoshinari, M. Miyagishi and K. Taira. (2004) *Nucleic Acids Res* **32**, 691-9
- 119 D. M. Dykxhoorn, C. D. Novina and P. A. Sharp. (2003) *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 457-67
- 120 B. R. Cullen. (2006) *Gene Ther* **13**, 503-8
- 121 A. L. Jackson, J. Burchard, J. Schelter, B. N. Chau, M. Cleary, L. Lim and P. S. Linsley. (2006) *Rna* **12**, 1179-87
- 122 A. L. Jackson, S. R. Bartz, J. Schelter, S. V. Kobayashi, J. Burchard, M. Mao, B. Li, G. Cavet and P. S. Linsley. (2003) *Nat Biotechnol* **21**, 635-7
- 123 A. L. Jackson, J. Burchard, D. Leake, A. Reynolds, J. Schelter, J. Guo, J. M. Johnson, L. Lim, J. Karpilow, K. Nichols, W. Marshall, A. Khvorova and P. S. Linsley. (2006) *Rna* **12**, 1197-205
- 124 B. R. Cullen. (2006) *Nat Methods* **3**, 677-81
- 125 P. Thomas and T. G. Smart. (2005) *J Pharmacol Toxicol Methods* **51**, 187-200
- 126 J. M. Silva, M. Z. Li, K. Chang, W. Ge, M. C. Golding, R. J. Rickles, D. Siolas, G. Hu, P. J. Paddison, M. R. Schlabach, N. Sheth, J. Bradshaw, J. Burchard, A. Kulkarni, G. Cavet, R. Sachidanandam, W. R. McCombie, M. A. Cleary, S. J. Elledge and G. J. Hannon. (2005) *Nat Genet* **37**, 1281-8