

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Speciální chemicko-biologické obory
Molekulární biologie a biochemie organismů



Eliška Holzerová

Mitochondriální produkce kyslíkových radikálů a její úloha ve fyziologických regulacích
Mitochondrial production of reactive oxygen species and its role in physiological regulations

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Tomáš Mráček, PhD.

Praha, 2011

Prohlášení:

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

V Praze, 5. 5. 2011

Podpis

Abstrakt

Produkce kyslíkových radikálů v mitochondriích a z ní plynoucí oxidativní stres je významným fenoménem dlouhodobého výzkumu a též předmětem diskusí. Poznání, jak přesně jsou kyslíkové radikály produkovány a jaký mechanismus k této tvorbě vede, by mohlo napomoci přímému ovlivnění jejich produkce s potenciálem pro využití v terapii. U některých enzymů je již molekulární podstata produkce kyslíkových radikálů dobře popsána, u jiných však přetrvávají kontroverze a současné teorie jsou zřejmě daleko od pravdy. Mnohem zajímavější se pak jeví otázka fyziologické důležitosti této produkce. Dlouhou dobu byly totiž kyslíkové radikály považovány za jednoznačně škodlivé faktory narušující celistvost organismu. Novější výzkumy ale naopak naznačují, že jejich existence může být též přínosná a účelná. Prokazatelně totiž mohou sloužit jako signalizační molekuly v některých metabolických a regulačních drahách probíhajících v organismu.

Tato bakalářská práce nabízí nahlédnutí do současného stavu znalostí. Zaměřuje se na co nejpodrobnější popis produkce reaktivních forem kyslíku enzymy mitochondriálního dýchacího řetězce. Dále pak se zabývá některými signálními kaskádami, u kterých byl prokázán podíl mitochondriální tvorby kyslíkových radikálů.

Klíčová slova: mitochondrie, enzymy dýchacího řetězce, reaktivní formy kyslíku, oxidativní stres, oxidačně redukční signalizace, autofagie, hypoxie, p66^{Shc}

Abstract

The production of mitochondrial reactive oxygen species and the resulting oxidative stress is an important phenomenon driving long-lasting research and intense discussions. Knowledge of exact mechanisms of reactive oxygen species production and pathways leading to their formation could help us to directly affect their production, a task with potential therapeutic implications. The molecular nature of the production of reactive oxygen species by some enzymes has already been well documented, but others still remain controversial and current theories are obviously far from the truth. Much more interesting is the question of physiological importance of this production. The reactive oxygen species were considered harmful factors clearly distorting the integrity of the organism for a long time. However, recent research suggest that their existence can also be beneficial and effective. Evidently they can serve as a signaling molecules in several metabolic and regulatory pathways occurring in the organism.

This bachelor thesis offers insight into the current state of knowledge. It focuses on the most detailed description of the reactive oxygen species production by mitochondrial respiratory chain enzymes. Furthermore, it deals with some signaling cascades, where involvement of mitochondrially generated reactive oxygen species has been proved.

Keywords: mitochondria, respiratory chain enzymes, reactive oxygen species, oxidative stress, redox signalisation, autophagy, hypoxia, p66^{Shc}

Obsah

SEZNAM ZKRATEK.....	6
1. ÚVOD.....	7
2. SLOŽKY DÝCHACÍHO ŘETĚZCE.....	9
2.1 Komplex I.....	9
2.2 Komplex II.....	9
2.3 Mitochondriální dehydrogenázy.....	10
2.4 Koenzym Q.....	10
2.5 Komplex III.....	10
2.6 Cytochrom <i>c</i>	11
2.7 Komplex IV.....	11
2.8 Komplex V.....	11
3. MITOCHONDRIÁLNÍ PRODUKCE KYSLÍKOVÝCH RADIKÁLŮ... ..	13
3.1 Produkce superoxidu komplexem I.....	14
3.2 Reaktivní formy kyslíku na komplexu III.....	16
3.3 Mitochondriální glycerol-3-fosfát dehydrogenáza a kyslíkové radikály.....	18
3.4 Komplex II jako místo produkce superoxidu.....	20
3.5 Komplex IV a produkce kyslíkových radikálů.....	20
3.6 Další mitochondriální producenti reaktivních forem kyslíku.....	20
4. ... A JEJÍ ÚLOHA VE FYZIOLOGICKÝCH REGULACÍCH.....	22
4.1 Principy oxidačně redukční regulace.....	23
4.2 Regulace aktivity proteinů.....	24
4.3 Regulace na úrovni organel – reaktivní formy kyslíku jako signály autofagie.....	25
4.4 Působení kyslíkových radikálů při nedostatku kyslíku.....	26
4.5 Úloha proteinu p66 ^{Shc} v produkci kyslíkových radikálů v mitochondriích.....	29
4.6 Jiné možnosti oxidačně redukční regulace.....	31
5. ZÁVĚR.....	32
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	34

Seznam zkratek

Atg	autofagické proteiny (<i>autophagy</i>)
ATP	adenosintrifosfát
b_L, b_H	cytochromy <i>b</i> s nízkým, respektive vysokým redoxním potenciálem
bp	páry bazí
cyt <i>c</i>	cytochrom <i>c</i>
e^-	elektron
ETF	elektrony přenášející flavoprotein (<i>electron-transferring flavoprotein</i>)
FAD, FADH ₂	flavin adenin dinukleotid oxidovaný, redukovaný
FMN	flavin mononukleotid
GRX	glutathion reduktáza
HIF-1	hypoxií indukovaný faktor 1
HRE	místa DNA reagující na hypoxii (<i>hypoxic response elements</i>)
kap.	kapitola
mGPDH	mitochondriální glycerol-3-fosfát dehydrogenáza
MMP	mezimembránový prostor mitochondrie
MnSOD	superoxid dismutáza obsahující mangan
MPP ⁺	1-methyl-4-fenylpyridium
mtDNA	mitochondriální deoxyribonukleová kyselina
NAD ⁺ , NADH	nikotinamid dinukleotid oxidovaný, redukovaný
NOS	syntáza oxidu dusného
PTP	pór ve vnější mitochondriální membráně (<i>permeability transition pore</i>)
Q _D , Q _P	místa vázající koenzym Q v komplexu II
Q _I , Q _O	místa vázající koenzym Q v komplexu III
SCF	proteinový komplex Skp1/Cdc53/F-box
SOD	superoxid dismutáza
TOM	transportér ve vnější membráně (<i>transporter of outer membrane complex</i>)
TRX	thioredoxin
UCP-1	rozpřahující protein 1 (<i>uncoupling protein 1</i>)
VHL	protein Von Hippel-Lindau

1. Úvod

Mitochondrie jsou semiautonorní organely nacházející se ve většině eukaryotických buněk. Podle endosymbiotické teorie Lynn Margulisové mitochondrie vznikly pohlcením prokaryotického organismu, nejspíše některého ze zástupců rickettsiální podskupiny α -Proteobakterií s anaerobním heterotrofním typem metabolismu. Tuto teorii podporují i studie porovnávající mitochondriální a bakteriální genom. Mitochondriální genom prvoků odhalil neočekávané množství společných primitivních znaků (shrnují Gray *et al.*, 1999), což poskytuje jednoznačný důkaz o původu mitochondriální DNA (mtDNA) z jednoho společného předka.

Mitochondriální morfologie vykazuje značnou dynamiku, jednotlivé mitochondrie jsou schopné fúze a opětovného rozdělení (Hoppins *et al.*, 2007). Strukturně se mitochondrie skládají z vnější membrány, mezimembránového prostoru, vnitřní membrány a matrix – vnitřního prostoru. Vnější membrána je volně propustná pro nenabitě molekuly do 10 kDa, takže mezimembránový prostor obsahuje přibližně totéž, co cytoplasma. Vnitřní membrána se rozděluje na část přiléhající k vnější membráně a část, jež Palade nazval *cristae mitochondriales*, tedy mitochondriální krysty – útvary membrány vchlipující se do vnitřního prostoru mitochondrie (shrnují Frey *et al.*, 2002). Struktura krist je rovněž dynamická, podle potřeby mohou zanikat a zase vznikat (Perkins *et al.*, 2001). Obecně plocha krist závisí na metabolické aktivitě konkrétní buňky, jelikož zvětšují plochu pro umístění enzymů dýchacího řetězce a ATP syntázy.

Relativně nízký obsah kódující informace v mtDNA v porovnání s nejmenším známým bakteriálním genomem naznačuje, že muselo dojít k přesunu některých genů z mitochondriální do jaderné DNA pravděpodobně někdy na začátku vývoje protomitochondriálního genomu. Rozdíly v obsahu genů mezi existujícími mtDNA nejlépe dokazují přechod genů právě v době na začátku evoluce mitochondrií. Tímto se mitochondrie staly semiautonorními organelami plně závislými na jaderných genech. Dobře jsou zdokumentovány případy přechodu genetické informace do jádra u rostlin, a to jak genů pro proteiny dýchacího řetězce, tak pro ribozomální proteiny (shrnují Gray *et al.*, 1999).

Mitochondriální genom se podobá bakteriálnímu. Obvykle se jedná o jedinou cyklickou molekulu DNA o velikosti přibližně 6 až 200 kbp. Mutace v mtDNA vedou k závažným onemocněním (LHON - Leberova dědičná optická neuropatie; MERRF - progresivní vrozená mitochondriální encefalomyopatie; MELAS - mitochondriální encefalomyopatie, laktátová acidóza a příhody podobné záchvatům mrtvice; NARP - neurogení svalová ochablost s ataxií a retinis pigmentosa).

V matrix mitochondrií probíhá mnoho katabolických a anabolických drah, jako například Krebsův cyklus, β -oxidace mastných kyselin, oxidace aminokyselin a biosyntéza hemu, některých fosfolipidů a koenzymu Q. Ve většině buněk hrají mitochondrie významnou roli v apoptóze (programované buněčné smrti). Vylitím cytochromu *c* z mezimembránového prostoru skrz pór ve vnější membráně dochází k aktivaci apoptotické dráhy.

Mitochondrie jsou obecně považovány za hlavní elektrárny buňky, protože produkují více než 90% buněčného adenosintrifosfátu (ATP), molekuly obsahující makroergickou vazbu. Celý proces se odehrává na vnitřní membráně. Enzymy dýchacího řetězce (komplexy I a II, další dehydrogenázy) využívají redukční potenciál jiných buněčných molekul (NADH, FADH₂, glycerol-3-fosfátu) a přenášejí postupně elektrony ve směru zvyšujícího se redoxního potenciálu pomocí přenašečů ubichinonu (koenzym Q uvnitř membrány přenáší e⁻ z různých zdrojů schopných redukovat ubichinon na komplex III) a cytochromu *c* (vně vnitřní membrány přenáší e⁻ z komplexu III na komplex IV) skrz řetězec až na molekulární kyslík za vzniku H₂O na komplexu IV. Přitom dochází k prostupu protonů (komplexy I, III a IV) do mezimembránového prostoru. Jejich gradient je využit ke spojení ADP a fosfátu, a tím vzniku ATP na ATP syntáze (komplex V).

Kromě uvedeného mohou mitochondrie plnit i velmi specifické úkoly, jako je například produkce tepla v hnědé tukové tkáni. K tomu dochází pokud tzv. rozpřahující protein UCP1 (*uncoupling protein 1*) propustí protony z mezimembránového prostoru zpět do matrix mitochondrie, a tím obejde syntézu ATP na komplexu V, rozpřáhne tedy dýchací řetězec a ATP syntázu. Energie uložená v elektrochemickém gradientu tak není využita pro práci, ale je uvolněna ve formě tepla.

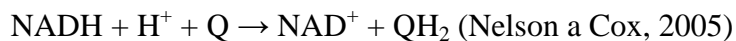
Dalším velmi studovaným fenoménem probíhajícím v mitochondriích je produkce reaktivních forem kyslíku. Zdá se, že tyto molekuly, jejichž úloha v organismu je složitá, nelze považovat za jednoznačně destruktivní ani za bezchybně prospěšné. Jak jsou kyslíkové radikály produkovány a proč tyto škodlivé molekuly mohou organismům též prospívat, je tématem této práce.

2. Složky dýchacího řetězce

2.1 Komplex I

Komplex I neboli NADH: ubichinon oxidoreduktáza či NADH dehydrogenáza je velký transmembránový enzymový komplex (1000 kDa; Lenaz a Genova, 2010) složený ze 45 různých podjednotek, z nichž 7 je kódováno mtDNA. Enzym obsahuje jako prostetické skupiny jeden flavinmononukleotid a osm železosírných center (Nelson a Cox, 2005), složek schopných přenášet elektrony skrz komplex od donoru k akceptoru. Elektrony prochází po spádu zvyšujícího se redoxního potenciálu.

NADH dehydrogenáza je enzym schopný přijímat elektrony od molekuly NADH (nikotinamid adenin dinukleotid), jíž oxiduje na NAD^+ . Zároveň od NADH odebírá hydridový ion a z matrix jeden proton. Vše pak předává na koenzym Q:



Současně s tím enzym umožňuje na každé 2 přenesené elektrony vstup 4 protonů přes membránu do mezimembránového prostoru pravděpodobně mechanickým pumpováním pomocí změny konformace jednoho z helixů (Hunte *et al.*, 2010).

2.2 Komplex II

Komplex II je také známý jako sukcinát-ubichinon oxidoreduktáza. Její hlavní část sukcinát dehydrogenáza je jediným enzymem Krebsova cyklu vázaným na membránu. Na rozdíl od komplexu I neslouží jako protonová pumpa a nepřispívá tedy ke vzniku protonového gradientu.

Sukcinát dehydrogenáza obsahuje dva hydrofilní proteiny – flavoprotein (podjednotka A) a železosírný protein (B), dva transmembránové proteiny (C a D) a dvě prostetické skupiny (Sun *et al.*, 2005), které přenášejí elektrony ze sukcinátu, jenž mění na fumarát, opět na koenzym Q v membráně. Ukázalo se, že komplex II obsahuje dvě místa vázající koenzym Q – tzv. proximální (Q_P), v matrix a distální (Q_D), blíže mezimembránového prostoru (Kayode *et al.*, 2001). Mezi těmito dvěma místy se nachází hem *b*, který může zachycovat elektrony, pokud nejsou dostatečně rychle odčerpávány na koenzym Q, a bránit tak jejich úniku (Yankovskaya *et al.*, 2003). Žádná ze 4 podjednotek enzymu není kódována mtDNA.

2.3 Mitochondriální dehydrogenázy

Na koenzym Q dokáží přenášet elektrony i jiné dehydrogenázy vnitřní membrány mitochondrií. Acyl - koenzym A dehydrogenáza získává elektrony z β -oxidace mastných kyselin, ty poté předává na elektrony přenášející flavoprotein (ETF, *electron-transferring flavoprotein*), který elektrony dále převádí na membránovou ETF: ubichinon oxidoreduktázu (Nelson a Cox, 2005). Tento enzym dokáže přijímat redukční ekvivalenty i od dalších dehydrogenáz; například od dimethylglycin dehydrogenázy a sarkosin dehydrogenázy (shrnují Lenaz a Genova, 2010).

Významnou dehydrogenázou využívající substrát z mezimembránového prostoru, potažmo z cytoplasmy, je mitochondriální glycerol-3-fosfát dehydrogenáza (mGPDH), která oxiduje glycerol-3-fosfát na dihydroxyaceton fosfát. Tento enzym je intenzivně studován jako zdroj kyslíkových radikálů.

2.4 Koenzym Q

Ubichinon nebo též koenzym Q je malá hydrofobní molekula benzochinonu s dlouhým izoprenovým řetězcem (u savců obvykle z devíti nebo desíti jednotek – koenzym Q₉ či Q₁₀; Voet a Voetová, 1995), schopná přenášet membránou až dva elektrony směrem na komplex III. Ubichinon může přijmout jeden elektron za vzniku semichinonového radikálu ($\dot{\text{Q}}\text{H}$) nebo dva elektrony a vznikne ubichinol (QH₂; Nelson a Cox, 2005).

2.5 Komplex III

Místem oxidace koenzymu Q je komplex III též nazývaný cytochrom *bc₁* komplex nebo ubichinon: cytochrom *c* oxidoreduktáza. K oxidaci koenzymu Q dochází v tzv. Q cyklu. Protože cytochrom *c*, který je dalším akceptorem elektronů po komplexu III, může přenášet pouze jeden elektron, ale koenzym Q poskytuje 2 elektrony, dokáže komplex III tyto dva elektrony rozdělit a přebytečný elektron vrací na koenzym Q. Konkrétně je molekula QH₂ oxidována na Q, oba elektrony vstupují do komplexu III a protony se uvolní do mezimembránového prostoru. Jeden z elektronů vstupuje přes Rieskeho železosírné centrum na cytochrom *c₁* a následně na volný cytochrom *c*. Druhý elektron se pak přes cytochromy *b* s nízkým (*b_L*) a vysokým (*b_H*) redoxním potenciálem vrací na molekulu koenzymu Q, z níž se stává Q $\dot{\text{}}$ (Nelson a Cox, 2005). Po přenosu druhého elektronu na Q $\dot{\text{}}$ dojde k přitáhnutí dvou protonů z matrix a vzniku QH₂. Cyklus se může opakovat. Celkově tedy dojde k prostupu čtyř protonů do mezimembránového prostoru.

Cytochrom *bc₁* komplex je dimer identických monomerů, každý složený z 11 podjednotek, z nichž pouze jedna je kódována v mtDNA.

2.6 Cytochrom *c*

Cytochrom *c* je rozpustný protein nacházející se v mezimembránovém prostoru. Blízko vnitřní membrány je udržován elektrostatickými silami. Jedná se o molekulu přenášející jeden elektron od komplexu III na komplex IV. Cytochrom *c*, stejně jako ostatní cytochromy, obsahuje hem jako prostetickou skupinu a dokáže absorbovat část viditelného spektra. Hemová skupina cytochromů obsahuje substituovaný porfyrinový kruh s atomem železa uprostřed.

2.7 Komplex IV

Komplex IV neboli cytochrom *c* oxidáza je posledním enzymem dýchacího řetězce, který předává elektrony na jejich konečný akceptor – kyslík. Komplex IV je membránou procházející enzym složený z 13 podjednotek. Tři z nich, které jsou původem z mtDNA, tvoří katalytické jádro enzymového komplexu, jež opět slouží jako protonová pumpa. Přestože zde dochází k interakci elektronů a kyslíku, nebyla zatím potvrzena přirozená tvorba kyslíkových radikálů tímto komplexem.

Cytochrom *c* oxidáza odebírá elektrony od cytochromu *c* na vnější straně membrány, který se tímto redukuje a je připraven přenést další elektron. Elektrony nejprve vstupují na ionty mědi Cu_A v tzv. dvoujaderném centru, kde jsou ionty drženy SH skupinami cysteinových zbytků. Poté elektrony putují na cytochromy *a*, a_3 a další ion mědi Cu_B . Hemová skupina cytochromu a_3 a Cu_B tvoří druhé dvoujaderné centrum, které přijímá elektrony z hemu *a* a přenáší je na kyslík vázaný k hemu a_3 . K úplné redukci molekuly O_2 na $2 H_2O$ je však zapotřebí – kromě čtyř elektronů – také čtyř protonů, které komplex získá z matrix. Energie této redoxní reakce je využita k pumpování dalších čtyř protonů do mezimembránového prostoru (Nelson a Cox, 2005), tj. 2 protony na jednu vzniklou molekulu vody.

2.8 Komplex V

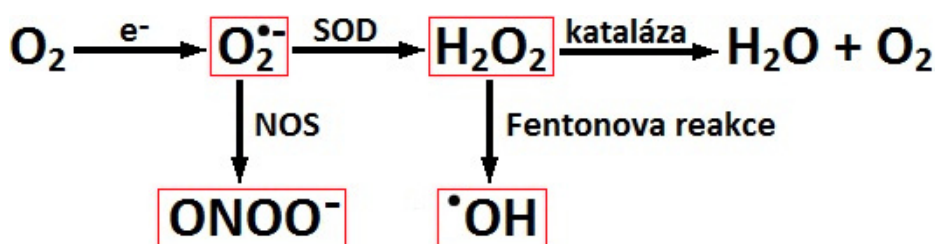
Protonový gradient vzniklý pumpováním protonů do mezimembránového prostoru komplexy dýchacího řetězce je využit k produkci molekuly ATP na komplexu V neboli ATP syntáze. Spojení těchto dvou pochodů se nazývá oxidační fosforylace. ATP syntáza je velký enzym, který má dvě hlavní části: F_0 a F_1 . F_0 část se nachází ve vnitřní membráně a její kruh složený z 10-12 *c* podjednotek (Nelson a Cox, 2005) je schopen se otáčet díky zpětnému prostupu protonových iontů do matrix po spádu koncentračního gradientu. Tato protonová síla je převáděna z *c* kruhu na γ podjednotku F_1 části, která se nachází v matrix mitochondrie.

Podjednotka γ svojí rotací mění konformaci α a β podjednotek, jež jsou tímto schopny syntetizovat ATP z ADP a anorganického fosfátu.

3. Mitochondriální produkce kyslíkových radikálů...

Za kyslíkové radikály nebo lépe reaktivní formy kyslíku považujeme takové sloučeniny kyslíku, které jsou velmi reaktivní (typicky kvůli přítomnosti nepárového elektronu), a proto nebezpečné a zapříčiňují řadu onemocnění. V mitochondriích vzniká přeskokem elektronu přenášeného dýchacím řetězcem na molekulu kyslíku superoxidový radikálový anion $O_2^{\bullet-}$. Ten pak může být přeměněn některou ze superoxid dismutáz (SOD; McCord a Fridovic, 1969) na peroxid vodíku H_2O_2 , jenž se rozpadá na mnohem nebezpečnější hydroxylový radikál $\bullet OH$ buď samovolně nebo tzv. Fentonovou reakcí za přítomnosti měďnatého nebo železnatého iontu. Přeměna na peroxid vodíku je ovšem žádoucí, protože ten může sloužit jako substrát enzymu katalázy (Radi *et al.*, 1991), která jej přemění na neškodné molekuly H_2O a O_2 . Na odstraňování H_2O_2 se vedle katalázy podílejí i thioredoxinové a peroxiredoxinové systémy, které ve finále oxidují molekuly glutationu. K odstranění volných kyslíkových radikálů přispívají též látky zvané antioxidanty, mezi které patří například N-acetyl cystein, α -tokoferol nebo vitamín C.

Na tomto místě je potřeba zmínit i existenci reaktivních druhů dusíku vznikajících z $\bullet NO$ a $O_2^{\bullet-}$ pomocí syntázy oxidu dusného (NOS). Aktivitou NOS vzniká peroxynitrit ($ONOO^-$), z něhož pak vznikají další druhy jako například oxid dusičitý ($\bullet NO_2$), oxid dusitý (N_2O_3) nebo samotný oxid dusnatý (NO). Tyto látky se podílí na buněčném poškození, ale též signalizaci.



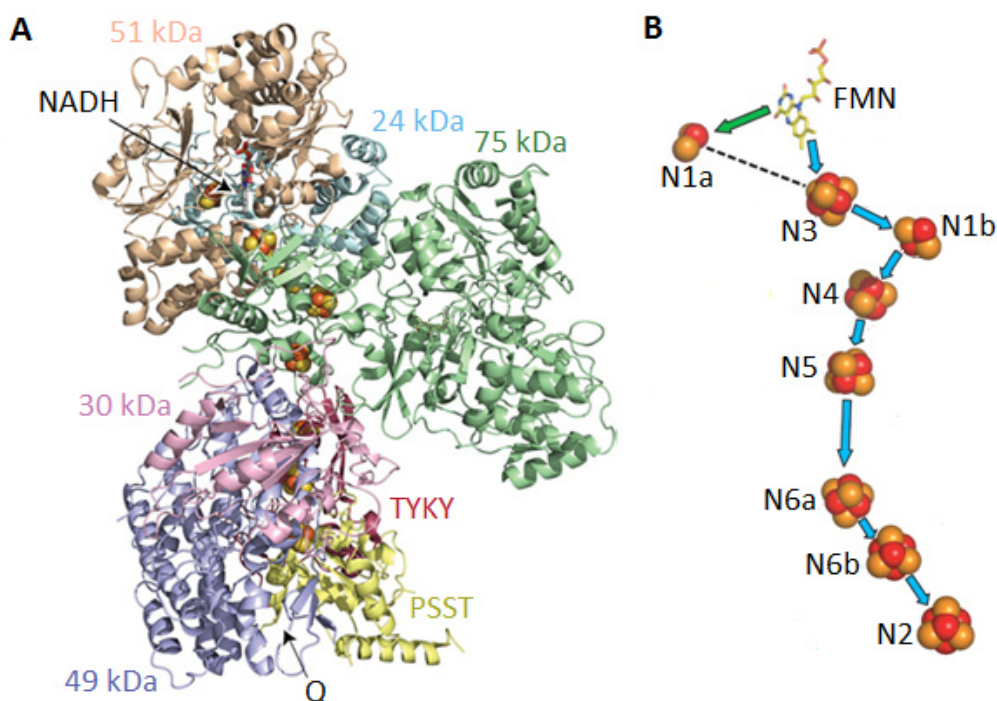
Obrázek 1: Jednotlivé formy reaktivních forem kyslíku a dusíku a jejich vzájemné vztahy

Z molekuly kyslíku vzniká přidáním elektronu (e^-) superoxidový radikálový anion, z něj dále za katalýzy superoxid dismutázy (SOD) peroxid vodíku, který je rozkládán katalázou. Ze superoxidového radikálového aniontu vzniká též peroxynitrit. Tato reakce je katalyzována syntázou oxidu dusnatého (NOS) a jako další substrát slouží radikál $\bullet NO$, který není pro přehlednost znázorněn. Peroxid vodíku je přeměňován na radikál $\bullet OH$ Fentonovou reakcí nebo samovolně.

„Přeskok“ elektronu na kyslík je procesem velmi složitým, ale též zajímavým. Jakým způsobem k němu dochází a která místa v mitochondriích jsou do tohoto mechanismu zapojena, se snaží popsat následující část práce.

3.1 Produkce superoxidu komplexem I

NADH dehydrogenáza je jedním z hlavních producentů kyslíkových radikálů a také strukturně nejsložitějším enzymem dýchacího řetězce. Pro pochopení funkce je potřeba se podívat do struktury enzymu konkrétněji. Komplex I má u všech studovaných organismů tvar písmene L a 14 základních podjednotek důležitých pro přenos energie. Sedm z nich je kódováno v jádře, jsou hydrofilní a tvoří vnější část zasahující do matrix mitochondrie. Zbývajících sedm je silně hydrofobních a vytvářejí 56 transmembránových helixů. U eukaryot jsou kódovány mitochondriálním genomem (shrnuje Hirst, 2010). Na komplex I se dále nekovalentně váže flavin mononukleotid (FMN) a osm železosírných center, jež jsou pojmenovány dle signálu elektronové paramagnetické resonance (viz Obrázek 2). Všechny prostetické skupiny jsou obsaženy v hydrofilní části enzymu.



Obrázek 2: Struktura hydrofilní části komplexu I, převzato ze Sazanov a a Hinchliffe (2006), upraveno dle Hirst (2010) a Hunte *et al.* (2010)

(A) Šipkami je znázorněno místo oxidace NADH a redukce koenzymu Q. Podjednotky jsou pojmenovány dle označení v organismu *Bos taurus* (tur domácí). Na části (B) pak jsou zvýrazněna železosírná centra enzymu pojmenovaná dle signálu z elektronové paramagnetické resonance. Modré šipky naznačují hlavní cestu přenosu elektronů, možný přechod elektronu z flavinu na centrum N1a je naznačen zelenou šipkou.

Je známo, že NADH jakožto substrát se váže na 51 kDa podjednotku, která se nachází v blízkosti flavinu, místo vazby koenzymu Q je na rozhraní 49 kDa a PSST podjednotek (Hunte *et al.*, 2010). Primární funkcí flavinu je tedy oxidace NADH. Sedm z osmi železosírných center

(šest 4Fe-4S a jedno 2Fe-2S) vytváří řetězec, který se podílí na přenosu elektronů přes komplex I. U posledního 2Fe-2S, tj. N1a místa není známa funkce v přímém přenosu energie z flavinu na koenzym Q, ale může z FMN odebírat elektron (Hirst, 2010).

Jak shrnuje Murphy (2009), produkce $O_2^{\bullet -}$ komplexem I závisí na protonovém gradientu, poměru NADH/NAD⁺, poměru QH₂/Q a aktuální lokální koncentraci O₂. Koenzym Q je schopen tohoto přenosu elektronu pouze vázaný na protein nebo jako částečně redukovaný semichinon $^{\bullet}QH$. Dále je produkce superoxidu závislá na protonmotivní síle protonového gradientu a rozdílu pH skrz membránu (Lambert a Brandt, 2004). Ze struktury enzymu pak vyplývá, že komplex I produkuje superoxid pouze na vnitřní stranu vnitřní mitochondriální membrány (Muller *et al.*, 2004).

Pozorování chování komplexu I pomocí různých analogů fyziologického koenzymu Q₁₀ (respektive Q₉) jako například koenzymu Q₁ a Q₂, idebenonu či decylubichinonu vedlo ke zjištění, že krátké molekuly (především Q₁ a Q₂) stimulují produkci superoxidu (Genova *et al.*, 2001). Místo úniku elektronů by zde mělo být hledaným přirozeným donorem elektronů pro membránově vázaný ubichinon. Jako hlavní kandidát je navrhováno železosírné centrum N2, jakožto místo s nejvyšším standardním elektrodoým potenciálem ze všech Fe-S ($E_m = -150\text{mV}$ až -50mV ; Ohnishi, 1998), s redoxním potenciálem závislým na pH, vhodným umístěním na rozhraní mezi periferní a membránovou částí komplexu a s nejmenší sterickou ochranou okolím komplexu. Měření využívající různých inhibitorů komplexu I tuto hypotézu podporují. Inhibitory třídy A (rotenon, piericidin A a rolliniastatin 1 a 2) stimulují produkci kyslíkových radikálů, protože blokují přístup koenzymu Q (a analogů) k místu N2, a tedy umožňují přeskok elektronů na kyslík. Naopak inhibitory třídy B (stigmatelin, mucidin a kapsaicin) zabraňují vzniku superoxidu, a to dokonce i za přítomnosti inhibitorů třídy A (Fato *et al.*, 2009).

Zajímavým pokusem pak bylo sledování mutanta *Yarrowia lipolytica*, který neobsahuje železosírné centrum N2, přesto u něj dochází k normální produkci kyslíkových radikálů (Galkin a Brandt, 2005). Podobně jako pozorování dalších skupin (Esterházy *et al.*, 2008; Kusmaul a Hirst, 2006), i tento pokus popírá hypotézy popsané výše a autoři navrhuji flavin jako centrum vzniku radikálů. Náchylnost flavinu k úniku elektronů by mohla vysvětlovat funkci centra N1a, které se nepodílí na transportu elektronů přes komplex I. Mohlo by totiž hrát roli při odebírání elektronů z částečně redukovaného flavinu, který pak nemá tendenci uvolňovat elektrony na kyslík. Produkce superoxidu může být též spojená s tvorbou semichinonu ($^{\bullet}QH$), čímž však není vyvrácena možnost produkce flavinem nebo N2 centrem (Ohnishi *et al.*, 2010).

Experimentálně lze zvýšit produkci volných kyslíkových radikálů na komplexu I pomocí odstranění cytochromu *c*, které vede ke zpomalení respirace. Významným stimulátorem produkce kyslíkových radikálů se ukazují též inhibitory jako rotenon a MPP⁺ (1-methyl-4-fenylpyridium; Kushnareva *et al.*, 2002). Jakékoli zpomalení či zastavení toku elektronů řetězcem, například i blokace syntézy ATP (Murphy, 2009) tedy podporuje produkci kyslíkových radikálů na komplexu I.

Další možností je produkce kyslíkových radikálů při redukcí NAD⁺. Pokud je dýchací řetězec přesyten či zablokován a je dostatek sukcinátu, dochází k tzv. zpětnému toku elektronů od komplexu II na komplex I a skrz něj na NAD⁺, což je považováno za největší příspěvek k produkci superoxidu mitochondriemi (Muller *et al.*, 2008). Bylo změřeno, že k takovéto tvorbě dochází i při nízkých koncentracích substrátů, a to dokonce za přítomnosti substrátů komplexu I a II, avšak při redukcí NAD⁺. Takové podmínky jsou blízké stavu v buňce, což naznačuje, že by se tento způsob produkce kyslíkových radikálů mohl uplatňovat i *in vivo* (Muller *et al.*, 2008). Ke zvýšení produkce kyslíkových radikálů (závislé na pH; Lambert a Brandt, 2004) dochází zejména, když množství NAD(P)H/NAD⁺ dosáhne hodnoty alespoň 0,85. Zvýšený poměr NADH/NAD⁺ totiž vede k permanentní redukcí FMN, což umožňuje únik elektronů (Murphy, 2009). Zde je primárním kandidátem na místo produkce kyslíkových radikálů N1a železosírné centrum komplexu I, protože je to jediná část řetězce s negativnějším redoxním potenciálem než má dvojice NADH/NAD⁺.

Ne všichni však souhlasí s existencí produkce reaktivních forem kyslíku na komplexu I. Bylo například prokázáno, že bez inhibitorů dýchacího řetězce (konkrétně antimycinu A) není vznik H₂O₂, resp. O₂^{•-} na komplexu I měřitelný, což autoři pokládají za důkaz, že za fyziologických podmínek k tvorbě kyslíkových radikálů nedochází (Staniek a Nohl, 2000). Toto tvrzení může být podpořeno i zjištěním, že pouze 0,15% z celkového elektronového toku dalo vznik H₂O₂ při oxidaci palmitoyl karnitinu tvořícího NADH pro komplex I (St-Pierre *et al.*, 2002). Je tedy možné tvrdit, že naměřené hodnoty reaktivních forem kyslíku jsou pouze artefaktem systému (Nohl *et al.*, 2005) a mitochondrie za fyziologických podmínek neprodukuje významné množství kyslíkových radikálů.

3.2 Reaktivní formy kyslíku na komplexu III

Na rozdíl od ostatních částí dýchacího řetězce je produkce volných kyslíkových radikálů pomocí cytochrom *bc₁* komplexu popsána již několik desítek let. Bylo zjištěno, že za únik elektronů nemůže inhibice komplexu myxothiazolem (zabraňuje redukcí Rieskeho železosírného proteinu

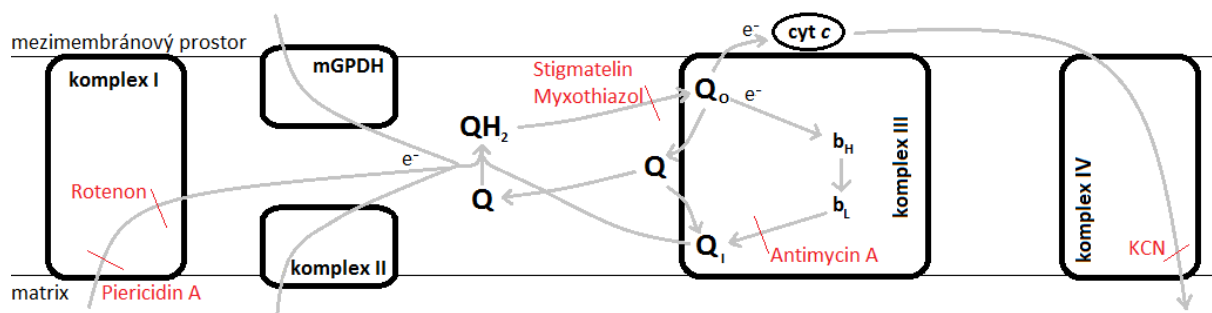
v rámci komplexu III), ani vylití cytochromu *c* nebo inhibice cytochrom *c* oxidázy (ta spíše aktivuje produkci superoxidu na komplexu I; Chen *et al.*, 2003), a pravděpodobně ani cytochromy *b*, které jsou součástí proteinu (Turrens *et al.*, 1985). Jako jediný možný způsob úniku elektronů se jeví mechanismus zvaný Q cyklus. Jak bylo popsáno výše (kap. 2.5), Rieskeho železosírný protein rozděluje dvoelektronový přenos na jednoelektronový. Je potřeba též zmínit, že komplex III má dvě vazebná místa pro koenzym Q. Tzv. místo Q_O se nachází v blízkosti mezimembránového prostoru a přijímá elektrony do komplexu. Naopak místo Q_I je blíže matrix a elektrony se zde vracejí na koenzym Q ve spolupráci s protony odebíranými z matrix. První jednoelektronová oxidace v Q_O místě ústí v přechodnou formu semichinonu $^{\bullet}QH$. Druhý elektron prochází přes cytochromy *b* a v Q_I místě redukuje jinou molekulu koenzymu Q. Ta se mění vzápětí na neutrální QH_2 (Trumpower, 1990).

Právě semichinon vznikající v místě Q_O je považován za hlavní zdroj superoxidu (Turrens *et al.*, 1985; Boveris *et al.*, 1976), jehož vznik je pozorován především za přítomnosti antimycinu A – inhibitoru prostupu elektronů do Q_I místa (St-Pierre *et al.*, 2002). Ke zvýšení produkce superoxidu dochází i při narušení funkce Q_O místa (Muller *et al.*, 2002) nebo při špatném spojení koenzymu Q s komplexem III, kde je důležitý jejich oxidačně redukční vztah a též složení fosfolipidů v okolí (Gille a Nohl, 2001). Vzhledem ke struktuře cytochrom *bc₁* komplexu a jeho míst vázajících koenzym Q (Iwata *et al.*, 1998), se nabízí, že by komplex III měl tvořit kyslíkové radikály pouze směrem do mezimembránového prostoru. Jejich výskyt však byl změřen na obou stranách vnitřní mitochondriální membrány, a to i přesto, že bylo zabráněno jakékoli jiné tvorbě (Muller *et al.*, 2004). Konkrétně bylo za přítomnosti antimycinu A naměřeno 70% produkce v matrix a 30% mezi membránami (Miwa a Brand, 2005).

Víme, že nemůže docházet k samovolnému prostupu nabitého superoxidového aniontu, zatímco difuze peroxidu vodíku je vnitřní mitochondriální membránou pouze zpomalena (Han *et al.*, 2001). Muller *et al.* (2004) navrhuje, že by membránou mohla procházet i protonovaná forma superoxidu HO_2^{\bullet} , ale ta se ve skutečnosti vyskytuje jen ve velmi malém množství (méně než 0,2% při pH 7,44). Mohla by ovšem vznikat uvnitř membrány, kde je prakticky nezjistitelná, a odtud pak odcházet svévolně na obě strany a tam ihned reagovat. Jako další možnost vidí únik neutrálního semichinonu z Q_O místa tzv. hydrofobním tunelem, jenž uvolňuje semichinon do lipidického prostředí v membráně, a ten pak může opět směřovat k oběma stranám membrány a až poté reagovat s kyslíkem. Únik nabitého superoxidu z mitochondrie do cytosolu je způsoben existencí aniontového kanálu závislého na napětí ve vnější membráně (Han *et al.*, 2003).

Zajímavé je pozorování vlivu různých inhibitorů komplexu III na produkci superoxidu (cílová místa viz Obrázek 3). Potvrzuje se, že antimycin A zvyšuje produkci superoxidu v místě

Q_o, protože nedochází k odčerpání elektronů, neuzavírá se Q cyklus a hromadí se „Q_o“ semichinon (Raha *et al.*, 2000). Jako místo snadného úniku elektronu ze semichinonu je navrhováno okolí cytochromu b_H nebo přímo místo Q_o (Zhang *et al.*, 1998). Samotné použití inhibitorů myxothiazolu a stigmatelinu nevede k výraznému zvýšení koncentrace superoxidu, a dokonce po přidání k antimycinu A koncentraci superoxidu snižují, protože zabraňují vzniku dalšího semichinonu. Jejich použití po odstranění superoxid dismutázy obsahující mangan (MnSOD) však překvapivě vedlo k výraznému zvýšení množství detekovaného superoxidu. Předpokládá se, že tyto inhibitory mají vliv na produkci v Q₁ místě, které začne být ihned redukováno zpětným elektronovým tokem, a tím zároveň vzroste i populace „Q₁“ semichinonu. Za fyziologických podmínek se zde vyskytuje MnSOD, která vznikající superoxid odčerpává, a proto není měřitelný (Raha *et al.*, 2000). K jinému závěru dospěla studie Starkova a Fiskuma (2001), kteří naměřili produkci H₂O₂ v důsledku použití myxothiazolu a jako jediné možné místo produkce navrhuje naopak místo Q_o. Tvrdí, že pro produkci superoxidu není potřeba semichinon, ale zásadní roli hraje přímo komplex III.



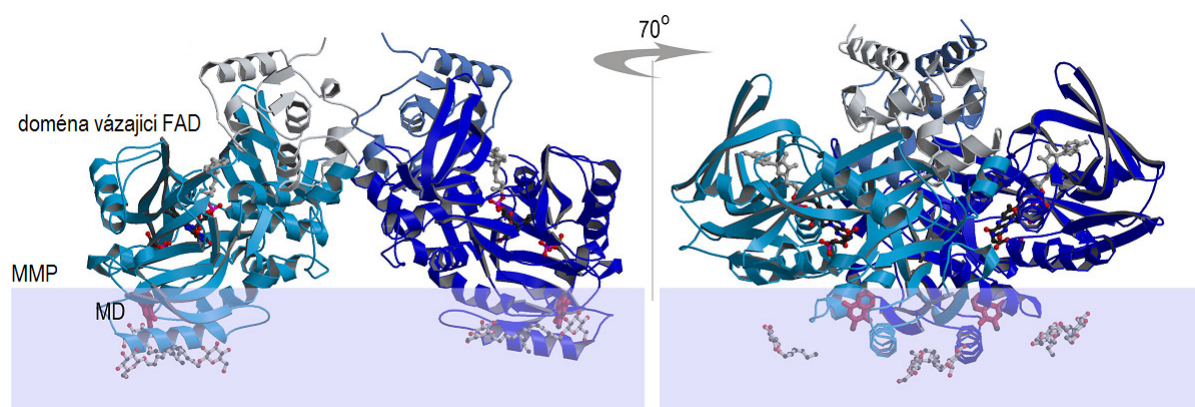
Obrázek 3: Schematické znázornění inhibitorů dýchacího řetězce

Komplex I, mitochondriální glycerol-3-fosfát dehydrogenáza (mGPDH) a komplex II tvoří redukovaný koenzym QH₂. Ten je zpracováván Q cyklem na komplexu III, kde vidíme rozdělení dvouelektrodového přenosu na jedoelektrodový a návrat elektronů zpět na koenzym Q. Elektrony přecházejí pomocí cytochromu c (cyt c) na komplex IV, kde reagují s kyslíkem. Červenými čarami jsou znázorněna místa inhibice jednotlivými vybranými inhibitory.

3.3 Mitochondriální glycerol-3-fosfát dehydrogenáza a kyslíkové radikály

Mitochondriální glycerol-3-fosfát dehydrogenáza (mGPDH) je dalším enzymem vnitřní mitochondriální membrány přispívajícím k produkci volných kyslíkových radikálů mitochondriemi. Krystalová struktura zobrazuje mGPDH jako dimer složený z identických podjednotek o molekulové hmotnosti 74 kDa s C koncovou částí vně membrány a N koncovou částí uvnitř (viz Obrázek 4; Yeh *et al.*, 2008). Při chromatografické separaci nicméně enzym migruje jako homotetramer, který může představovat strukturu skutečně existující v membráně (Garrib

a McMurray, 1986). mGPDH lze nalézt především ve hnědé tukové tkáni (Houštěk *et al.*, 1975) a v placentě (Swierczynski *et al.*, 1976), dále pak v játrech, mozku a srdci (Mráček *et al.*, 2009).



Obrázek 4: Krystalová struktura dimeru mitochondriální glycerol-3-fosfát dehydrogenázy, převzato z Yeh *et al.* (2008)

Jsou znázorněny dva pohledy na strukturu enzymu, který je zapuštěn do membrány (šedě) a vyčnívá do mezimembránového prostoru (MMP). Aktivní místo se nachází v doméně vázající flavin adenin dinukleotid (FAD), kde jsou molekuly FAD a dihydroxyaceton fosfátu znázorněny červeným kuličkovým modelem. „MD“ označuje molekulu menadionu, tj. analogu koenzymu Q, čímž naznačuje možné místo jeho vazby.

Produkce kyslíkových radikálů enzymem mGPDH je prokázána již několika pozorováními (Drahota *et al.*, 2002; Vrbacký *et al.*, 2007; Mráček *et al.*, 2009), ale dodnes není znám přesný mechanismus. Tato produkce je významná především při zablokování transportu elektronů dýchacím řetězcem, což se může objevit u různých patologií, a to i u tkání s relativně nízkým obsahem mGPDH (Mráček *et al.*, 2009). Zablokování komplexu III myxothiazolem (inhibitor místa Q_O) vyloučí možnost produkce superoxidu jiným místem, pokud je zde použit glycerol-3-fosfát jako jediný substrát systému (Vrbacký *et al.*, 2007). Po rozrušení membrány detergentem dochází k podobnému efektu, protože koenzym Q není schopen přenášet elektrony vodným roztokem – koenzym Q_{10} je hydrofobní a je nepravděpodobné, že by sám elektrony předával (Drahota *et al.*, 2002). Navíc byla pozorována produkce superoxidu na obě strany membrány, a to téměř srovnatelně (Miwa a Brand, 2005), ačkoli se enzym nachází pouze na vnější straně a neprochází skrz membránu (Yeh *et al.*, 2008). Dříve se předpokládalo význam místa redukujícího koenzym Q, flavinu a železosírných center, které ovšem nebyly jednoznačně potvrzeny (Garrib a McMurray, 1986). Nyní se ukazuje, že žádné kofaktory se zde nevyskytují a nepodílí se tedy na přenosu elektronů, a dokonce by jediným místem schopným přijímat a odevzdávat elektrony měl být pouze flavin (FAD), který se nachází v N koncové části. Podle tohoto modelu flavin přijme elektrony od glycerol-3-fosfátu, z něhož vznikne dihydroxyaceton fosfát a tento uvolní redukovaný flavin ($FADH_2$) pro přístup koenzymu Q (Yeh *et al.*, 2008).

3.4 Komplex II jako místo produkce superoxidu

Sukcinát dehydrogenáza není obvykle považována za hlavní zdroj volných kyslíkových radikálů, to však neplatí pro patofyziologické mutace. Vznik superoxidu je možné pozorovat u mutantů v podjednotkách B, C a D (viz kap. 2.2), což vede k oxidativnímu narušení DNA, genomové nestabilitě, vzniku nádorů a neschopnosti podléhat normální apoptóze. Produkci superoxidu mutovanou podjednotkou C potvrzují i Slane *et al.* (2006). Mutace sukcinát dehydrogenázy výrazně zkracují život i u *Caenorhabditis elegans*, zřejmě vlivem oxidativního stresu (Ishii *et al.*, 1998). Měření, která provedl Zhang *et al.* (1998) na izolovaném enzymu dokládají, že pokud nejsou elektrony ihned odebírány, může je redukované centrum FAD uvolňovat na kyslík. Jiné studie mutovaného enzymu pak ukazují, že místem úniku elektronů může být i proximální vazebné místo koenzymu Q nebo jeho bezprostřední okolí, a to především za přítomnosti částečně redukované formy – semichinonu (Guo a Lemire, 2003).

Většina superoxidu produkovaná mitochondriemi dýchajícími na sukcinátu (substrát komplexu II) však pochází ze zpětného toku elektronů na komplex I a je tedy tvořena komplexem I (viz kap. 3.1).

3.5 Komplex IV a produkce kyslíkových radikálů

Přestože není cytochrom *c* oxidáza tradičně považována za producenta kyslíkových radikálů, může za patofyziologických situací být jejich vznik zaznamenán. Enzym fosforylovaný protein kinázou A při hypoxii a následné ischemii a reperfuzi vytváří významné množství kyslíkových radikálů, které způsobují nevratné poškození myokardu (Prabu *et al.*, 2006). K podobným závěrům došli i Castello *et al.* (2006), kteří prokázali, že za nedostatku kyslíku a dostatku nitritu NO_2^- redukuje cytochrom *c* oxidáza NO_2^- na NO a chová se tak jako mitochondriální NO syntáza.

3.6 Další mitochondriální producenti reaktivních forem kyslíku

Bylo objeveno, že na produkci volných kyslíkových radikálů se podílí i jiné proteiny, i když za hlavní přispěvatele jsou stále považovány komplex I a komplex III dýchacího řetězce. Dalšími enzymy přenášejícími elektrony na koenzym Q a zároveň produkujícími superoxid jsou flavoproteiny ETF a ETF:koenzym Q reduktáza (St-Pierre *et al.*, 2002). Mezi enzymy významné v metabolismu mitochondrií, které se zároveň podílí na vzniku kyslíkových radikálů, patří dihydroorát dehydrogenáza (Forman a Kennedy, 1975), α -ketoglutarát dehydrogenáza (Starkov *et al.*, 2004) a mitochondriální akonitáza (Vasquez-Vivar *et al.*, 2000). Mitochondriální tvorba

kyslíkových radikálů však nemusí souviset pouze s enzymy zapojenými do metabolických drah. Příklady takových proteinů, které produkují reaktivní formy kyslíku, jsou i cytochrom b_5 reduktáza (Whatley *et al.*, 1998), protein p66^{Shc} (Trinei *et al.*, 2009), monoamin oxidáza (Hauptmann *et al.*, 1996) a též externí NADH dehydrogenáza (Fang a Beattie, 2003).

4. ... a její úloha ve fyziologických regulacích

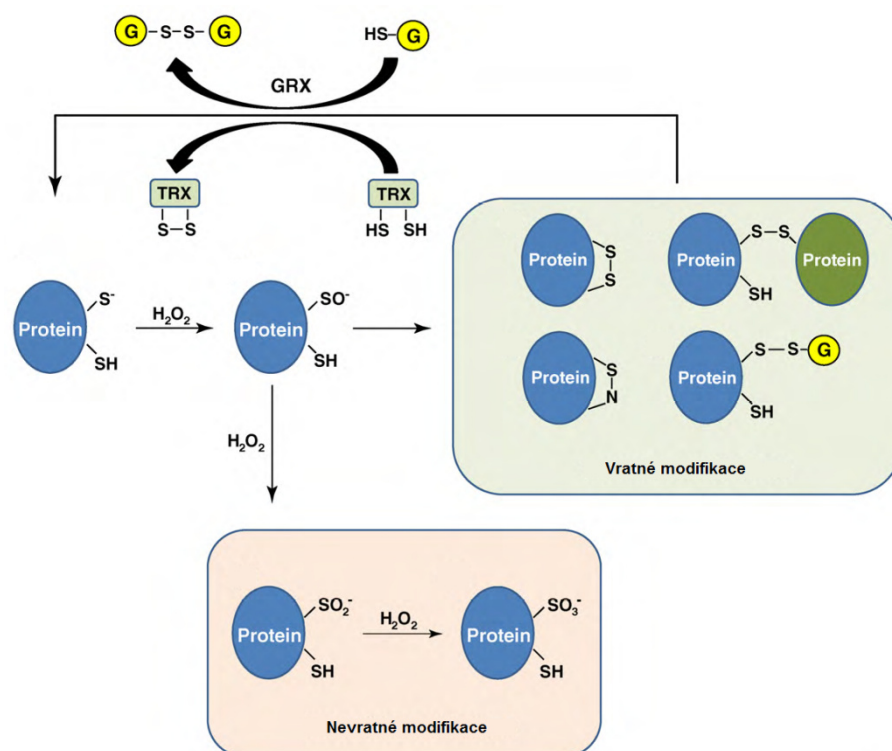
Volné kyslíkové radikály jsou tradičně považovány za velmi reaktivní vedlejší produkty metabolismu, které jsou škodlivé, narušují celistvost organismu a jsou zodpovědné za rozvoj mnoha patologií. Podle teorie volných radikálů (Harman, 1956) mají zásadní vliv především na stárnutí organismu, které je způsobeno hromaděním bodových mutací a delecí v mtDNA, což bylo některými studii potvrzeno (Kokoszka *et al.*, 2001), jinými zpochybněno (Vermulst *et al.*, 2007; Trifunovic *et al.*, 2004). Mitochondriální genom nemá histony zajišťující ochranu, ani dostatečně účinné opravné mechanismy (Larsen *et al.*, 2005; Yakes a Van Houten, 1997) a v průběhu času mutace přibývají, a to buď v důsledku chyb během replikace (Kujoth *et al.*, 2005) nebo jako dopad oxidativního stresu kyslíkových radikálů. Čím déle mitochondrie existuje, tím více kyslíkových radikálů vznikne a tím více chyb se objeví v mtDNA (Trifunovic *et al.*, 2005). V důsledku vznikají chyby v transkripci proteinů a následně chyby v jejich funkci. Tímto jsou zasaženy právě enzymy dýchacího řetězce, které mají podjednotky kódované v mtDNA. Mutované enzymy pak produkují více kyslíkových radikálů. Tento mechanismus je znám jako „začarovaný kruh“ (*vicious cycle*; Hiona a Leeuwenburgh, 2008).

Mutace v enzymech dýchacího řetězce jsou rovněž považovány za příčinu neurodegenerativních onemocnění jako například Alzheimerova nebo Parkinsonova choroba. Jako jedna z mnoha možností vzniku Alzheimerovy choroby je navržena mutace v komplexu IV a s ní spojený oxidativní stres. Nicméně přímý důkaz propojující mutace v mtDNA a vznik Alzheimerovy choroby zatím chybí (Fukui a Moraes, 2008). Parkinsonova nemoc by měla být způsobena mutací v komplexu I, zvýšený oxidativní stres zde spouští poškození buněk, které zajišťují správnou funkci přenosu signálů mezi neurony. Jestli je buněčná smrt způsobena špatnou funkcí mitochondrií, nebo k apoptóze vedou primárně jiné mechanismy, je otázkou dalšího výzkumu (Keane *et al.*, 2011).

V poslední době se však ukazuje, že by volné kyslíkové radikály mohly být součástí signálních drah nebo jiných fyziologických procesů. Přestože stále nebylo změřeno, jak a kolik superoxidu vzniká *in vivo*, závěry mnoha pokusů se shodují alespoň na minimální přirozené produkci. Určitým předpokladem tedy je, že se buňky na jeho výskyt adaptovaly a jsou schopné jej využít. I když mají tyto molekuly krátkou životnost a jsou velmi reaktivní, mohou modulovat aktivitu oxidovatelných substrátů. Další část práce se tedy zaměřuje na uplatnění reaktivních kyslíkových forem produkovaných mitochondriemi v buněčné signalizaci.

4.1 Principy oxidačně redukční regulace

Pro pochopení, jak mohou reaktivní formy kyslíku zasahovat do signálních drah, je třeba se zamyslet nad způsoby, kterými mohou ovlivňovat aktivitu proteinů. Hlavním místem těchto modifikací jsou cysteinové zbytky s oxidovatelnou thiolovou skupinou. Náchylné k oxidativním modifikacím jsou též aminokyseliny methionin, tryptofan a tyrosin. Oxidačně redukční změny thiolové skupiny (SH) v řadě proteinů vedou k následné regulaci mnohých drah, jako například vzájemného působení proteinů, afinity transkripčních faktorů, translace, oprav, apoptózy či konformační změny dané bílkoviny. Tyto reakce SH skupiny zahrnují vratnou oxidaci pomocí H_2O_2 na SOH , která může být dále nevratně oxidována na SO_2H a na sulfonovou kyselinu ($\text{S}(=\text{O})_2\text{-OH}$). S-S můstky vznikají buď v rámci jedné molekuly, nebo spojují molekuly dohromady. Předpokládá se, že vznik smíšených proteinů je jedním z obranných mechanismů buňky. Možnost vytvářet disulfidy s glutathionem se nazývá glutathionylace (obecně vzniká PSSG). Působením reaktivních forem dusíku vzniká SNO skupina nebo též může vznikat SN skupina v rámci proteinu (Janssen-Heininger *et al.*, 2008).



Obrázek 5: Různé modifikace thiolové skupiny v proteinech, převzato z Hamanaka a Chandel (2010)

Peroxid vodíku působí na skupinu S^- za vzniku SO^- , která může být dále modifikována nevratně (růžový rámeček) nebo vratně (šedý rámeček). Znárodněná glutation reduktáza (GRX) a thioredoxin (TRX) vrací protein do původního stavu. Podrobnější informace v textu.

Ve skutečnosti, pokud není reakce katalyzována, samotná thiolová skupina s peroxidem vodíku nereaguje. K reakci dochází pouze ve formě thiolátu, tj. S^- . Úloha H_2O_2 v této signalizaci je však ještě složitější a je dána jeho vysokou reaktivností. To znamená, že peroxid vodíku nejvíce ovlivňuje molekuly v blízkosti svého vzniku. Vzdálenější jsou ochráněny buněčnými enzymy katalázou, glutathion peroxidázou, thioredoxinem a peroxiredoxinem, které přemění H_2O_2 na vodu a kyslík (Forman *et al.*, 2004). Tyto enzymy, stejně jako další ovlivnitelné přítomností kyslíkových radikálů, obsahují v aktivním místě cysteinový zbytek.

4.2 Regulace aktivity proteinů

Právě redoxní modifikace cysteinů, které jsou nazývány molekulárními přepínači (*switches*), vedou ke změnám aktivity proteinů. Mezi takovéto enzymy jednoznačně patří tyrosinové fosfatázy (*protein tyrosine phosphatases*), velká rodina proteinů, které se podílejí na přenosu informace v mnoha buněčných signalizačních drahách. Všechny takovéto fosfatázy obsahují kritický thiolátový cystein. Působení H_2O_2 se projevuje ve vratné oxidaci thiolu na SOH. Takto pozměněný cysteinový zbytek nemůže přijímat fosfát a fosfatáza nemůže defosforylovat cílové molekuly (Meng *et al.*, 2002). Konkrétním případem je inaktivace fosfatázy 1B v epidermálních buňkách jako reakce na epidermální růstový faktor, který zároveň aktivuje protichůdnou tyrosinovou kinázu. Aktivity obou enzymů (fosfatázy a kinázy) se tedy navzájem nevyruší, pokud je funkce fosfatázy reverzibilně zastavena. Výsledkem je aktivace kinázy a následná mitóza (Lee *et al.*, 1998).

Regulovány mohou být i přímo transkripční faktory. Například thiolová skupina transkripčního faktoru OxyR může být změněna několika způsoby (S-NO, S-OH a S-SG) a všechny se objevují *in vivo*. Všechny jsou též transkripčně aktivní, ale liší se ve struktuře proteinu, afinitě k DNA a promotoru. Právě přepínání mezi jednotlivými stavy, patrně v závislosti na redoxním stavu buňky, slouží k regulaci genové exprese (Kim *et al.*, 2002).

Jiným podobným příkladem je kvasinkový transkripční faktor Yap1, který aktivuje expresi genů pro antioxidanty jako odpověď na oxidativní stres. Při nadměrném výskytu H_2O_2 dochází ke vzniku disulfidu mezi dvěma cysteinovými zbytky proteinu, změně konformace a vystavení signálu směřujícího protein do jádra. Yap1 tedy slouží k udržování správné hladiny kyslíkových druhů v cytoplasmě. Zpětnou redukci zde umožňuje thioredoxin (Delaunay *et al.*, 2000).

Zpětná redukce thiolů cílových proteinů byla zkoumána na modelu glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenázy. Bylo ukázáno, že se reakce velmi liší dle toho, k jakým změnám došlo.

Zatímco thioltransferáza inaktivuje smíšené disulfidové vazby, thioredoxin snáze odstraňuje SOH a SO₂H skupiny (Yoshitake *et al.*, 1994).

Kromě regulací drah a aktivit proteinů se mitochondriální kyslíkové radikály podílejí na tvorbě správné konformace proteinů udržováním dostatečné redoxní hladiny v buňce. Bylo prokázáno, že při inhibici produkce kyslíkových radikálů nedochází ke správnému sbalení a umístění proteinů na vnější stranu plasmatické membrány (pravděpodobně zpomalením této dráhy v endoplasmatickém retikulu). Nejvíce jsou ovlivněny povrchové receptory s disulfidickými můstky, ale tzv. redukční stres má vliv na celkovou homeostázu proteomu (Yang *et al.*, 2007).

4.3 Regulace na úrovni organel – reaktivní formy kyslíku jako signály autofagie

Reaktivní formy kyslíku mohou ovlivňovat též homeostázu celých buněk, a to přímou regulací aktivity a množství mitochondrií. Význam mitochondrií jako producentů reaktivních forem kyslíku a s nimi spojeného oxidativního stresu je neoddiskutovatelný. Jejich odbourávání pak může představovat jistou ochranu buňky (Scherz-Shouval a Elazar, 2010). K degradaci jsou tedy vybírány ty mitochondrie, u nichž došlo ke ztrátě membránového potenciálu (Lemasters *et al.*, 1998), nebo takové, které jsou označeny receptorem NIX, jenž se váže na protein Atg8 (viz dále; Novak *et al.*, 2009). Takovýto signál předurčuje dané mitochondrie k degradaci. Celý tento proces zvaný autofagie má tedy hlavní funkci v odstraňování poškozených mitochondrií a jejich mutované mtDNA, které zřejmě produkují nadměrné množství reaktivních forem kyslíku (Elmore *et al.*, 2001; Mijaljica *et al.*, 2007).

Autofagie (respektive tzv. mitofagie), která udržuje celkovou homeostázu, aniž buňky zabíjí, je přirozený fyziologický proces napomáhající k přežití během hladovění díky proteolytickému rozkládání cytosolických komponent (Takeshige *et al.*, 1992), nebo při diferenciaci buněk během růstu a vývoje (Cecconi a Levine, 2008). Takto odbourané složky cytoplasmy jsou po fúzi autofagického vakuolu s lysosomem degradovány na stavební částice a mohou být znovu použity. V posledních několika letech se ukazuje, že významnou roli v regulaci tohoto procesu hrají kyslíkové radikály. Přesný mechanismus jejich působení však nebyl dosud objasněn, přesto pozorování naznačují jejich důležitost.

Hladovění, inhibice dýchacího řetězce a přidání H₂O₂ do systému vedou ke spuštění autofagie kyslíkovými radikály. Naopak zvýšení výskytu SOD a katalázy k její inhibici (Scherz-Shouval *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2009). Ze všech druhů radikálů je jako hlavní činitel v těchto procesech navrhován superoxid (Chen *et al.*, 2009). Oxidace mitochondriálních lipidů reaktivními formami kyslíku vyprodukovaných v důsledku působení rapamycinu také spouští

autofagii, která vede k odstranění těchto poškozených molekul (Kissova *et al.*, 2006). Významnou roli hraje též fosfatidyl inositol 3 kináza třídy III, která tvoří komplex s autofagickým proteinem zvaným Beclin1, a v tomto komplexu iniciuje autofagický proces (Tassa *et al.*, 2003). Navíc se předpokládá, že by měla mít význam v podpoře produkce kyslíkových radikálů (Scherz-Shouval *et al.*, 2007). Dalším proteinem ovlivněným redoxním stavem v buňce je autofagický protein Atg4 (*autophagy*; Klionsky *et al.*, 2003), který ovlivňuje aktivitu proteinu Atg8 (Scherz-Shouval *et al.*, 2007). Protein Atg4 odštěpuje C koncovou část proteinu Atg8, čímž tuto molekulu aktivuje a prozatím ponechává v cytosolu (Kirisako *et al.*, 2000). Atg8 je poté kaskádou dějů podobnou ubiquitylací připojen k fosfoethanolaminu v membráně budoucího autofagického vakuolu (Kabeya *et al.*, 2000; Ichimura *et al.*, 2000; Suzuki 2001; Tanida 2002). Hladově-li však buňka, je protein Atg4 inhibován, nemůže dále zpětně odštěpovat Atg8 z membrány, což je jeho druhou funkcí, tvorba vakuolu není narušena a celý proces pokračuje. A právě tento krok by měl být hlavní cíl oxidačně redukční regulace autofagie. Bylo prokázáno, že konkrétním místem v Atg4 je cystein 81 v blízkosti aktivního místa, za které je považováno okolí cysteinu 77. Na cysteinu 81 vzniká skupina SOH, nelze však vyloučit vzniku disulfidu (Scherz-Shouval *et al.*, 2007), jelikož se tyto aminokyseliny nacházejí na stejné straně α -helixu (Sugawara *et al.*, 2005).

Význam procesu autofagie se zdůrazňuje především v souvislosti s některými chorobami. Absence autofagie v neuronech vede k rozvoji neurodegenerativních chorob (Yue *et al.*, 2009). Dále pak onemocnění tradičně spojovaná se zvýšeným výskytem kyslíkových radikálů, jako například rakovina a ischemie s následnou reperfuzí, mohou být efektivně blokována správně fungující autofagií (shrnují Scherz-Shouval a Elazar, 2010). Ovšem k přesnému poznání jednotlivých procesů může napomoci pouze další studium, které by mohlo vést až k potlačení daných chorob či snad k porozumění procesu stárnutí organismů.

4.4 Působení kyslíkových radikálů při nedostatku kyslíku

Důležitost kyslíkových radikálů jako přímých signalizačních molekul se rovněž ukazuje při vystavení buňky nízkému obsahu kyslíku – tzv. hypoxii (0,5 – 5% O₂). Přestože je kyslíku méně, paradoxně se produkce superoxidu zvyšuje a spouští signalizační kaskády vedoucí k expresi specifických genů a ke snížení potřeby kyslíku pro tvorbu buněčné energie (Hamanaka a Chandel, 2010).

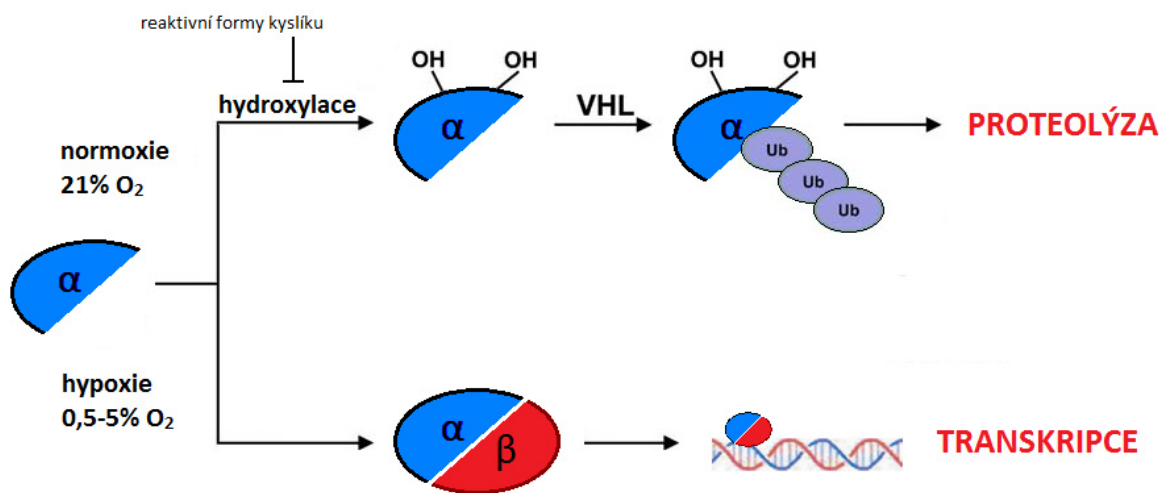
Mitochondrie, které samy využívají kyslík jako důležitý substrát oxidační fosforylace, slouží zároveň jako senzory jeho hladiny v buňce. Přítomnost funkčních mitochondrií je

pro hypoxickou signalizaci velmi důležitá, jelikož hraje roli v produkci reaktivních forem kyslíku jako odpověď na hypoxii, což je nezbytné pro další šíření signálů (Chandel *et al.*, 1998). Zvýšenou citlivost na obsah kyslíku ukazuje cytochromu a_3 v komplexu IV (Wilson *et al.*, 1994), který za nedostatku O_2 zpomaluje tok respiračním řetězcem a je tímto zodpovědný za spuštění produkce superoxidu. Jako místo produkce bylo určeno Q_O místo komplexu III, který je též citlivý na kyslík. Několik nezávislých pokusů prokázalo jednoznačný vliv reaktivních forem kyslíku pocházejících z komplexu III na šíření dráhy vyvolané hypoxií. Inhibice komplexu III stigmatelinem (zabraňuje vstupu elektronů) či vypnutí funkce Rieskeho železosírného proteinu pomocí RNA interference (přenos elektronů v rámci komplexu III) blokovalo šíření hypoxického signálu (Brunelle *et al.*, 2005; Guzy *et al.*, 2005; Bell *et al.*, 2007), přestože došlo ke zvýšení produkce superoxidu na komplexu I. Funkce dýchacího řetězce je tedy nezbytná pro přenos elektronů až na komplex III a následnou signalizaci (Guzy *et al.*, 2005). Otázkou zůstává, proč je právě tento mechanismus tak klíčový. Guzy a Schumacker (2006) ve své práci navrhuje, že příčinou je prodloužení životnosti Q_O semichinonu, tedy prodloužení doby pro únik elektronu a za velmi důležité považují, že superoxid je produkován do mezimembránového prostoru a ne do matrix.

Vyprodukovaný superoxidový radikálový anion se mění na stabilní peroxid vodíku, který hraje úlohu ve stabilizaci hypoxií indukovaného faktoru (HIF-1, *hypoxia-inducible factor 1*), transkripčního faktoru „hypoxických“ genů. HIF-1 se skládá ze dvou podobných podjednotek o základní struktuře *helix-loop-helix* (Wang *et al.*, 1995): 120 kDa α a 91-94 kDa β (Wang a Semenza 1995). Obě jsou neustále přepisovány, ale zatímco α je za běžných podmínek degradována, β je stabilní. Proces degradace však není triviální. Při normálních hladinách kyslíku v buňce dochází k hydroxylaci prolinu 564 a 402 v tzv. na kyslíku závislé degradační doméně v centrální části (aminokyselinové zbytky 401 až 603; Huang *et al.*, 1998) HIF- α prolyl hydroxylázou (Jaakkola *et al.*, 2001; Ivan *et al.*, 2001). Tento enzym patří do skupiny heterotetramerických prolyl 4-hydroxyláz, které ke své funkci potřebují nehemový Fe^{2+} , α -ketoglutarát, askorbát a také O_2 jako kosubstrát (Kivirikko a Myllyharju, 1998), proto by HIF- α prolyl hydroxyláza mohla v této kaskádě hrát roli dalšího čidla hladiny kyslíku. K hydroxylaci dochází též na asparaginu 803 tzv. faktorem inhibujícím HIF-1 v C koncové oblasti (Mahon *et al.*, 2001; Lando *et al.*, 2002). Označené aminokyseliny jsou rozeznávány proteinem potlačujícím nádory zvaným Von Hippel-Lindau (VHL; Maxwell *et al.*, 1999), který se na HIF- α váže svojí β podjednotkou, což aktivuje ubiquitinylační proces vedoucí k degradaci (Ohh *et al.*, 2000). α podjednotka proteinu VHL totiž na sebe váže protein ElonginC, jenž dále váže protein Cul2, a ElonginB, který má výraznou sekvenční homologii k ubiquitinu. Celý tento

komplex se pak podobá tzv. SCF (Skp1/Cdc53/F-box) E3 ubiquitin ligázám (Stebbins *et al.*, 1999) a je zodpovědný za ubiquitinylation vedoucí k degradaci proteinu v proteazomu (Kallio *et al.*, 1999).

Za hypoxických podmínek ovšem nedochází k degradaci HIF- α , protein vstupuje do jádra, spojuje se s HIF- β a aktivuje transkripci odpovídajících genů. Přestože je pro tuto signalizaci nezbytná produkce mitochondriálních kyslíkových radikálů a to na komplexu III, přesný mechanismus propojení dýchacího řetězce a inhibice degradace HIF-1 není znám (shrnuje Bell *et al.*, 2005; popř. Chandel *et al.*, 1998; Hagen *et al.*, 2003; Brunelle *et al.*, 2005; Guzy *et al.*, 2005; Bell *et al.*, 2007).



Obrázek 6: Proces degradace a aktivace hypoxií indukovaného faktoru

Při normálním stavu kyslíku dochází k odbourání podjednotky α ubiquitinylační dráhou vedoucí k proteolýze v proteazomu. Naopak při hypoxii dojde k aktivaci HIF spojením podjednotek α a β a následné transkripci odpovídajících genů.

Hypoxie ovlivňuje expresi více na 400 genů v závislosti na buněčném typu. Mezi nejvýznamnější příklady patří produkce erythropoetinu (Schuster *et al.*, 1989), jenž způsobuje konečnou diferenciaci erytrocytů, zvýšení jejich výskytu v krvi a tedy i zvýšení množství přenášeného kyslíku. Dalším příkladem je cévní endoteliální růstový faktor (Levy *et al.*, 1995), který stimuluje růst cév ve špatně prokrvených oblastech. Rovněž dochází ke zvýšení exprese enzymů aldolázy, fosfoglycerát kinázy a pyruvát kinázy (Semenza *et al.*, 1994), jehož důsledkem je upřednostnění glykolytického metabolismu na úkor oxidativního. A v neposlední řadě je uváděna endocytóza Na/K ATPázy, výrazného konzumenta ATP, což vede ke snížení potřeby produkce ATP (Dada *et al.*, 2003). Na tomto příkladu vidíme propojení mitochondriální produkce kyslíkových radikálů a ATP jako dvou protichůdných produktů dýchacího řetězce.

Produkované proteiny pomáhají buňce vypořádat se s nízkou hladinou kyslíku. Genová exprese je ovlivňována již zmíněným hypoxií indukovaným faktorem HIF-1. Inhibice jeho degradace je sama o sobě velmi složitým procesem, ovšem i vazba na DNA není triviální. Ta je spojena s úpravami cílového místa (Gillespie *et al.*, 2010). Peroxid vodíku, jako hlavní signální molekula, způsobuje modifikaci bazí v místech reagujících na hypoxii (*hypoxic response elements*, HRE). Preferenčně je v důsledku hypoxie oxidován guanin, konkrétně guanin na 3' konci sekvence DNA rozeznávané HIF-1 (Pastukh *et al.*, 2007; Ziel *et al.*, 2005). Místa s opakujícím se výskytem guaninů v promotoru (purin-GGG, nebo též purin-TG-purin) jsou místa vázající železnatý ion, který ve Fentonově reakci snadno reaguje s H₂O₂ za vzniku reaktivního [•]OH, který následně útočí na okolní struktury. Takováto oxidace bazí pravděpodobně činí dané místo „atraktivnější“ pro HIF-1. Situace je zřejmě ještě složitější, protože guaniny se opakují nejen v HRE oblastech, a tedy jsou pravděpodobně požadovány další určující vlastnosti. Příkladem je výskyt ovlivňovaných genů v mononukleosomech, tedy transkripčně aktivních nukleosomech. Avšak samotná hypoxie nemá na uspořádání chromatinu vliv (Ruchko *et al.*, 2009).

Pro transkripci hypoxií indukovaných genů je dále potřeba takzvané kontrolované poškození DNA a následná oprava (Gillespie *et al.*, 2010). V místech promotoru vybraného HIF-1 dochází v důsledku působení oxidativního stresu na guanin k jednovláknovým zlomům (Breit *et al.*, 2008). Tímto se DNA stává flexibilní, a tedy přístupná. Navíc je aktivován protein Ref-1/Ape-1 odstraňující porušené báze (*base excision repair*), který je koaktivátorem HIF-1 a napomáhá mu dostávat se do míst promotoru právě skrz takovéto narušení (Ziel *et al.*, 2005). Gillespie a Wilson (2007) zastávají myšlenku, že poškození DNA by mohlo být normální součástí regulace genové exprese a že takovéto riskování způsobuje pouze běžné poruchy vedoucí ke stárnutí organismu.

4.5 Úloha proteinu p66^{Shc} v produkci kyslíkových radikálů v mitochondriích

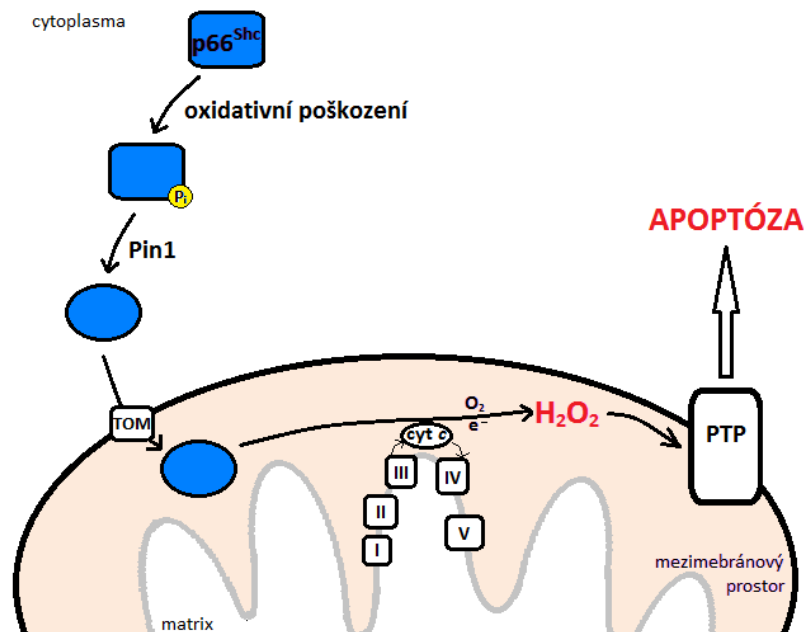
Na signalizaci zprostředkované mitochondriálními kyslíkovými radikály se podílí především ty, které pocházejí z produkce dýchacím řetězcem. Jedním z příkladů využití mitochondrie v signalizaci bez požadavku na komplexy dýchacího řetězce je protein p66^{Shc} vznikající alternativním sestřihem Shc proteinů. Stejně jako další dvě izoformy p46^{Shc} a p52^{Shc} (o relativní molekulové hmotnosti 42 a 52 kDa) patří mezi adaptorové proteiny podílející se na buněčné signalizaci. Všechny obsahují C koncovou SH2 doménu (zde se projevuje fosforylace tyrosinových zbytků), oblast bohatou na prolin a glycin a část podobnou SH2 doméně na N

konci. Pouze protein p66^{Shc} má navíc na N konci další proliny a glyciny. Přes vysokou podobnost se funkce p66^{Shc} výrazně liší od zbývajících dvou (Migliaccio *et al.*, 1997).

Jednou z funkcí těchto proteinů je reagovat na epidermální růstové faktory, které nasedají na odpovídající receptory v membráně a ty poté fosforylují tyrosinové domény Shc proteinů, jež vytváří komplex s Grb2 proteinem. Proteiny p46^{Shc} a p52^{Shc} takto spouští kaskádu vedoucí k mitóze, zatímco komplex p66^{Shc}-Grb2 je neaktivní a mitózu blokuje (Migliaccio *et al.*, 1997).

Důležitější roli hraje p66^{Shc} v reakci na kyslíkové radikály a regulaci apoptózy. K fosforylaci proteinu p66^{Shc} dochází v důsledku působení oxidativního stresu, ke kterému mohou významně přispívat též mitochondrie. Odstranění nebo mutace p66^{Shc} prokazatelně zvyšuje odolnost buňky k apoptóze. V těchto buňkách nedochází k aktivaci proteinů p53 a p21, které regulují buněčný cyklus a jejich funkce často vede ke smrti buňky. Myši s fenotypem p66^{Shc}^{-/-} mají o 30% delší dobu průměrného dožití bez zjevných poruch (Migliaccio *et al.*, 1999).

K indukci apoptózy pomocí fosforylovaného p66^{Shc} dochází po fosforylaci serinu 36 v důsledku oxidativního stresu v buňce. Poté přichází na řadu prolyl izomeráza Pin1, která v místě zbytků serinu 36 a prolinu 37 způsobí konformační změnu (Pinton *et al.*, 2007). Takovýto protein se může dostávat do mezimembránového prostoru mitochondrie (Nemoto *et al.*, 2006).



Obrázek 7: Dráha proteinu p66^{Shc}

Protein p66^{Shc} je fosforylován v důsledku oxidativního poškození serinovou kinázou. Prolyl izomeráza poté způsobí konformační změnu a p66^{Shc} se dostává do mezimembránového prostoru mitochondrie (růžově) pomocí transportéru ve vnější membráně (TOM, transporter of outer membrane complex), kde oxiduje cytochrom c (cyt c) a redukuje kyslík na H₂O₂. Peroxid vodíku aktivuje otevření póru ve vnější membráně (PTP) a tímto pórem uniká cytochrom c do cytoplasmy a spouští apoptózu.

I, II, III, IV a V zobrazují proteiny oxidační fosforylace. Komplex p66^{Shc} a mtHsp70 zde není pro přehlednost znázorněn.

Avšak v mezimembránovém prostoru byl nalezen i p66^{Shc} nefosforylovaný, zato tvořící vysokomolekulární komplex s mitochondriálním chaperonem mtHsp70. V tomto komplexu by měl být p66^{Shc} blokován před nadměrnou aktivací a měl by se uvolňovat pouze v důsledku oxidativního stresu (Orsini *et al.*, 2004). V každém případě monomerní p66^{Shc} může v mezimembránovém prostoru oxidovat cytochrom *c* a ze získaných elektronů tvořit H₂O₂ a tím indukovat otevření porů ve vnější membráně (PTP, *permeability transition pore*), což má za následek vylití cytochromu *c* do cytoplasmy a spuštění apoptotické kaskády (viz Obrázek 7; Pelicci *et al.*, 2005).

Přestože stále chybí mnoho informací o aktivaci, výskytu a funkci proteinu p66^{Shc}, ukazuje se, že navrhované kaskády existují též *in vivo* a že se jedná o jeden z mála popsanych případů záměrné produkce reaktivních kyslíkových forem. Protein p66^{Shc} pravděpodobně hraje důležitou roli v ochraně před stresem ohrožujícím buňku. Jeho experimentální odstranění však paradoxně vede k prodloužení života.

4.6 Jiné možnosti oxidačně redukční regulace

Kromě uvedených systémů, které jsou prokazatelně ovlivňovány mitochondriálními kyslíkovými radikály, existuje i mnoho dalších cytosolických mechanismů, jež však jsou ovlivněny reaktivními formami kyslíku pocházejícími primárně z jiných zdrojů, než jsou samotné mitochondrie. Určit však přesný původ radikálů v cytosolu je často velmi obtížné.

Ze všech možných případů je možné uvést několik kaskád, na jejichž regulaci se jako signalizační molekuly podílejí jak cytosolární, tak mitochondriální kyslíkové radikály. Například dráhy transkripčních faktorů NF- κ B (shrnují Morgan a Liu, 2011) nebo AP-1 (Chaum *et al.*, 2009). Taktéž pak lze zmínit aktivaci zánětlivých cytokinů (shrnují Naik a Dixit, 2011) či kontrolu průběhu buněčného cyklu (Owusu-Ansah *et al.*, 2008) a mnohé další, jejichž samotný výčet by mohl být delší než celá tato práce. Vidíme tedy, že mechanismy uplatňující se v redoxní signalizaci kyslíkovými radikály jsou komplikované a podílejí se na regulaci na všech možných úrovních v rámci buněčné existence. Jejich další výzkum je nezbytný, jelikož přesné principy nejsou obvykle známy.

5. Závěr

Mitochondriální produkce kyslíkových radikálů a její úloha ve fyziologických regulacích se ukázala býti tématem velmi rozsáhlým, ale zcela jistě zasluhujícím pozornost. Tato bakalářská práce poskytla nahlédnutí do problematiky tvorby reaktivních forem kyslíku a jejich uplatnění v buněčné signalizaci.

Práce v první části shromáždila dostupné informace o přesném mechanismu produkce kyslíkových radikálů na jednotlivých enzymech mitochondriálního dýchacího řetězce. Zatímco produkce komplexem III je již delší dobu popsána a víme, že souvisí s produkcí semichinonu v Q cyklu, produkce na ostatních komplexech je otázkou dalších výzkumů. Tvorba superoxidu na komplexu I je nejkomplikovanější, což souvisí se složitostí molekuly. Závěry jednotlivých studií sice navrhuji různá místa – železosírná centra N2 a N1a či flavin, nelze se však jednoznačně k některému z nich přiklánět, protože není vyloučeno, že za různých situací a podmínek pokusu dochází k produkci superoxidu na různých místech. Komplex II a mitochondriální glycerol-3-fosfát dehydrogenáza jsou spíše minoritní producenti, ovšem jejich důležitost nelze zanedbat, neboť podíl reaktivních forem kyslíku produkovaných těmito enzymy může značně vzrůst za patologických stavů. Zatímco fyziologický komplex II působí jako zprostředkovatel produkce superoxidu na komplexu I, tvorba kyslíkových radikálů na mGPDH spíše souvisí s malou afinitou ke koenzymu Q. Je ovšem možné, že i zde dochází ke zpětnému toku na komplex I.

Určení přesného mechanismu produkce kyslíkových radikálů však vyžaduje nové přístupy a lepší technologie, jelikož měření *in vitro* může způsobovat nepřesnosti a ukazovat chybné výsledky. Například měření mutovaných enzymů nebo umělé přidávání substrátů jednoznačně narušují normální stav v buňce. Navíc bez přidání inhibitorů často nelze vyloučit produkci superoxidu jinými než zkoumanými enzymy, ale samotné toto narušení vytváří nepřesné výsledky. Víme tedy, že jakékoli zásahy do přirozeného systému vedou ke vzniku artefaktů a právě odbourání těchto nedostatků povede k objasnění principů fungujících *in vivo*. V tomto směru je velmi nadějný vývoj na poli molekulárně biologických indikátorů, jako je například redox citlivá varianta zeleného fluorescenčního proteinu 9HyPer, která umožní sledování změn v produkci kyslíkových radikálů *in vivo* a omezí tak chyby zanášené do měření na izolovaných mitochondriích, které byly základním experimentálním modelem mitochondriální produkce reaktivních forem kyslíku v posledních třiceti letech. Přesto však poznání konkrétního mechanismu produkce reaktivních forem kyslíku vyvolává otázku, zda je daná tvorba škodlivá či naopak. Tímto se pak zabývala další část práce.

Přestože byly kyslíkové radikály dlouhou dobu považovány za jednoznačně škodlivé vedlejší produkty metabolismu, v současné době bychom na ně měli pohlížet jako na přirozené a potřebné součásti buněčného života. Práce shrnula principy oxidačně redukční regulace jednotlivých proteinů a následně i jednotlivých signalizačních drah vedoucích k ovlivnění celkové homeostázy. Zmíněné kaskády vedou k regulaci proteinů, konkrétně tyrosinových fosfatáz nebo transkripčních faktorů OxyR, Yap1 a především HIF-1. Ukázalo se, že nedostatek kyslíku stimuluje produkci kyslíkových radikálů. Tato skutečnost je sice paradoxní, ale uvážíme-li účelnou produkci superoxidu při potřebě přežít, pak nemusí být až tak zarážející. Při snížení potřeby ATP po endocytóze nejvýraznějšího konzumenta – Na/K ATPázy – mohou být elektrony využity pro vznik tzv. druhého produktu dýchacího řetězce – superoxidu, jenž pak spouští signalizační kaskádu.

Dále může pomocí kyslíkových radikálů docházet k regulaci celých organel, jež je produkují, a to pomocí autofagie. Tato dráha napomáhá k odstranění poškozených mitochondrií, což ochraňuje buňku před dalšími poruchami spojenými s oxidativním stresem a účinně bojuje proti tzv. začarovanému kruhu hromadícímu defekty, což je považováno za jednu z příčin stárnutí.

Jiný pohled pak přináší potřeba mitochondrií v dráze proteinu p66^{Shc}, který využívá organel pro spuštění apoptotické kaskády při nadměrném oxidativním stresu, ačkoli enzymy dýchacího řetězce nejsou v této dráze nezbytné. Záležitostí dalších výzkumů by pak mělo být vysvětlení, proč odstranění proteinu p66^{Shc} způsobilo výrazné prodloužení života u myši.

Osud mitochondrií je nelehký. Zdá se, že produkce kyslíkových radikálů není ani jednoznačně škodlivá ani prospěšná. Ačkoli existují důkazy o poškozeních způsobených oxidativním stresem, zde popsané dráhy tvorbu reaktivních forem kyslíku nezbytně potřebují. Proto je vyžadována jakási rovnovážná hladina kyslíkových radikálů v buňce, která udržuje přirozenou homeostázu. Zjištění jaká je a také, jak a které molekuly navzájem interagují a které procesy to následně ovlivňuje, by přispělo k lepším výzkumným a též medicínským postupům. K tomuto poznání se snad již rychle přibližujeme.

Seznam použité literatury

- BELL, E. L., EMERLING, B. M. & CHANDEL, N. S. 2005. Mitochondrial regulation of oxygen sensing. *Mitochondrion*, 5, 322-332.
- BELL, E. L., KLIMOVA, T. A., *et al.* 2007. The Q(o) site of the mitochondrial complex III is required for the transduction of hypoxic signaling via reactive oxygen species production. *Journal of Cell Biology*, 177, 1029-1036.
- BOVERIS, A., CADENAS, E. & STOPPANI, A. O. M. 1976. Role of ubiquinone in mitochondrial generation of hydrogen-peroxide. *Biochemical Journal*, 156, 435-444.
- BREIT, J. F., AULT-ZIEL, K., *et al.* 2008. Nuclear protein-induced bending and flexing of the hypoxic response element of the rat vascular endothelial growth factor promoter. *Faseb Journal*, 22, 19-29.
- BRUNELLE, J. K., BELL, E. L., *et al.* 2005. Oxygen sensing requires mitochondrial ROS but not oxidative phosphorylation. *Cell Metabolism*, 1, 409-414.
- CASTELLO, P. R., DAVID, P. S., *et al.* 2006. Mitochondrial cytochrome oxidase produces nitric oxide under hypoxic conditions: Implications for oxygen sensing and hypoxic signaling in eukaryotes. *Cell Metabolism*, 3, 277-287.
- CECCONI, F. & LEVINE, B. 2008. The role of autophagy in mammalian development: Cell makeover rather than cell death. *Developmental Cell*, 15, 344-357.
- CHANDEL, N. S., MALTEPE, E., *et al.* 1998. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 11715-11720.
- CHAUM, E., YIN, J. G., *et al.* 2009. Quantitative AP-1 Gene Regulation by Oxidative Stress in the Human Retinal Pigment Epithelium. *Journal of Cellular Biochemistry*, 108, 1280-1291.
- CHEN, Q., VAZQUEZ, E. J., *et al.* 2003. Production of reactive oxygen species by mitochondria - Central role of complex III. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 36027-36031.
- CHEN, Y., AZAD, M. B. & GIBSON, S. B. 2009. Superoxide is the major reactive oxygen species regulating autophagy. *Cell Death and Differentiation*, 16, 1040-1052.
- DADA, L. A., CHANDEL, N. S., *et al.* 2003. Hypoxia-induced endocytosis of Na,K-ATPase in alveolar epithelial cells is mediated by mitochondrial reactive oxygen species and PKC-zeta. *Journal of Clinical Investigation*, 111, 1057-1064.
- DELAUNAY, A., ISNARD, A. D. & TOLEDANO, M. B. 2000. H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *Embo Journal*, 19, 5157-5166.
- DRAHOTA, Z., CHOWDHURY, S. K. R., *et al.* 2002. Glycerophosphate-dependent hydrogen peroxide production by brown adipose tissue mitochondria and its activation by ferricyanide. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 34, 105-113.
- ELMORE, S. P., QIAN, T., *et al.* 2001. The mitochondrial permeability transition initiates autophagy in rat hepatocytes. *Faseb Journal*, 15, 2286+.
- ESTERHAZY, D., KING, M. S., *et al.* 2008. Production of reactive oxygen species by complex I (NADH : ubiquinone oxidoreductase) from Escherichia coli and comparison to the enzyme from mitochondria. *Biochemistry*, 47, 3964-3971.
- FATO, R., BERGAMINI, C., *et al.* 2009. Differential effects of mitochondrial Complex I inhibitors on production of reactive oxygen species. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1787, 384-392.
- FORMAN, H. J., FUKUTO, J. M. & TORRES, M. 2004. Redox signaling: thiol chemistry defines which reactive oxygen and nitrogen species can act as second messengers. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 287, C246-C256.
- FORMAN, H. J. & KENNEDY, J. 1975. Superoxide production and electron-transport in mitochondrial oxidation of dihydroorotic acid. *Journal of Biological Chemistry*, 250, 4322-4326.
- FREY, T. G., RENKEN, C. W. & PERKINS, G. A. 2002. Insight into mitochondrial structure and function from electron tomography. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1555, 196-203.
- FUKUI, H. & MORAES, C. T. 2008. The mitochondrial impairment, oxidative stress and neurodegeneration connection: reality or just an attractive hypothesis? *Trends in Neurosciences*, 31, 251-256.
- GALKIN, A. & BRANDT, U. 2005. Superoxide radical formation by pure complex I (NADH : Ubiquinone oxidoreductase) from Yarrowia lipolytica. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 30129-

30135.

- GARRIB, A. & MCMURRAY, W. C. 1986. Purification and characterization of glycerol-3-phosphate dehydrogenase (flavin-linked) from rat-liver mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 261, 8042-8048.
- GENOVA, M. L., VENTURA, B., *et al.* 2001. The site of production of superoxide radical in mitochondrial Complex I is not a bound ubiquinone but presumably iron-sulfur cluster N2. *Febs Letters*, 505, 364-368.
- GILLE, L. & NOHL, H. 2001. The ubiquinol/bc(1) redox couple regulates mitochondrial oxygen radical formation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 388, 34-38.
- GILLESPIE, M. N., PASTUKH, V. M. & RUCHKO, M. V. 2010. Controlled DNA "damage" and repair in hypoxic signaling. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 174, 244-251.
- GILLESPIE, M. N. & WILSON, G. L. 2007. Bending and breaking the code: dynamic changes in promoter integrity may underlie a new mechanism regulating gene expression. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 292, L1-L3.
- GRAY, M. W., BURGER, G. & LANG, B. F. 1999. Mitochondrial evolution. *Science*, 283, 1476-1481.
- GUO, J. & LEMIRE, B. D. 2003. The ubiquinone-binding site of the *Saccharomyces cerevisiae* succinate-ubiquinone oxidoreductase is a source of superoxide. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 47629-47635.
- GUZY, R. D., HOYOS, B., *et al.* 2005. Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. *Cell Metabolism*, 1, 401-408.
- HAGEN, T., TAYLOR, C. T., *et al.* 2003. Redistribution of intracellular oxygen in hypoxia by nitric oxide: Effect on HIF1 alpha. *Science*, 302, 1975-1978.
- HAMANAKA, R. B. & CHANDEL, N. S. 2010. Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends in Biochemical Sciences*, 35, 505-513.
- HAN, D., ANTUNES, F., *et al.* 2003. Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 5557-5563.
- HAN, D., WILLIAMS, E. & CADENAS, E. 2001. Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. *Biochemical Journal*, 353, 411-416.
- HARMAN, D. 1956. Aging - a theory based on free-radical and radiation-chemistry. *Journals of Gerontology*, 11, 298-300.
- HAUPTMANN, N., GRIMSBY, J., *et al.* 1996. The metabolism of tyramine by monoamine oxidase A/B causes oxidative damage to mitochondrial DNA. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 335, 295-304.
- HIONA, A. & LEEUWENBURGH, C. 2008. The role of mitochondrial DNA mutations in aging and sarcopenia: Implications for the mitochondrial vicious cycle theory of aging. *Experimental Gerontology*, 43, 24-33.
- HIRST, J. 2010. Towards the molecular mechanism of respiratory complex I. *Biochemical Journal*, 425, 327-339.
- HOPPINS, S., LACKNER, L. & NUNNARI, J. 2007. The machines that divide and fuse mitochondria. *Annual Review of Biochemistry*, 76, 751-780.
- HOUSTĚK, J., CANNON, B. & LINDBERG, O. 1975. Glycerol-3-phosphate shuttle and its function in intermediary metabolism of hamster brown-adipose tissue. *European Journal of Biochemistry*, 54, 11-18.
- HUANG, L. E., GU, J., *et al.* 1998. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 alpha is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 7987-7992.
- HUNTE, C., ZICKERMANN, V. & BRANDT, U. 2010. Functional Modules and Structural Basis of Conformational Coupling in Mitochondrial Complex I. *Science*, 329, 448-451.
- ICHIMURA, Y., KIRISAKO, T., *et al.* 2000. A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature*, 408, 488-492.
- ISHII, N., FUJII, M., *et al.* 1998. A mutation in succinate dehydrogenase cytochrome b causes oxidative stress and ageing in nematodes. *Nature*, 394, 694-697.
- IVAN, M., KONDO, K., *et al.* 2001. HIF alpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: Implications for O₂ sensing. *Science*, 292, 464-468.
- IWATA, S., LEE, J. W., *et al.* 1998. Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial

- cytochrome bc(1) complex. *Science*, 281, 64-71.
- JAAKKOLA, P., MOLE, D. R., *et al.* 2001. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O-2-regulated prolyl hydroxylation. *Science*, 292, 468-472.
- JANSSEN-HEININGER, Y. M. W., MOSSMAN, B. T., *et al.* 2008. Redox-based regulation of signal transduction: Principles, pitfalls, and promises. *Free Radical Biology and Medicine*, 45, 1-17.
- KABEYA, Y., MIZUSHIMA, N., *et al.* 2000. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *Embo Journal*, 19, 5720-5728.
- KALLIO, P. J., WILSON, W. J., *et al.* 1999. Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1 alpha by the ubiquitin-proteasome pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 6519-6525.
- KEANE, P. C., KURZAWA, *et al.* 2011. Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease. *Parkinson's Disease*, 2011:716871.
- KIM, S. O., MERCHANT, K., *et al.* 2002. OxyR: A molecular code for redox-related signaling. *Cell*, 109, 383-396.
- KING, M. S., SHARPLEY, M. S. & HIRST, J. 2009. Reduction of Hydrophilic Ubiquinones by the Flavin in Mitochondrial NADH:Ubiquinone Oxidoreductase (Complex I) and Production of Reactive Oxygen Species. *Biochemistry*, 48, 2053-2062.
- KIRISAKO, T., ICHIMURA, Y., *et al.* 2000. The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Auf7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *Journal of Cell Biology*, 151, 263-275.
- KIVIRIKKO, K. I. & MYLLYHARJU, J. 1998. Prolyl 4-hydroxylases and their protein disulfide isomerase subunit. *Matrix Biology*, 16, 357-368.
- KLIONSKY, D. J., CREGG, J. M., *et al.* 2003. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Developmental Cell*, 5, 539-545.
- KOKOSZKA, J. E., COSKUN, P., *et al.* 2001. Increased mitochondrial oxidative stress in the Sod2 (+/-) mouse results in the age-related decline of mitochondrial function culminating in increased apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 2278-2283.
- KUJOTH, G. C., HIONA, A., *et al.* 2005. Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science*, 309, 481-484.
- KUSHNAREVA, Y., MURPHY, A. N. & ANDREYEV, A. 2002. Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)(+) oxidation-reduction state. *Biochemical Journal*, 368, 545-553.
- KUSSMAUL, L. & HIRST, J. 2006. The mechanism of superoxide production by NADH : ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 7607-7612.
- LAMBERT, A. J. & BRAND, M. D. 2004. Superoxide production by NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) depends on the pH gradient across the mitochondrial inner membrane. *Biochemical Journal*, 382, 511-517.
- LANDO, D., PEET, D. J., *et al.* 2002. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain: A hypoxic switch. *Science*, 295, 858-861.
- LARSEN, N. B., RASMUSSEN, M. & RASMUSSEN, L. J. 2005. Nuclear and mitochondrial DNA repair: similar pathways? *Mitochondrion*, 5, 89-108.
- LEE, S. R., KWON, K. S., *et al.* 1998. Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 15366-15372.
- LEMASTERS, J. J., NIEMINEN, A. L., *et al.* 1998. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1366, 177-196.
- LEVY, A. P., LEVY, N. S., *et al.* 1995. Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth-factor gene by hypoxia. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 13333-13340.
- MAHON, P. C., HIROTA, K. & SEMENZA, G. L. 2001. FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1 alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes & Development*, 15, 2675-2686.
- MAXWELL, P. H., WIESENER, M. S., *et al.* 1999. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*, 399, 271-275.
- MCCORD, J. M. & FRIDOVIC, I. 1969. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte

- (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*, 244, 6049-&.
- MENG, T. C., FUKADA, T. & TONKS, N. K. 2002. Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases in vivo. *Molecular Cell*, 9, 387-399.
- MIGLIACCIO, E., GIORGIO, M., *et al.* 1999. The p66(shc) adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals. *Nature*, 402, 309-313.
- MIGLIACCIO, E., MELE, S., *et al.* 1997. Opposite effects of the p52(shc)/p46(shc) and p66(shc) splicing isoforms on the EGF receptor-MAP kinase-fos signalling pathway. *Embo Journal*, 16, 706-716.
- MIJALJICA, D., PRESCOTT, M. & DEVENISH, R. J. 2007. Different fates of mitochondria - Alternative ways for degradation? *Autophagy*, 3, 4-9.
- MIWA, S. & BRAND, M. D. 2005. The topology of superoxide production by complex III and glycerol 3-phosphate dehydrogenase in Drosophila mitochondria. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1709, 214-219.
- MORGAN, M. J. & LIU, Z. G. 2011. Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappa B signaling. *Cell Research*, 21, 103-115.
- MRÁČEK, T., PECINOVÁ, A., *et al.* 2009. High efficiency of ROS production by glycerophosphate dehydrogenase in mammalian mitochondria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 481, 30-36.
- MULLER, F., CROFTS, A. R. & KRAMER, D. M. 2002. Multiple Q-cycle bypass reactions at the Q(o) site of the cytochrome bc(1) complex. *Biochemistry*, 41, 7866-7874.
- MULLER, F. L., LIU, Y. H., *et al.* 2008. High rates of superoxide production in skeletal-muscle mitochondria respiring on both complex I- and complex II-linked substrates. *Biochemical Journal*, 409, 491-499.
- MULLER, F. L., LIU, Y. H. & VAN REMMEN, H. 2004. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 49064-49073.
- MURPHY, M. P. 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, 417, 1-13.
- NAIK, E. & DIXIT, V. M. 2011. Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production. *Journal of Experimental Medicine*, 208, 417-420.
- NELSON, D. L., COX, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. Fourth edition. New York : Freeman, 2005. Oxidative Phosphorylation and Photophosphorylation, s. 1119.
- NEMOTO, S., COMBS, C. A., *et al.* 2006. The mammalian longevity-associated gene product p66(shc) regulates mitochondrial metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 10555-10560.
- NOHL, H., GILLE, L. & STANIEK, K. 2005. Intracellular generation of reactive oxygen species by mitochondria. *Biochemical Pharmacology*, 69, 719-723.
- NOVAK, I., KIRKIN, V., *et al.* 2010. Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance. *Embo Reports*, 11, 45-51.
- OHH, M., PARK, C. W., *et al.* 2000. Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nature Cell Biology*, 2, 423-427.
- OHNISHI, S. T., SHINZAWA-ITOH, K., *et al.* 2010. New insights into the superoxide generation sites in bovine heart NADH-ubiquinone oxidoreductase (Complex I) The significance of protein-associated ubiquinone and the dynamic shifting of generation sites between semiflavin and semiquinone radicals. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1797, 1901-1909.
- OHNISHI, T. 1998. Iron-sulfur clusters semiquinones in Complex I. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1364, 186-206.
- ORSINI, F., MIGLIACCIO, E., *et al.* 2004. The life span determinant p66Shc localizes to mitochondria where it associates with mitochondrial heat shock protein 70 and regulates trans-membrane potential. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 25689-25695.
- OWUSU-ANSAH, E., YAVARI, A., *et al.* 2008. Distinct mitochondrial retrograde signals control the G1-S cell cycle checkpoint. *Nature Genetics*, 40, 356-361.
- OYEDOTUN, K. S. & LEMIRE, B. D. 2001. The quinone-binding sites of the Saccharomyces cerevisiae succinate-ubiquinone oxidoreductase. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 16936-16943.
- PASTUKH, V., RUCHKO, M., *et al.* 2007. Sequence-specific oxidative base modifications in hypoxia-inducible genes. *Free Radical Biology and Medicine*, 43, 1616-1626.
- PELICCI, P. G. 2005. Electron transfer between cytochrome C and P66SHC generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis. *Febs Journal*, 272, 319-320.

- PERKINS, G. A., RENKEN, C. W., *et al.* 2001. Electron tomography of mitochondria after the arrest of protein import associated with Tom19 depletion. *European Journal of Cell Biology*, 80, 139-150.
- PINTON, P., RIMESSI, A., *et al.* 2007. Protein kinase C beta and prolyl isomerase 1 regulate mitochondrial effects of the life-span determinant p66(Shc). *Science*, 315, 659-663.
- PRABU, S. K., ANANDATHEERTHAVARADA, *et al.* 2006. Protein kinase A-mediated phosphorylation modulates cytochrome c oxidase function and augments hypoxia and myocardial ischemia-related injury. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 2061-2070.
- RADI, R., TURRENS, J. F., *et al.* 1991. Detection of catalase in rat-heart mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 266, 22028-22034.
- RAHA, S., MCEACHERN, G. E., *et al.* 2000. Superoxides from mitochondrial complex III: The role of manganese superoxide dismutase. *Free Radical Biology and Medicine*, 29, 170-180.
- RUCHKO, M. V., GORODNYA, O. M., *et al.* 2009. Hypoxia-induced oxidative base modifications in the VEGF hypoxia-response element are associated with transcriptionally active nucleosomes. *Free Radical Biology and Medicine*, 46, 352-359.
- SAZANOV, L. A. & HINCHLIFFE, P. 2006. Structure of the hydrophilic domain of respiratory complex I from *Thermus thermophilus*. *Science*, 311, 1430-1436.
- SCHERZ-SHOVAL, R. & ELAZAR, Z. 2011. Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology. *Trends in Biochemical Sciences*, 36, 30-38.
- SCHERZ-SHOVAL, R., SHVETS, E., *et al.* 2007. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *Embo Journal*, 26, 1749-1760.
- SCHUSTER, S. J., BADIAVAS, E. V., *et al.* 1989. Stimulation of erythropoietin gene-transcription during hypoxia and cobalt exposure. *Blood*, 73, 13-16.
- SEMENZA, G. L., ROTH, P. H., *et al.* 1994. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by Hypoxia-inducible factor-1. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 23757-23763.
- SLANE, B. G., AYKIN-BURNS, N., *et al.* 2006. Mutation of succinate dehydrogenase subunit C results in increased O₂(center dot-), oxidative stress, and genomic instability. *Cancer Research*, 66, 7615-7620.
- ST-PIERRE, J., BUCKINGHAM, J. A., *et al.* 2002. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 44784-44790.
- STANIEK, K. & NOHL, H. 2000. Are mitochondria a permanent source of reactive oxygen species? *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1460, 268-275.
- STARKOV, A. A. & FISKUM, G. 2001. Myxothiazol induces H₂O₂ production from mitochondrial respiratory chain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 281, 645-650.
- STARKOV, A. A., FISKUM, G., *et al.* 2004. Mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species. *Journal of Neuroscience*, 24, 7779-7788.
- STEBBINS, C. E., KAELIN, W. G. & PAVLETICH, N. P. 1999. Structure of the VHL-ElonginC-ElonginB complex: Implications for VHL tumor suppressor function. *Science*, 284, 455-461.
- SUGAWARA, K., SUZUKI, N. N., *et al.* 2005. Structural basis for the specificity and catalysis of human Atg4B responsible for mammalian autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 40058-40065.
- SUN, F., HUO, X., *et al.* 2005. Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell*, 121, 1043-1057.
- SUZUKI, K., KIRISAKO, T., *et al.* 2001. The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *Embo Journal*, 20, 5971-5981.
- SWIERCZYNSKI, J., SCISLOWSKI, P. & ALEKSANDROWICZ, Z. 1976. High activity of alpha-glycerophosphate oxidation by human placental mitochondria. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 429, 46-54.
- TAKESHIGE, K., BABA, M., *et al.* 1992. Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *Journal of Cell Biology*, 119, 301-311.
- TANIDA, I., TANIDA-MIYAKE, E., *et al.* 2002. Human Apg3p/Aut1p homologue is an authentic E2 enzyme for multiple substrates, GATE-16, GABARAP, and MAP-LC3, and facilitates the conjugation of hApg12p to hApg5p. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 13739-13744.
- TASSA, A., ROUX, M. P., *et al.* 2003. Class III phosphoinositide 3-kinase-Bec1 complex mediates the amino acid-dependent regulation of autophagy in C2C12 myotubes. *Biochemical Journal*, 376, 577-586.

- TRIFUNOVIC, A., HANSSON, A., *et al.* 2005. Somatic mtDNA mutations cause aging phenotypes without affecting reactive oxygen species production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 17993-17998.
- TRIFUNOVIC, A., WREDENBERG, A., *et al.* 2004. Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature*, 429, 417-423.
- TRINEI, M., BERNIAKOVICH, I., *et al.* 2009. P66Shc signals to age. *Aging-Us*, 1, 503-510.
- TRUMPOWER, B. L. 1990. The protonmotive Q-cycle - energy transduction by coupling of proton translocation to electron-transfer by the cytochrome-bc1 complex. *Journal of Biological Chemistry*, 265, 11409-11412.
- TURRENS, J. F., ALEXANDRE, A. & LEHNINGER, A. L. 1985. Ubisemiquinone is the electron-donor for superoxide formation by complex III of heart-mitochondria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 237, 408-414.
- VASQUEZ-VIVAR, J., KALYANARAMAN, B. & KENNEDY, M. C. 2000. Mitochondrial aconitase is a source of hydroxyl radical - An electron spin resonance investigation. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 14064-14069.
- VERMULST, M., BIELAS, J. H., *et al.* 2007. Mitochondrial point mutations do not limit the natural lifespan of mice. *Nature Genetics*, 39, 540-543.
- VOET, D.; VOETOVÁ, J. G. *Biochemie*. 1. vyd. Praha : Victoria Publishing, 1995. Transport elektronů a oxidační fosforylace, s. 1325.
- VRBACKÝ, M., DRAHOTA, Z., *et al.* 2009. Glycerol-3-phosphate induced ROS formation and oxidative damage in mammalian mitochondria. *Febs Journal*, 276, 228-228.
- WANG, G. L., JIANG, B. H., *et al.* 1995. Hypoxia-inducible factor-1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 5510-5514.
- WANG, G. L. & SEMENZA, G. L. 1995. Purification and characterization of Hypoxia-inducible factor-1. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 1230-1237.
- WHATLEY, S. A., CURTI, D., *et al.* 1998. Superoxide, neuroleptics and the ubiquinone and cytochrome b(5) reductases in brain and lymphocytes from normals and schizophrenic patients. *Molecular Psychiatry*, 3, 227-237.
- WILSON, D. F., MOKASHI, A., *et al.* 1994. The primary oxygen sensor of the cat carotid-body is cytochrome alpha(3) of the mitochondrial respiratory-chain. *Febs Letters*, 351, 370-374.
- YAKES, F. M. & VANHOUTEN, B. 1997. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 514-519.
- YANG, Y., SONG, Y. & LOSCALZO, J. 2007. Regulation of the protein disulfide proteome by mitochondria in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 10813-10817.
- YANKOVSKAYA, V., HORSEFIELD, R., *et al.* 2003. Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation. *Science*, 299, 700-704.
- YEH, J. I., CHINTE, U. & DU, S. C. 2008. Structure of glycerol-3-phosphate dehydrogenase, an essential monotopic membrane enzyme involved in respiration and metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 3280-3285.
- YOSHITAKE, S., NANRI, H., *et al.* 1994. Possible differences in the regenerative roles played by thioltransferase and thioredoxin for oxidatively damaged proteins. *Journal of Biochemistry*, 116, 42-46.
- YUE, Z. Y., FRIEDMAN, L., *et al.* 2009. The cellular pathways of neuronal autophagy and their implication in neurodegenerative diseases. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 1793, 1496-1507.
- ZHANG, L., YU, L. D. & YU, C. A. 1998. Generation of superoxide anion by succinate-cytochrome c reductase from bovine heart mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 33972-33976.
- ZIEL, K. A., GRISHKO, V., *et al.* 2005. Oxidants in signal transduction: impact on DNA integrity and gene expression. *Faseb Journal*, 19, 387-394.